شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲
صفحات ۴۵۳-۴۳۷

بررسی اثر حفاظت فراسرد بر شاخص‌های رشد و ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک *Chaetoceros calcitrans*

مرتضی بهره‌مند[۱]، محمدعلی نعمت اللهی[۲*]، سجاد پورمظفر[۳]

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. استادگروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳. استادیار پژوهشی ایستگاه تحقیقات نرمتنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۳

چکیده

در این مطالعه به‌منظور ارزیابی امکان نگهداری ریزجلبک کتوسروس *Chaetoceros calcitrans* در شرایط فراسرد، ۴ عامل محافظت کنندهٔ سرمایی دی متیل سولفوکساید (DMSO)، متانول (ME)، گلیسرول (GL) و اتیلن گلیکول (ET)، هر یک با غلظت‌های مختلف (۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ درصد (حجم/حجم)، به‌عنوان تیمارهای آزمایشی در نظر گرفته شد و نمونه‌های ریزجلبکی پس از آماده‌سازی به‌مدت ۳۰ روز در دمای ۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه، به‌منظور تعیین بهترین تیمارها کشت مجدد ریزجلبک انجام و عملکرد رشد، ترکیب بیوشیمیایی و پروفیل اسید چرب مورد سنجش قرار گرفت. از ۲۴ تیمار مورد آزمایش، در ۱۵ تیمار پس از خروج از حالت انجماد رشد مجدد سلول‌ها مشاهده شد. بیشترین میزان تراکم نهایی ($۴/۱۳\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر) در بین تیمارهای آزمایشی در تیمار $DMSO_{15}$ مشاهده شد. شاخص بقا در تیمارهایی که پس از انجمادزدایی رشد مجدد سلول‌ها در آن‌ها مشاهده شد در دامنه‌ای بین ۸/۲۶ تا ۲۸/۱۹ در صد قرار داشت. بیشترین میزان زنده‌مانی به‌ترتیب در تیمارهای $DMSO_{15}$، $DMSO_{10}$ و ME_{15} ثبت شد. سنجش ترکیب بیوشیمیایی نشان داد که تنها در شاخص چربی اندازه‌گیری شده در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). سنجش پروفیل اسیدهای چرب نیز هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که حفاظت فراسرد ریزجلبک کتوسروس در شرایطی می‌تواند موفقیت‌آمیز باشد که از DMSO در سطح ۵ تا ۱۵ درصد و یا ME در سطح ۱۰ تا ۱۵ درصد به‌عنوان عامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی استفاده شود، و مناسب‌ترین نتایج نیز در زمان استفاده از DMSO در سطح ۱۵ درصد به‌دست آمد.

کلمات کلیدی: حفاظت فراسرد، *Chaetoceros calcitrans*، پروفیل اسید چرب، DMSO، دیاتومه.

* نویسنده مسئول: محمدعلی نعمت اللهی
Email: malahi@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 76, No. 3, Autumn 2023
pp. 437-453

Cryopreservation of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* and its effects on growth and biochemical composition

Morteza Bahremand[1], Mohammad Ali Nematollahi[2*], Sajjad Pourmozaffar[3]

1. Ph.D. Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Assistant Professor, Persian Gulf Mollusks Research Station, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e-Lengeh, Iran.

Received: 16-May-2023 **Accepted: 14-Sep-2023**

Abstract

In this study, in order to evaluate the possibility of cryopreservation of *C. calcitrans*, 4 cryoprotectant agents (dimethyl sulfoxide, methanol, glycerol and ethylene glycol), each with different concentrations (2.5, 5, 10, 15, 20, 25% (v/v)), were taken as experimental treatments. Then, microalgae samples were placed at -196°C for 30 days. After that, in order to determine the best treatments, re-cultivation of microalgae was carried out and growth performance, biochemical composition and fatty acid profile were measured. After thawing, regrowth of microalgae cells was observed in 15 out of 24 treatments. The highest final cell density ($4.13x10^6$ cells/ml) was observed in $DMSO_{15}$. After thawing, in the treatments in which the cells were reproduced again, the viability ranged between 8.26 and 28.19 percent. Maximum viability index were recorded in $DMSO_{15}$, $DMSO_{10}$ and ME_{15}, respectively. Biochemical composition analysis showed that there was a significant increase on the lipid content in the experimental treatments compared to the control group ($p<0.05$). No significant difference was observed on the fatty acid profile($p>0.05$). The results showed that the cryopreservation of *C. calcitrans* can be successful only if we use DMSO (5-15%) or ME (10-15%) as a cryoprotectant, and the best results are obtained when using DMSO at the level of 15%.

Keywords: Cryopreservation, *Chaetoceros calcitrans*, fatty acid profile, DMSO, Diatom.

∗ Corresponding author: Mohammad Ali Nematollahi Email: malahi@ut.ac.ir

۱. مقدمه

د یاتو مه ها (Bacillariophyceae) یکی از مهم‌ترین موجودات فتوسنتز کنندهٔ روی کرهٔ زمین محسوب می شوند که به‌واسطهٔ داشتن دیواره‌های سیلیسی خود شناخته می‌شوند. این موجودات تک سلولی عهده‌دار تولید چیزی حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد کل تولیدات اولیه در سطح کرهٔ زمین‌اند (Leynaert *et al*., 2018). جنس *Chaetoceros* با دارا بودن حدود ۲۲۸ گونه تاکنون، یکی از متنوع‌ترین جنس های د یاتو مه، محسوب می‌شود (Tapia-Gallardo *et al*., 2021). یکی از گونه‌های مطرح در این جنس *Chaetoceros calcitrans* است که به‌واسطهٔ داشتن یک ترکیب بیو شیمیایی خاص و سرشار از اسیدهای چرب امگا۳ (از نوع EPA[1])، آنتی‌اکسیدانت و ترکیبات محرک سیستم ایمنی (ویتامین C و B2)، ارزش غذایی بالا (پروتئین تا ۴۰ درصد و چربی تا ۲۰ درصد)، اندازهٔ بسیار مناسب (قطری در حدود ۲/۵ تا ۶ میکرون) و همچنین برخورداری از سرعت رشد بسیار بالا، اهمیت بالایی در صنعت آبزی‌پروری پیدا نموده، به‌نحوی که در حال حا ضر به یکی از ا صلی‌ترین منابع غذایی در پرورش لاروی ماهیان دریایی، سخت‌پو ستان، نرم‌تنان، خارتنان و حتی زئوپلانکتون‌هایی مانند آرتمیا تبدیل شده است (Brown *et al*., 1997; Krichnavarruk *et al*., 2005; Salas-Leiva and Dupré, 2011; Rodríguez et al., 2012).

به‌طور کلی تاکنون برای نگهداری ریزجلبک‌ها از سه روش استفاده شده است که شامل زیرکشت‌های سریالی[2]، خشک کردن انجمادی[3] و حفاظت فراسرد[4] می‌باشد (Foo *et al*., 2023). شاید رایج‌ترین و قدیمی‌ترین روش برای تهیه کشت اولیهٔ ریزجلبک، تهیهٔ آن از سایر مجموعه‌های تکثیر و پرورش باشد که دارای آزمایشگاه کشت جلبک (فایکولب)اند (Chellappan *et al*., 2020). کشت‌های اولیهٔ تهیه شده از مراکز مذکور را می‌توان برای تلقیح چندین کشت جدید و در ادامه برای تولید کشت اولیه یا استوک مادری مورد استفاده قرار داد. از کشت استوک نیز به تناوب می‌توان برای تهیهٔ زیر کشت‌ها استفاده نمود (Salas-Leiva and Dupré, 2011; Foo *et al*., 2023). این رویکرد نیازمند دارا بودن فضایی بزرگ، استفاده از محیط ک شت‌های گران قیمت و نیروی کار فراوان ا ست. بنابراین نگهداری و حفظ ریزجلبک‌ها به این روش در هر مجموعه‌ای بسیار پرهزینه و زمان‌بر خواهد بود (Chellappan *et al*., 2020). علاوه بر این، خطر آلودگی و بروز جهش‌های ژنتیکی در شیوهٔ مذکور نیز بسیار بالاست و حتی گاهی منجر به از بین رفتن سویه می‌شود (Heesch *et al*., 2012; Salas-Leiva *et al*., 2016). روش دوم، یعنی خشک کردن انجمادی زمانی مورد آزمایش و استفاده قرار گرفت که بسیاری از محققین متوجه عدم کارآیی روش زیرکشت سر یالی در دراز مدت برای نگهداری صحیح ریزجلبک ها به‌دلایل گفته شده، شدند (FOO *et al*., 2023). البته، اگرچه روش خشک کردن انجمادی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای نگهداری بلند مدت برخی گونه‌ها مانند سیانوباکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفته بود، اما محققین به‌تدریج در مطالعات خود متوجه عدم کارآیی گستردهٔ این روش برای نگهداری گونه‌های مختلف شدند. علاوه بر این، در گونه‌هایی که به این شیوه نگهداری شده بودند، نیز میزان بقا بسیار اندک (کمتر از ۱ درصد) بود (McGrath *et al*., 1978). در زمانی که محققین متمرکز روی روش خشک کردن انجمادی بودند، مطالعه‌ای توسط Holm-Hansen (۱۹۶۳) انجام شد که از روش جدیدی در نگهداری ریزجلبک استفاده کرد که به آن حفاظت فراسرد گفته می‌شود. این روش در طی سالیان متمادی و در آزمایش‌های مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که یکی از بهترین راه‌حل‌ها برای جلوگیری از بروز مشکلات مذکور در نگهداری ریزجلبک‌ها برای کشت های بعدی است (Nakanishi *et al*., 2012;

[1]Eicosapentaenoic acid
[2]Serial subculture
[3]lyophilization
[4]Cryopreservation

FOO *et al*., 2023). به‌طور کلی حفاظت فراسرد شامل یکسری مراحل آماده‌سازی و سپس ذخیره‌سازی نمونه‌های زیستی (سلول‌های زنده، بافت‌ها یا اندام‌ها) در نیتروژن مایع یا فاز گازی آن است. در این دمای بسیار کم، تقسیمات سلولی و فرآیندهای متابولیک و فیزیولوژیک در نمونه‌های زیستی متوقف شده و در نتیجه نگهداری طولانی مدت آن‌ها امکان‌پذیر می‌گردد (Wolkers and Oldenhof, 2021). این روش نیازمند تلاش اولیه و هزینهٔ فراوان است، اما در بلند مدت سبب کاهش هزینه و کاهش نیاز به نیروی کار و ایجاد آلودگی کمتر نمونه‌ها و همچنین کاهش خطر ایجاد تغییرات ژنتیکی در نمونه‌های جلبکی در طول زمان می‌شود (Youn and Hur, 2009).

نتایج مثبت استفاده از روش حفاظت فراسرد در نگهداری بسیاری از نمونه‌های زیستی گیاهی و جانوری از جمله سلول‌های جنسی نر و ماده، جنین‌های در مراحل اولیه، گلبول‌های سفید و قرمز خون، سلول‌های بنیادی، بذر و ژرم پلاسم به اثبات رسیده است (Wolkers and Oldenhof, 2021). علاوه بر این، براساس گزارش های موجود، استفاده از روش حفاظت فراسرد در نگهداری ریزجلبک‌ها در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین و دانشمندان قرار گرفته و در بسیاری از گونه‌ها نیز با موفقیت به انجام رسیده است (Paredes *et al*., 2021; Nugroho *et al*., 2016). بر خلاف افزایش روز افزون پژوهش‌ها در این حوزه در سراسر دنیا، اما مرور منابع داخلی موجود نشان می‌دهد بیشتر پژوهش‌ها در ایران بر گونه‌های جانوری و گیاهان عالی متمرکز بوده و تاکنون مطالعات بسیار اندکی در زمینهٔ حفاظت فراسرد گونه‌های مختلف جلبکی انجام گرفته است (Fayazi Atdotan and Rajabi Islami, 2015). به‌همین منظور، هدف از این مطالعه، بررسی امکان نگهداری گونهٔ *Chaetoceros calcitrans* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های ریزجلبکی مورد استفاده در صنعت آبزی‌پروری به روش حفاظت فراسرد و تأثیر احتمالی آن بر شاخص‌های رشد و ترکیب بیوشیمیایی و پروفیل اسیدهای چرب این ریزجلبک بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیهٔ نمونهٔ جلبک و روش کشت آن

نمونهٔ اولیه ریزجلبک *C. calcitrans* پس از تهیه به آزمایشگاه کشت جلبک مرکز تحقیقات نرم‌تنان خلیج فارس منتقل شد. برای کشت ریزجلبک از محیط کشت f/2 گیلارد (جدول ۱) غنی شده با سیلیکات سدیم (به میزان ۳۰ قسمت در هزار) و شوری ۳۵ قسمت در هزار استفاده شد (Salas-Leiva and Dupré, 2011; Guillard and Rhyther, 1962). برای تمامی کشت‌ها از دورهٔ نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی استفاده شد. دمای محیط ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و پی-اچ با استفاده از ۴- (۲- هیدروکسی اتیل)-۱-پیپرازین اتان سولفونیک اسید (HEPES) ۰/۰۱ مولار، در مقدار ۸-۷ تنظیم و هوادهی به‌طور مداوم انجام گرفت. کشت اصلی ریزجلبک در ظروف ارلن مایر با دهانهٔ تنگ با حجم ۵۰۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. نمونه‌گیری از ریزجلبک در روز ۵ کشت، یعنی در فاز لگاریتمی انجام گرفت (Salas-Leiva and Dupré, 2011). بدین‌منظور، ابتدا پس از قطع هوادهی میزان مشخصی از محیط کشت حاوی ریزجلبک برداشت و سپس برای جدا سازی ریزجلبک از محیط کشت، نمونه برداشت شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه مورد سانتریفیوژ (یونیورسال، ایران) قرار گرفت و سپس پلت جلبکی به‌دست آمده مجدداً با استفاده از محیط کشت f/2 تازه به شکل سوسپانسیون در آمد.

۲.۲. تیمارهای آزمایش

به‌منظور ارزیابی امکان نگهداری ریزجلبک *C. calcitrans* در شرایط فراسرد، ۴ عامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی دی متیل سولفوکساید (DMSO)، متانول (ME)، گلیسرول (GL) و اتیلن گلیکول (ET)، هر یک با غلظت‌های مختلف (۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ درصد

(حجم/حجم))، به‌عنوان تیمارهای آزمایشی (هر یک با سه تکرار) در نظر گرفته شد (Chellappan *et al*., 2020).

جدول ۱- مواد مورد استفاده در محیط کشت f/2 گیلارد

نام محلول	نام ماده	مقدار مورد نیاز
medium	$NaNO_3$	۷۵g/L
	$NaH_2PO_4.H_2O$	۵/۶۵g/L
Vitamin mix	Vitamin B12	۰/۵mg/L
	Thiamine HCL	۱۰۰mg/L
	Biotin	۰/۵mg/L
Trace elements	$Na_2C_{10}H_{14}O_8N_2.H_2O$(EDTA)	۴/۱۶g/L
	$FeCl_3.6H_2O$	۳/۱۵g/L
	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۱g/L
	$ZnSO_4.7H_2O$	۰/۰۲۲g/L
	$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۱g/L
	$MnCl_2.4H_2O$	۰/۱۸g/L
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۰۶g/L

غلظت‌های مختلف عامل محافظت‌کننده به‌میزان دو برابر غلظت نهایی تهیه شد. به‌عنوان مثال، برای تهیهٔ غلظت ۲/۵ درصد از دی متیل سولفوکساید، ۵ میلی‌لیتر از آن با ۱۰ میلی‌لیتر آب دریا با شوری ۳۵ قسمت در هزار که از قبل اتوکلاو شده مخلوط و سپس به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. تمامی ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از برند سیگما آلدریچ و با خلوص بالای ۹۹ درصد بودند.

۳.۲. آماده‌سازی نمونه‌های جلبکی

آماده‌سازی نمونه‌ها برای قرار گرفتن در شرایط فراسرد به این نحو انجام شد که ابتدا از سوسپانسیون جلبکی به‌دست آمده در مرحلهٔ قبل به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به یک کرایوتیوب اتوکلاو شده با حجم ۱/۸ میلی‌لیتر اضافه سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عامل محافظت‌کننده به آن اضافه شد. به‌منظور اطمینان از یکسان بودن تراکم اولیه در تیمارهای مختلف، پیش از اضافه نمودن عامل محافظت‌کننده به کرایوتیوب‌ها، برای هر تیمار از یک تکرار شمارش مجدد ریزجلبک‌ها صورت گرفت. غلظت نهایی عامل محافظت‌کننده در هر کرایوتیوب با غلظت‌های مورد نظر در تیمارهای آزمایشی برابر بود. زمان تعادل برای کرایوتیوب‌های حاوی سوسپانسیون جلبک/محافظت‌کننده مدت ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد (Salas-Leiva and Dupré, 2011) که این مرحله در دمای اتاق (۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و در تاریکی صورت گرفت. پس از گذشت زمان مذکور، نمونه‌ها ابتدا به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد سپس بلافاصله به دمای ۱۹۶- درجهٔ سانتی‌گراد (تانک ازت مدل SJ Cryo YDS-10) منتقل و به مدت ۳۰ روز در شرایط فراسرد نگهداری شدند. یخزدایی نمونه‌ها نیز با استفاده از حمام آب گرم با دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و در تاریکی انجام شد (Tzovenis *et al*., 2004). پس از آن، محتویات هر یک از کرایوتیوب‌ها با استفاده از محیط کشت به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۷ روز کشت داده شد (Salas-Leiva and Dupré, 2011). به‌طور همزمان، یک گروه نیز به‌عنوان گروه شاهد بدون هیچ گونه تیماری و از نمونهٔ اولیه کشت داده شد. در طول مدت کشت شمارش سلول‌ها در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ انجام شد. در ادامه به منظور بررسی‌های بیشتر، محتویات مربوط به هر کشت به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که

حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل بود منتقل و مجدداً به مدت ۷ روز و تحت شرایط گفته شده کشت داده شد.

۴.۲. تعیین رشد سلولی

رشد سلولی به‌واسطهٔ استفاده از یک لام شمارشی هموسیتومتر (مرین فیلد) با ابعاد (۷/۵×۳/۵×۰/۳ سانتی متر) مورد ارزیابی قرار گرفت. شمارش به صورت مستقیم و بدون استفاده از مادهٔ فیکس‌کننده روی سلول‌ها صورت گرفت و تعداد کل سلول‌ها با استفاده از رابطهٔ زیر به‌دست آمد (Chellappan *et al*., 2020):

=تعداد کل سلول در هر میلی‌لیتر
۱۰۰۰۰*[تعداد کل مربع‌ها×(تعداد مربع‌های شمارش شده/تعداد سلول‌های شمارش شده)]

نرخ رشد ویژه از فرمول زیر محاسبه شد (Chellappan *et al*., 2020):

$$\mu(day^{-1})= Ln\ (C_f/C_0)/t_f-t_0$$

که در این رابطه، μ: نرخ رشد ویژه، C_f: تراکم سلولی در انتهای آزمایش، C_0: تراکم سلولی در شروع آزمایش و t_f و t_0: زمان های مرتبط با هر کدام است. به‌منظور مقایسهٔ رشد بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد، از شاخص بقا (میزان قابلیت زنده‌مانی) ریزجلبک استفاده شد. شاخص بقا (V) نیز از طریق رابطهٔ زیر محاسبه شد (Cañavate and Lubian, 1995a,b; Salas-Leiva and Dupré, 2011):

$$V= [(C_0/C_i)*(C_7/(aC_0^b)]*100$$

که در این رابطه، C_0، C_7 و C_i به‌ترتیب عبارتند از تراکم سلولی در ابتدای آزمایش، تراکم سلولی در انتهای دورهٔ کشت و حداکثر تراکم اولیه (پیش از انجماد). ضرایب a و b نیز همزمان با آزمایش اصلی، در یک آزمایش جداگانه (که نتایج آن در این مطالعه ارائه نشده است) و از طریق تخمین منحنی رشد با استفاده از تراکم‌های اولیه متفاوت و براساس معادلهٔ رگرسیونی $Y=aX^b$ محاسبه شد (Y برابر است با تراکم نهایی و X برابر است با تراکم اولیه) (Cañavate and Lubian, 1995a,b; Salas-Leiva and Dupré, 2011).

پس از ارزیابی عملکرد رشد و بقای ریزجلبک در تیمارهای مختلف، سه تیماری که بهترین عملکرد را نشان دادند به‌منظور سنجش ترکیب بیوشیمیایی و پروفیل اسیدهای چرب انتخاب شدند. بدین‌منظور کشت تیمارهای مورد نظر در ارلن مایرهای ۵۰۰۰ میلی‌لیتری ادامه پیدا کرد. سنجش ترکیب بیوشیمیایی و پروفیل اسید چرب در سلول‌های *C. calcitrans* به‌منظور بررسی امکان ایجاد تغییر در سلول ریزجلبک در نتیجه قرار گرفتن در معرض ترکیبات محافظت کننده و دمای انجماد، صورت گرفت تا بتوان معیاری برای تصمیم‌گیری درمورد تأثیرات سوء احتمالی حفاظت فراسرد بر کیفیت کلی ریزجلبک داشت.

۵.۲. اندازه‌گیری ترکیب بیوشیمیایی جلبک

پروتئین کل با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. به این نحو که ۱۰۰ میلی‌گرم نمونهٔ خشک در بافر فسفات سائیده شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به‌منظور سنجش پروتئین، محلول رویی با معرف بردفورد و آب مقطر مخلوط و پس از ۵ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید و در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد میزان پروتئین تعیین شد. چربی کل به شیوهٔ سوکسله (Soxhlet, 1879) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین‌نظور ابتدا مقدار مشخصی از نمونهٔ خشک شده توزین شد و داخل استخراج کننده قرار گرفت. از ۲۰۰ میلی‌لیتر اتر دوپترول به‌عنوان حلال آلی استفاده شد. پس از استخراج و رسوب چربی در کف بالن، اختلاف وزن اولیه و نهایی بالن جمع‌آوری، اندازه‌گیری و از تقسیم آن بر مقدار نمونهٔ اولیه میزان چربی محاسبه شد. میزان کربوهیدارت نیز با استفاده از روش فنل سولفوریک (Dubois *et al*., 1956) اندازه‌گیری شد، بدین صورت که ابتدا میزان ۲۰ میلی‌گرم ریزجلبک خشک شده در دمای

۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد پس از توزین به‌همراه ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در یک هاون چینی متلاشی و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به فاز فوقانی میزان ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه و پس از ۶۰ دقیقه میزان جذب محلول در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد.

به‌منظور سنجش پروفیل اسید چرب در ریزجلبک *C. calcitrans*، ابتدا عصارهٔ ریزجلبکی با استفاده از مخلوط کلروفورم-متانول-آب (با نسبت ۲:۴:۱) استخراج شد. ترکیب حاصل مخلوط شده و سپس با افزودن آب و کلروفورم، به لایه‌های کلروفورم و آبی-متانولی جدا سازی شدند (Guermazi *et al*., 2010). لایهٔ کلروفورمی تخلیص شده و به‌منظور تعیین پروفیل اسید چرب مورد استفاده قرار گرفت، به این نحو که ابتدا اسیدهای چرب موجود در ۰/۱ گرم از عصاره با اضافه کردن میزان ۳ میلی‌لیتر هپتان و ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول متانولی هیدروکسید پتاسیم ۲ نرمال مخلوط شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه به هم زده و به آن اجازهٔ ته‌نشین شدن داده شد. در ادامه، لایهٔ رویی که حاوی اسیدهای چرب متیل استری محلول در هپتان بود به‌منظور آنالیز پروفیل اسیدهای چرب با استفاده از یک کروماتوگرافی گازی (CP 9001) مورد استفاده قرار گرفت. گاز حامل از نوع نیتروژن، فشار گاز ۰/۷۶ بار و ستون مورد استفاده از نوع مویین قطبی (CP wax 58) با طول ۲۵ متر و قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر و آشکارساز از نوع یونیزاسیون شعله‌ای (FID) بود. دمای قسمت تزریق در محدودهٔ ۱۸۰ تا ۲۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شد. نوع و میزان اسیدهای چرب نمونه‌های مورد آزمایش از مقایسهٔ منحنی‌های رسم شده و زمان بازداری مربوط به هر یک با منحنی‌های استاندارد و زمان بازداری آن به‌دست آمد (Mehrabi *et al*., 2018).

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، در ابتدا نرمال بودن داده‌ها به‌وسیلهٔ آزمون Shapiro-Wilk مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل بر روی داده‌ها از طریق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسهٔ میانگین بین تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد (Zar, 2010). در ابتدا اطلاعات خام در محیط Microsoft Excel 2010 مورد پردازش و سپس وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت.

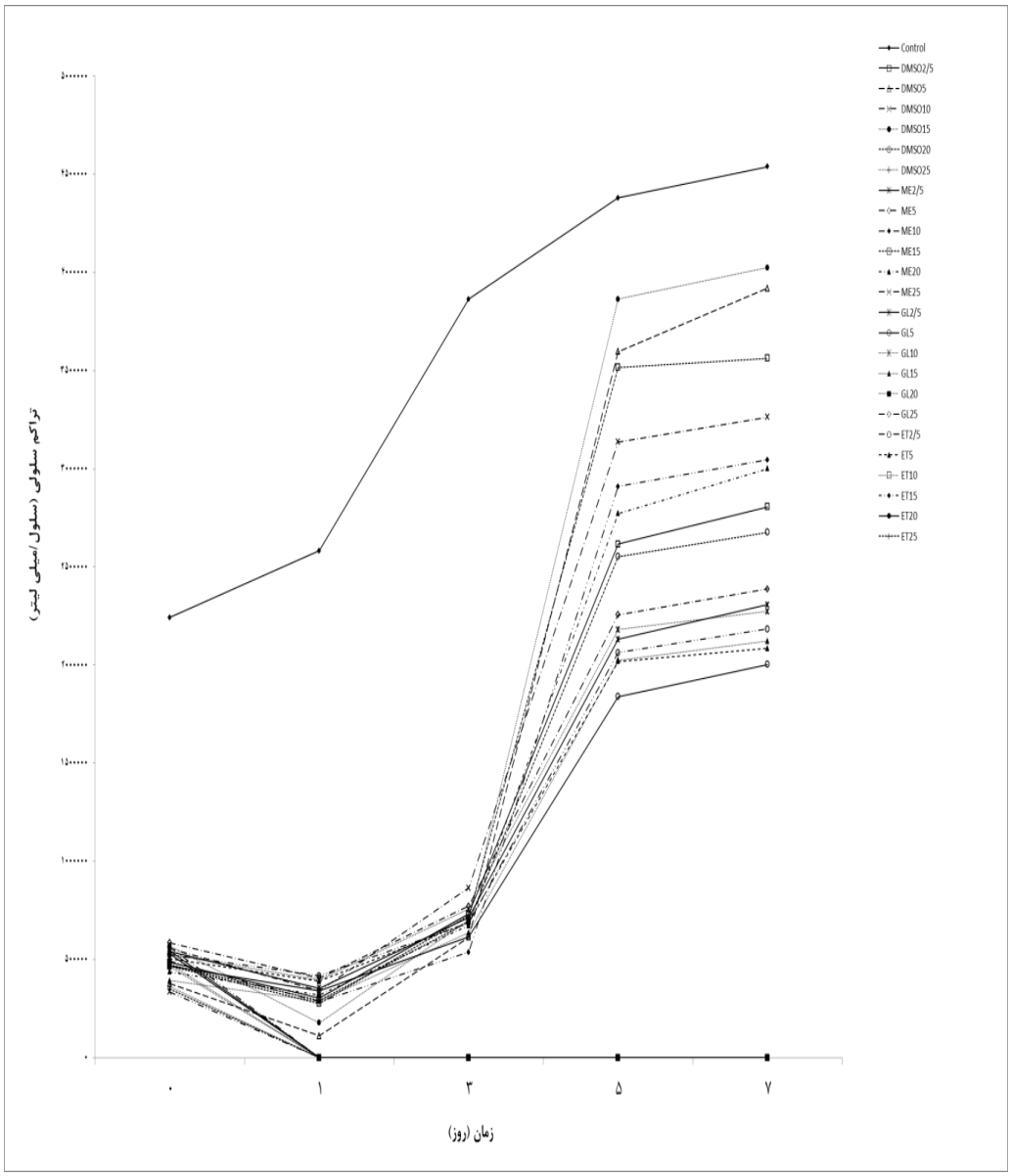
۳. نتایج

از ۲۴ تیمار مورد آزمایش، تنها در ۱۵ تیمار پس از خروج از حالت انجماد رشد مجدد و افزایش تراکم سلولی در سلول‌های ریزجلبکی مشاهده شد. ۹ تیماری که در آن سلول‌های ریزجلبکی پس از انجمادزدایی به رشد خود ادامه نداده و دچار مرگ سلولی شدند و عبارت بودند از: $DMSO_{25}$، ME_{25}، $GL_{2.5}$، GL_{20}، GL_{25}، ET_{10}، ET_{15}، ET_{20} و ET_{25} (شکل ۱ و جدول ۲). میانگین تراکم سلولی اولیه و تراکم نهایی در گروه شاهد به‌ترتیب $۲/۲۴۳\times۱۰^{۶}$ و $۴/۵۳۹\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود. حداقل و حداکثر تراکم سلولی اولیه در تیمارهای آزمایشی پس از انجمادزدایی به‌ترتیب $۲/۸۸\times۱۰^{۵}$ و $۶/۲۳\times۱۰^{۵}$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود. بیشترین میزان تراکم نهایی ($۴/۱۳\times۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت) در بین تیمارهای آزمایشی در تیمار $DMSO_{15}$ مشاهده شد (شکل ۱).

محاسبهٔ شاخص نرخ رشد ویژه نشان داد که پایین‌ترین میزان این شاخص در گروه شاهد و بالاترین میزان آن در تیمارهای گروه DMSO (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) و ME (۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) مشاهده شد (جدول ۲). شاخص بقا در تیمارهایی که پس از انجمادزدایی رشد مجدد سلول‌ها در آن‌ها مشاهده شد، در دامنه‌ای بین ۸/۲۶ تا ۲۸/۱۹ درصد قرار داشت. همچنان که در جدول ۲ نیز مشاهده می شود، بالاترین میزان زنده‌مانی به‌ترتیب

در تیمارهای $DMSO_{15}$، $DMSO_{10}$ و ME_{15} ثبت شد. به این ترتیب تیمارهایی که در ادامهٔ مطالعه برای سنجش میزان ترکیبات بیوشیمیایی و پروفیل اسیدهای چرب انتخاب شدند، سه تیمار $DMSO_{15}$، $DMSO_{10}$ و ME_{15} بودند.

نتایج حاصل از مقایسهٔ تجزیه ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک کتوسروس *C. calcitrans* بین ۳ تیمار آزمایشی منتخب و گروه شاهد نشان داد که تنها در شاخص چربی اندازه‌گیری شده بین دو گروه تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($P<۰/۰۵$) و در سایر شاخص‌های اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد، هر چند که در رابطه با پروتئین، کربوهیدرات و خاکستر یک روند کاهشی اندک از گروه شاهد به سمت تیمارهای آزمایشی مشاهده شد (جدول ۳). بین ۳ تیمار آزمایشی منتخب هیچ گونه اختلاف معنی‌داری در رابطه با شاخص‌های مربوط به ترکیب بیوشیمیایی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).



شکل ۱- نمودار رشد ریزجلبک *C. calcitrans* در طول دورهٔ کشت در تیمارهای مختلف آزمایش.

جدول ۲- نرخ رشد ویژه (μ در روز) و شاخص بقاء (درصد) ریزجلبک *C. calcitrans* در تیمارهای مختلف آزمایش (میانگین±انحراف معیار).

تیمار	نرخ رشد ویژه (μ در روز)	شاخص بقا (درصد)	تیمار	نرخ رشد ویژه (μ در روز)	شاخص بقا (درصد)
شاهد	۰/۱۴±۰/۰۰۲	-	$GL_{2.5}$	۰	۰
$DMSO_{2.5}$	۰/۳۵±۰/۰۲	۱۵/۶۱±۲/۶۳	GL_5	۰/۳۰±۰/۰۴	۱۰/۷۹±۳/۲۸
$DMSO_5$	۰/۴۷±۰/۰۳	۱۷/۳۲±۳/۲۷	GL_{10}	۰/۲۹±۰/۰۱	۱۳/۶۲±۲/۷۱
$DMSO_{10}$	۰/۳۵±۰/۰۱	۲۰/۴۵±۱/۹۱	GL_{15}	۰/۳۴±۰/۰۳	۹/۸۱±۲/۹۴
$DMSO_{15}$	۰/۳۹±۰/۰۲	۲۵/۷۸±۲/۸۳	GL_{20}	۰	۰
$DMSO_{20}$	۰/۳۵±۰/۰۳	۱۴/۵۶±۲/۶۱	GL_{25}	۰	۰
$DMSO_{25}$	۰	۰	$ET_{2.5}$	۰/۲۹±۰/۰۳	۱۳/۰۳±۲/۳۱
$ME_{2.5}$	۰/۲۹±۰/۰۱	۱۴/۱۰±۱/۳۷	ET_5	۰/۲۹±۰/۰۲	۱۱/۹۷±۲/۴۴
ME_5	۰/۲۸±۰/۰۱	۱۵/۶۸±۲/۳۳	ET_{10}	۰	۰
ME_{10}	۰/۳۷±۰/۰۳	۱۷/۱۶±۳/۹۱	ET_{15}	۰	۰
ME_{15}	۰/۴۱±۰/۰۱	۱۹/۰۶±۱/۸۲	ET_{20}	۰	۰
ME_{20}	۰/۳۹±۰/۰۲	۱۵/۲۲±۲/۸۱	ET_{25}	۰	۰
ME_{25}	۰	۰			

جدول ۳- ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک *C. calcitrans* (براساس درصد وزن خشک) در تیمارهای مختلف آزمایش (میانگین±انحراف معیار).

	گروه شاهد	$DMSO_{10}$	$DMSO_{15}$	ME_{15}
پروتئین	۲۷/۲±۰/۳ [a]	۲۵/۹±۰/۶ [a]	۲۶/۱±۰/۷ [a]	۲۵/۵±۰/۷ [a]
چربی	۱۳/۷±۰/۲ [a]	۱۶/۷±۰/۵ [b]	۱۶/۹±۰/۴ [b]	۱۶/۶±۰/۸ [b]
کربوهیدارت	۱۱/۸±۰/۱ [a]	۱۰/۳±۰/۷ [a]	۱۰/۰±۰/۵ [a]	۱۰/۶±۰/۷ [a]
خاکستر	۴۲/۹±۰/۵ [a]	۴۲/۰±۰/۷ [a]	۴۲/۳±۰/۶ [a]	۴۲/۴±۰/۹ [a]

* حروف انگلیسی در بالای اعداد در هر ردیف با حروف یکسان نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دارند ($P>0/05$).

در جدول ۴، نتایج حاصل از سنجش پروفیل اسیدهای چرب ریزجلبک *C. calcitrans* در تیمارهای منتخب و گروه شاهد با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفته است. هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین دو گروه و همچنین بین تیمارهای آزمایشی با یکدیگر مشاهده نشد ($P>0/05$)، در مجموع، میزان اسیدهای چرب اشباع در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد یک افزایش بسیار اندک و در مجموع میزان اسیدهای چرب غیر اشباع یک کاهش بسیار اندک را نشان داد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

طبق گزارش‌های موجود، دیاتومه‌ها مشکل‌سازترین گونه‌های ریزجلبکی در بحث نگهداری در نیتروژن مایع محسوب می شوند (Day, 2007). Tessarolli و همکاران (۲۰۱۷)، در مطالعهٔ خود متوجه شدند که گونه‌های مربوط به ردهٔ دیاتومه‌ها کم‌ترین میزان تطابق با شرایط حفاظت فراسرد در بین سایر گونه‌ها را از خود نشان می‌دهند، به‌نحوی که پس از خروج از حالت منجمد میزان زنده‌مانی این گونه‌ها صفر بود. نکتهٔ جالب توجه در مطالعهٔ حاضر این بود که بیشتر تیمارهایی که دچار مرگ سلولی شدند آن‌هایی بودند که سطوح بالاتر عوامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی را دریافت نمودند. مطالعات مختلف نشان‌دهندهٔ سمیت عوامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی در سطوح بالاتر برای میکروارگانیسم‌هاست (Cañavate and Lubian, 1994; Fuller, 2004; Wolkers and Oldenhof, 2021).

جدول ۴- پروفیل اسیدهای چرب ریزجلبک *C. calcitrans* (براساس درصد از کل) در تیمارهای مختلف آزمایش (میانگین±انحراف معیار)

	گروه شاهد	$DMSO_{10}$	$DMSO_{15}$	ME_{15}
اسید (C14:0)	۱۳/۳۳±۰/۰۵	۱۳/۱۲±۰/۰۹	۱۳/۳۶±۰/۱۱	۱۳/۲۱±۰/۰۸
اسید (C16:0)	۱۹/۹۷±۰/۰۲	۲۰/۰۱±۰/۱۰	۲۰/۰۷±۰/۱۴	۱۹/۹۲±۰/۱۲
اسید (C16:1)	۳۶/۳۱±۰/۱۱	۳۵/۹۸±۰/۱۰	۳۵/۸۵±۰/۱۱	۳۵/۹۵±۰/۱۱
اسید (C17:0)	۲/۹۴±۰/۰۷	۲/۹۷±۰/۱۱	۳/۰۲±۰/۰۹	۲/۹۲±۰/۰۸
اسید (C18:0)	۲/۷۸±۰/۰۴	۲/۶۴±۰/۰۸	۲/۵۱±۰/۰۸	۲/۸۰±۰/۰۷
اسید (C18:1)	۲/۰۵±۰/۱۲	۲/۳۱±۰/۰۹	۲/۳۹±۰/۰۷	۲/۳۲±۰/۰۷
اسید (C18:2)	۱/۶۷±۰/۰۷	۱/۶۹±۰/۰۸	۱/۷۰±۰/۰۶	۱/۷۵±۰/۰۹
اسید (C18:3)	۱/۸۳±۰/۰۴	۱/۹۴±۰/۰۶	۱/۹۹±۰/۱۰	۱/۹۴±۰/۱۱
اسید (C20:0)	۰/۴۶±۰/۰۳	۰/۵۸±۰/۰۱	۰/۵۲±۰/۰۴	۰/۶۸±۰/۰۵
اسید (C20:4)	۵/۴۰±۰/۰۷	۵/۳۳±۰/۰۸	۵/۲۷±۰/۱۲	۵/۲۵±۰/۰۷
اسید (C20:5)	۸/۴۳±۰/۰۷	۸/۳۵±۰/۱۲	۸/۳۲±۰/۰۷	۸/۳۱±۰/۱۳
اسید (C22:0)	۱/۶۹±۰/۰۱	۱/۹۳±۰/۰۳	۱/۸۷±۰/۰۳	۱/۸۴±۰/۰۵
اسید (C22:6)	۱/۱۱±۰/۰۲	۱/۰۷±۰/۰۴	۱/۰۷±۰/۰۶	۱/۰۲±۰/۰۶
اسید (C24:0)	۱/۰۸±۰/۰۳	۱/۲۲±۰/۰۵	۱/۱۴±۰/۰۹	۱/۱۷±۰/۰۶
کل SFA	۴۲/۲۵±۰/۰۶	۴۲/۴۷±۰/۰۹	۴۲/۴۹±۰/۱۰	۴۲/۵۴±۰/۱۰
کل MUFA	۳۸/۳۶±۰/۱۱	۳۸/۲۹±۰/۱۰	۳۸/۲۴±۰/۰۹	۳۸/۲۷±۰/۰۹
کل PUFA	۱۸/۴۴±۰/۰۶	۱۸/۳۸±۰/۰۸	۱۸/۳۵±۰/۰۹	۱۸/۲۷±۰/۱۰

استفاده از غلظت‌های بالاتر از ۱۵ درصد از ترکیباتی همچون DMSO، ME، GL و ET به‌عنوان محافظت‌کننده می تواند با توجه به داشتن اثرات سمی منجر به آسیب به سلول ریزجلبک‌ها شده و میزان زنده‌مانی سلول را پس از خروج از انجماد به‌شدت کاهش دهد (Chellappan *et al*., 2020). البته Salas-Leiva و Dupré (۲۰۱۱) در مطالعهٔ خود گزارش کردند که جلبک کتوسروس *C. calcitrans* دارای نوعی مقاومت طبیعی به ترکیباتی همچون DMSO در سیتوپلاسم خود است. این نوع از مقاومت طبیعی به عوامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی و ترکیبات هایپراسموتیک در سایر دیاتومه‌ها از همین جنس نظیر جلبک *Chaetoceros castracanei* و برخی دیگر از گونه‌های این جنس نیز به اثبات رسیده است (Mock and Thomas, 2005; Houdan *et al*., 2005)، که احتمالاً به تجمع آمینواسیدهای آزاد (عمدتاً پرولین) و DMSP (یک پیش‌ساز DMSO) ارتباط پیدا می‌کند. همچنین، در مطالعاتی که روی گونه‌های مختلف ریزجلبک‌ها صورت گرفته مشخص شده است که عدم استفاده و یا استفاده اندک از عوامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی در فرآیند انجماد عمدتاً منجر به مرگ سلول در فرآیند انجماد می‌شود (Cañavate and Lubian, 1995a,b; Cordero and Voltolina, 1997; Gwo *et al*., 2005). مشخص شده است که حفاظت فراسرد گونهٔ جلبک *C. calcitrans* در غیاب عامل محافظت‌کننده‌ای مثل DMSO احتمالاً به‌دلیل دهیدرا سیون فزاینده‌ای که در سطح داخلی سلول به‌واسطهٔ شکل‌گیری کریستال‌های یخ خارج سلولی رخ می‌دهد، است که در نهایت سبب مرگ سلول می‌شود (Day and Harding, 2007). با توجه به نتایج مطالعهٔ حاضر می‌توان بیان کرد مقاومت سلول های جلبک *C. calcitrans* به DMSO و ME به‌عنوان عامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی نسبت به دو عامل

دیگر بیشتر است. در پژوهشی که اخیراً منتشر شده است، محققین نشان داده‌اند که استفاده از DMSO در سطح ۵ درصد می‌تواند بهترین نتیجه را در حفاظت فراسرد گونه‌ای از سنودسموس *Scenedesmus* spp. به‌دنبال داشته باشد (Prieto-Guevara *et al*., 2023).

براساس مطالعهٔ Fenwick و Day (۱۹۹۲)، استفاده از GL نسبت به DMSO به‌عنوان محافظت‌کنندهٔ سرمایی، نتیجهٔ بهتری در انجماد ریزجلبک تتراسلمیس *Tetraselmis* به‌دست می‌دهد، که این مسئله برخلاف نتایج مطالعهٔ حاضر است. دلیل اصلی این عدم تطابق نتایج را باید در تفاوت های بین گونه‌ای و همچنین شیوه‌های بکارگیری حفاظت فراسرد جستجو نمود. تحقیقات نشان داده است که می‌توان از DMSO به میزان ۱۵ در صد برای نگهداری چندین گونهٔ ریزجلبک دریایی استفاده نمود (Cañavate and Lubian, 1995a). Rhodes و همکاران (۲۰۰۶)، گزارش نمودند که استفاده از DMSO به میزان ۱۰ تا ۱۵ درصد می‌تواند به‌طور موفقیت‌آمیزی برای انجماد فراسرد ریزجلبک *C. muelleri* مورد استفاده قرار گیرد، هر چند در این رابطه اعداد و ارقامی ارائه نشده است. نتایج مطالعات مذکور کاملاً مطابق با نتایج حاصل از این مطالعه است. در مطالعه‌ای مشخص شد که جلبک کلامیدوموناس *Chlamydomonas reinhardtii* را می‌توان تنها با ME به‌عنوان محافظت‌کنندهٔ سرمایی تحت شرایط حفاظت فراسرد نگهداری نمود (Scarbrough and Wirschell, 2016). Yang و Li (۲۰۱۶)، در آزمایش خود روی این گونه نیز نشان دادند که ME قادر است میزان تخریب‌پذیری لیپیدهای دیوارهٔ سلولی را در طی فرآیند انجماد فراسرد کاهش دهد. da Silva و همکاران (۲۰۲۰)، با بررسی عوامل محافظت‌کنندهٔ مختلف در حفاظت فراسرد ریزجلبک *Chlorella vulgaris* گزارش نمودند که در این گونه، بهترین عملکرد مربوط به ME ۵ درصد است. یکی از دلایل احتمالی دیگری که می‌توان به کاهش بازدهی کار در زمان استفاده از عوامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی به جز DMSO و ME نسبت داد، سرعت نفوذپذیری بالاتر این ترکیبات در مقایسه با ترکیباتی همچون GL یا ET به داخل سلول است (Chellappan *et al*., 2020). از جمله دلایل این امر را می‌توان به وزن مولکولی پایین‌تر DMSO و ME اشاره کرد (Abreu *et al*., 2012). در این رابطه، مسئلهٔ تأثیر زمان تعادل در نظر گرفته شده از اهمیت بالایی برخوردار است، به‌نحوی که در زمان‌های تعادل کوتاه، مشابه آنچه در این مطالعه اتفاق افتاد، ترکیباتی همچون DMSO و ME سریع‌تر به داخل سلول نفوذ نموده و از راه‌های مختلفی سبب افزایش قابلیت بقای سلول می‌شوند، از جمله پایین آوردن دمای انجماد آب درون سلولی (Franks, 1985)، به حداقل رساندن کاهش حجم سلول در طی فرآیند انجماد (Cañavate and Lubian, 1995a)، و یا تغییر خصوصیات غشای سلول (Santarius, 1996). اگرچه میزان این نفوذپذیری تحت تأثیر عوامل بسیاری همچون اندازهٔ سلول و نوع آن، میزان تراوایی غشای سلولی، و میزان لیپید غشا قرار دارد (Salas-Leiva and Dupré, 2011). Youn و Hur (۲۰۰۹)، گزارش نمودند که گونه‌های ریزجلبکی دارای دیوارهٔ سلولی ضخیم‌تر و فاقد تاژک را می‌توان به‌طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از DMSO به‌عنوان محافظت‌کنندهٔ سرمایی تحت شرایط فراسرد نگهداری نمود، که این مسئله نیز تا حدودی می‌تواند تأییدکننده دلیل نتایج حاصل از پژوهش حاضر باشد. آن‌ها همچنین بیان کردند که سن کشت در هنگام در معرض قرارگیری ریزجلبک با ترکیبات محافظت‌کنندهٔ سرمایی، به‌عنوان یک عامل مهم در تعیین میزان زنده‌مانی پس از خروج از حالت انجماد در ریزجلبک‌ها می‌تواند مطرح باشد.

در مطالعهٔ Salas-Leiva و Dupré (۲۰۱۱) که روی گونهٔ کتوسروس *C. calcitrans* انجام شد، مشخص کرد که رشد سلول‌هایی که در معرض انجماد قرار نگرفته‌اند فاقد فاز تطابق‌پذیری‌اند و در صورتی که این فاز وجود داشته باشد بسیار کوتاه است. در مطالعهٔ Phatarpekar و همکاران (۲۰۰۰) نیز نتایج مشابهی ارائه شد. در مطالعهٔ حاضر نیز در سلول‌هایی که در معرض فرآیند انجماد قرار

نگرفته بودند چنین مسئله‌ای مشاهده شد. Salas-Leiva و Dupré (۲۰۱۱) این مسئله را ناشی از تولید مثل سلولی سریع‌تر این گونه نسبت به سایر گونه‌های ریزجلبکی دانسته‌اند. اما بنا به دلایلی که برای نویسندگان ناشناخته مانده است در مورد سلول هایی که پس از فرآیند انجمادزدایی مجدداً کشت داده شدند، یک دورهٔ تطابق‌پذیری حداقل یک روزه مشاهده شد. البته می‌توان وجود این بازهٔ زمانی را به تأثیر احتمالی فرآیند انجماد روی سلول و ایجاد وقفه در شروع فرآیند تقسیم سلولی نسبت داد. ریزجلبک‌های نانوکلروپسیس *Nannochloropsis oculata* منجمد شده با ME به روش حفاظت فراسرد در ۶ روز اول بعد از خروج از حالت منجمد هیچ رشدی نشان ندادند، اما پس از گذشت این مدت، رشد بهبود یافت ولی در پایان مدت آزمایش تراکم سلولی در این گروه پایین‌تر از گروه شاهد (که فقط با متانول تیمار شده اما منجمد نشده بودند) بود (Youn and Hur, 2009). طولانی شدن فاز تأخیر در نمودار رشد جلبک دریایی آکاریوچلوریس *Acaryochloris marina* خارج شده از حالت انجماد، به حدود ۴۰۰ ساعت، به‌واسطهٔ استفاده از DMSO به‌عنوان محافظت‌کننده گزارش شده است (Iwamoto *et al*., 2012). کینتیک رشد ریزجلبک نانوکلوروپسیس *Nannochloropsis* که در معرض ترکیبات محافظت‌کنندهٔ سرمایی قرار گرفتند نسبت به گروه کنترل، فاز تأخیر (لگ) طولانی‌تری را نشان داد، دلیل این امر احتمالاً نیاز به زمان بیشتر برای سازگاری متابولیکی در این ریزجلبک گزارش شده است (Chellappan *et al*., 2020). Salas-Leiva و Dupré (۲۰۱۱) در مطالعهٔ خود یک رابطهٔ معکوس بین شاخص نرخ رشد ویژه و تراکم اولیهٔ سلولی را در چلبک کتوسروس *C. calcitrans* در زمان تلقیح یافتند، به این نحو که هر چه تراکم اولیهٔ سلول‌ها پایین‌تر باشد مقادیر نرخ رشد ویژه بالاتر خواهد بود، که این موضوع را تا حدود زیادی قابل پیش‌بینی دانستند، چرا که مسئلهٔ رشد تحت تأثیر شاخص‌هایی همچون کاهش مواد مغذی در محیط کشت، تغییرات pH، کاهش میزان CO_2، و کاهش میزان نفوذ نور قرار دارد (Fogg and Tun, 1960). البته در مطالعهٔ مذکور دامنهٔ اعداد ثبت شده برای شاخص نرخ رشد ویژه بسیار گسترده‌تر (۰/۷ تا ۱/۶۷) از نتایج به‌دست آمده از مطالعهٔ حاضر (۰/۲۵ تا ۰/۴۹) بود، که این اختلاف نتایج را می‌توان ناشی از تفاوت در نوع، میزان و دمای عوامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی، مدت زمان تعادل و تفاوت در شیوهٔ انجماد دانست.

حفاظت فراسرد ریزجلبک‌ها با مشکلات بسیاری همراه است که استفاده گسترده از این فناوری را به شدت تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (Abreu *et al*., 2012). زمانی که سلول های ریزجلبکی در معرض انجماد، نگهداری در دماهای بسیار پایین و انجمادزدایی قرار می‌گیرند، بروز تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در آن‌ها پدیده‌ای اجتناب‌ناپذیر خواهد بود که می تواند در نهایت سبب بروز آسیب و کاهش بقای سلول‌ها شود (Taylor and Fletcher, 1999). حداکثر میزان شاخص بقای اندازه‌گیری شده در این مطالعه ۲۸/۱۹ درصد و مربوط به تیمار $DMSO_{15}$ بود. در مجموع نیز بالاترین میزان این شاخص در تیمارهای گروه DMSO و ME ثبت شد. حداکثر شاخص بقای اندازه‌گیری شده توسط Salas-Leiva و Dupré (۲۰۱۱) در ریزجلبک کتوسروس *C. calcitrans* که تحت شرایط انجماد در حضور DMSO قرار گرفته بود، ۳۴/۹ درصد بود. این میزان در مطالعاتی که روی انجماد گونه‌های ریزجلبکی غیر دیاتومه انجام گرفته است گاهی تا ۱۰۰ درصد را نیز ثبت کرده است، در حالی که میزان شاخص بقای اندازه‌گیری شده برای گونه‌های دیاتومه نظیر جلبک *C. gracilis* زیر ۴۰ درصد گزارش شده است (Cañavate and Lubian, 1995b, 1997a, 1997b). به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای که روی ریزجلبک *C. calcitrans* انجام گرفت، مشخص شد که تحت تیمار DMSO به میزان ۵ درصد، میزان بقای آن در دامنهٔ ۱۵ تا ۳۵ درصد است (Salas-Leiva *et al*., 2016). این میزان از تفاوت در شاخص بقا بین دیاتومه‌ها و سایر گونه‌های ریزجلبکی نشان می‌دهد که در مکانیسم‌های فیزیولوژیک دیاتومه‌ها در پاسخ به استرس‌های اسمزی

احتمالاً وجود یک دیوارهٔ سلیکونی سخت در این موجودات نقش مهمی در فرآیند انجماد بازی می‌کند، چرا که می‌تواند سبب ایجاد شکنندگی در سلول‌هایی که تحت فرآیند انجماد قرار گرفته‌اند و پارگی آن‌ها در طی فرآیند یخزدایی شود. مرگ سلولی ناشی از این شکنندگی در گونهٔ جلبک کتوسروس *C. calcitrans* نسبت به سایر گونه‌های دیاتومه می‌تواند کمتر باشد که دلیل آن به نسبت سطح/حجم بالای این گونه ارتباط دارد، چرا که می‌تواند به کاهش شکل‌گیری یخ داخل سلولی کمک کند (Salas-Leiva and Dupré, 2011). Salas-Leiva و همکاران (۲۰۱۶)، گزارش نمودند که استفاده از DMSO به‌عنوان عامل محافظت‌کننده در حفاظت فراسرد ریزجلبک *C. calcitrans* علی‌رغم آن که می‌تواند به‌طور موفقیت‌آمیزی سبب حفظ این گونه برای طولانی مدت در نیتروژن مایع شود، اما میزان زنده‌مانی و رشد سلول‌ها پس از خروج از حالت انجماد پایین خواهد بود. Kihika و همکاران (۲۰۲۲)، با مطالعهٔ روی حفاظت فراسرد گروهی از دینوفلاژله‌ها متوجه شدند که افزایش میزان شوری محیط می‌تواند سبب افزایش میزان شاخص بقای بسیاری از آن‌ها در کشت مجدد پس از انجمادزادیی شود.

نتایج حاصل از سنجش ترکیبات بیوشیمیایی در این مطالعه نشان داد که تنها در شاخص چربی اندازه‌گیری شده در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار وجود دارد و در سایر شاخص‌ها (پروتئین، کربوهیدرات و خاکستر) اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. به‌طور مشابه، Salas-Leiva و همکاران (۲۰۱۶)، گزارش نمودند که انجماد فراسرد، هیچ گونه تغییر معنی‌داری در میزان پروتئین و کربوهیدرات سلول ریزجلبک کتوسروس *C. calcitrans* ایجاد نمی‌کند. Kapoore و همکاران (۲۰۱۹) با مطالعه روی حفاظت فراسرد ریزجلبک کلرلا *Chlorella vulgaris* نشان دادند که نگهداری این میکروارگانیسم در شرایط انجماد می‌تواند سبب بروز تغییرات فراوان در ترکیب بیوشیمیایی آن شود. Esquivel و همکاران (۱۹۹۳)، با مطالعه روی چند دیاتومه نشان دادند که در ریزجلبک کتوسروس *Chaetoceros* spp. که تحت شرایط حفاظت فراسرد قرار گرفته است مقادیر پروتئین، کربوهیدرات و چربی نسبت به گروه شاهد دچار کاهش معنی‌دار می‌شود. Nuñes-Zarco و Sánchez-Saavedra (۲۰۱۱)، نشان دادند که نگهداری دیاتومه‌های بنتیک *Navicula incerta* و *Amphiprora paludosa* در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد می‌تواند سبب بروز تغییرات در میزان چربی و مواد آلی شود. همین محققین در مطالعهٔ دیگری نشان دادند که نگهداری ناویکولا *N. incerta* در دماهای پایین در تاریکی منجر به افزایش میزان چربی می‌شود (Sanchez-Saavedra and Nuñez-Zarco, 2012). اثبات این مسئله که در سلول‌های گیاهی نگهداری شده در دماهای پایین، میزان لیپید در غشای سلولی به‌منظور جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی افزایش می‌یابد (Molina Grima *et al*., 1994; Salas-Leiva *et al*., 2016; Demirel *et al*., 2016) در کنار نتایج سایر مطالعات، می‌تواند تا حدودی نشان‌دهنده دلایل احتمالی افزایش میزان چربی در تیمارهای آزمایشی باشد. به‌طور کلی طبق مطالعات Brown و همکاران (۱۹۹۷)، میزان پروتئین، چربی و کربوهیدرات دیاتومه‌ها به‌ترتیب در دامنهٔ ۱۰±۳۰ در صد، ۵±۱۴ در صد، و ۳±۷ درصد قرار می‌گیرد، که البته تفاوت هایی در برخی قسمت‌ها با نتایج حاصل از این پژوهش دارد. این تفاوت‌ها را می‌توان به نوع گونه، نحوهٔ کشت، نوع محیط کشت، روش سنجش ترکیب بیوشیمیایی و ... نسبت داد.

سنجش پروفیل اسیدهای چرب در مطالعهٔ حاضر هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین دو گروه و همچنین بین تیمارهای آزمایشی با یکدیگر از این جهت نشان نداد، اگر چه در مجموع میزان اسیدهای چرب اشباع در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد یک افزایش بسیار اندک و میزان اسیدهای چرب غیر اشباع یک کاهش بسیار اندک مشاهده شد. به‌طور مشابه، Molina Grima و همکاران (۱۹۹۴)، با مطالعه روی روش‌های مختلف نگهداری جلبک ایزوکرایسیس *Isochrysis galbana* نشان دادند که انجماد این ریزجلبک هیچ گونه تأثیر معنی‌داری بر پروفیل اسیدهای چرب آن

ندارد. همچنین، Guermazi و همکاران (۲۰۱۰)، با مطالعه روی حفاظت فراسرد سه گونهٔ ریزجلبکی *Chlorella vulgaris*، *Isochrysis galbana* و *Dunaliella salina* تحت تیمار DMSO، هیچ گونه تغییر معنی‌داری در پروفیل اسیدهای چرب مشاهده نکردند. نتایج مشابهی نیز در مطالعه دیگری که روی دیاتومه *Chaetoceros* sp. انجام شد به‌دست آمد (Esquivel *et al.*, 1993). در مطالعه‌ای کلی روی میکروارگانیسم‌ها مشخص شده است که تغییر در پروفیل اسیدهای چرب پدیده‌ای وابسته به دماست (Morgan-Kiss *et al.*, 2006). تغییرات اندکی که در میزان برخی اسیدهای چرب در تیمارهای آزمایشی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد احتمالاً ناشی از تغییرات دمایی است که تیمارهای آزمایشی در طول مراحل مختلف پژوهش با آن روبه‌رو شده‌اند.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که حفاظت فراسرد ریزجلبک کتوسروس *C. calcitrans* در شرایطی می‌تواند موفقیت‌آمیز باشد که از DMSO در سطح ۵ تا ۱۵ درصد و یا ME در سطح ۱۰ تا ۱۵ درصد به‌عنوان عامل محافظت‌کنندهٔ سرمایی استفاده شود. بهترین نتایج نیز در زمان استفاده از DMSO در سطح ۱۵ درصد به‌دست می‌آید. در عین حال، با توجه به این که مرور منابع موجود نشان می‌دهد مطالعات اندکی تا به امروز در این زمینه در ایران انجام شده است و احتمالاً بسیاری از پارامترها نیز در این رابطه مورد ارزیابی قرار نگرفته است، پیشنهاد می‌گردد مطالعات جدیدتر و بیشتری در مورد حفاظت فراسرد گونه‌های تجاری ریزجلبک‌ها خصوصاً گونهٔ کتوسروس *C. calcitrans* صورت گیرد.

۵. منابع

References

Abreu, L., Borges, L., Marangoni, J., Abreu, P.C., 2012. Cryopreservation of some useful microalgae species for biotechnological exploitation. *Journal of Applied Phycology* 24, 1579-1588. DOI: 10.1007/s10811-012-9818-0

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2), 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999

Brown, M., Jeffrey, S., Volkman, J., Dunstan, G., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315-331. DOI: 10.1016/S0044-8486(96)01501-3

Cañavate, J.P., Lubian, L.M., 1994. Tolerance of six marine microalgae to the cryoprotectants dimethyl sulfoxide and methanol. *Journal of Phycology* 30, 559-565. DOI: 10.1016/0044-8486(95)01056-4

Cañavate, J.P., Lubian, L.M., 1995a. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Marine Biology* 124, 325-334. DOI: 10.1007/BF00347136

Cañavate, J.P., Lubian, L.M., 1995b. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. *Aquaculture* 136, 277-290. DOI: 10.1016/0044-8486(95)01056-4

Cañavate, J.P., Lubian, L.M., 1997a. Effects of slow and rapid warming on the cryopreservation of marine microalgae. *Cryobiology* 35, 143-149. DOI: 10.1006/cryo.1997.2031

Cañavate, J.P., Lubian, L.M., 1997b. Effects of culture age on cryopreservation of marine microalgae. *European Journal of Phycology* 32(1), 87-90, DOI: 10.1080/09541449710001719405.

Chellappan, A., Thangamani, P., Markose, S., Thavasimuthu, C., Thangaswamy, S., Mariavincent, M., 2020. Long-term preservation of micro-algal stock for fish hatcheries. *Aquaculture Reports* 17(100329), 1-6. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100329

Cordero, B., Voltolina, D., 1997. Viability of mass algal cultures preserved by freezing and freeze-drying. *Aquaculture Engineering* 16, 205-211. DOI: 10.1016/S0144-8609(97)00001-0

da Silva, H.R., da Silva, F.C.P., Prete, C.E.C., 2020. Cryopreservation of *Chlorella vulgaris* using different cryoprotectant agents. *Journal of Agricultural Science* 12(7), 75-81. DOI: 10.5539/jas.v12n7p75

Day, J., Harding, K., 2007. Cryopreservation of algae. In: B.M. Reed (ed.). Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, New York, pp. 95-116. DOI: 10.1007/978-0-387-72276-4

Day, J.G., 2007. Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria. In: *Cryopreservation and freeze-drying protocols*, 141-151. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_10

Demirel, Z., Demirkaya, C., Imamoglu, E., Conk Dalay, M. 2016. Diatom cultivation and lipid productivity for non-cryopreserved and cryopreserved cells. *Agronomy Research* 14(4), 1266-1273.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilto, J.K., Rebers P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substrates. *Analytical Chemistry* 28, 350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017

Esquivel, B., Lobina, D., Sandoval, F. 1993. The biochemical composition of two diatoms after different preservation techniques. *Comparative Biochemistry & Physiology* 105B(2), 369-373. DOI: 10.1016/0305-0491(93)90243-

Fayazi Atdotan, E., Rajabi Islami, H., 2015. Comparison of some freshwater green algae conservation using the of freeze-drying and cryopreservation methods. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 24(2), 103-114. (in Persian). DOI: 10.22092/ISFJ.2015.103143

Fenwick, C., Day, J.G., 1992. Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes. *Journal of Applied Phycology*, 4: 105-109. DOI: 10.1007/BF02442458

Fogg, G.E., Tun, T., 1960. Interrelations of photosynthesis and assimilation of elementary nitrogen in blue-green algae. *Proceeding of Royal Society London*, Ser. B., 153, 111-127. DOI: 10.1098/rspb.1960.0090

Foo, S.C., Mok, C.Y., Ho, S.Y., Khong, N.M.H., 2023. Microalgal culture preservation: Progress, trends and future developments. *Algal Researc*, 71(103007), 1-16. DOI: 10.1016/j.algal.2023.103007

Franks, F., 1985. Biophysics and biochemistry at low temperatures. Cambridge University Press, New York, p 210.

Fuller, B. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo-Letters* 2, 375-388.

Guermazi, W., Sellami-Kammoun, A., Elloumi, J., Drira, Z., Aleya, L., Marangoni, R., Ayadi, H., Maalej, S., 2010. Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me_2SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile. *Journal of Thermal Biology* 35(4), 175-181. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2010.03.001

Guillard, R., Rhyther, J., 1962. Studies on marine planktonic diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology* 8, 229-239. DOI: 10.1139/m62-029

Gwo J.C., Chiu J.Y., Chou C.C., Cheng H.Y., 2005. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology* 50, 338-343. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2005.02.001

Heesch, S., Day, J.G., Yamagishi, T., Kawai, H., Muller, D.G., Kupper, F.C., 2012. Cryopreservation of the model alga *Ectocarpus* (Phaeophyceae). *Cryo Letters* 33, 327-336.

Holm-Hansen, O. 1963. Viability of blue-green and green algae after freezing. *Physiologia Plantarum* 16, 530-540. DOI:10.1111/j.1399-3054.1963.tb08330.x

Houdan, A., Véron, B., Claquin, P., Lefebvre, S., Poncet, J., 2005. Cryopreservation of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi* (Haptophyta, Prymnesiophyceae). *Journal of Applied Phycology* 17, 413- 422. DOI: 10.1007/s10811-005-0065-5

Iwamoto, K., Fukuyo, S., Okuda, M., Kobayashi, M., Shiraiwa, Y., 2012. Cryopreservation of the chlorophyll d-containing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Procedia Environmental Sciences* 15, 118-125. DOI: 10.1016/j.proenv.2012.05.016

Kapoore, R.V., Huete-Ortega, M., Day, J.G., Okurowska, K., Slocombe, S.P., Stanley, M.S., Vaidyanathan, S., 2019. Effects of cryopreservation on viability and functional stability of an industrially relevant alga. *Scientific Reports* 9(2093), 1-12. DO: 10.1038/s41598-019-38588-6

Kihika, J.K., Wood, S.A., Rhodes, L., Smith, K.F., Miller, M.R., Pochon, X., Thompson, L., Butler, J., Schattschneider, J., Oakley, C., Ryan, K.G., 2022. Cryopreservation of six *Symbiodiniaceae* genera and assessment of fatty acid profiles in response to increased salinity treatments. *Scientific Reports* 20(12408), 1-15. DOI: 10.1038/s41598-022-16735-w

Krichnavarruk, S., Loataweesup, W., Powtongsook, S., Pavasant, P., 2005. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 105: 91-98. DOI:10.1016/j.cej.2004.10.002

Leynaert, A., Fardel, C., Beker, B., Soler, C., Delebecq, G., Lemercier, A., Pondaven, P., Duran, P.E., Heggarty, K., 2018. Diatom frustules nanostructure in pelagic and benthic environments. *Silicon* 10(6), 2701-2709. DOI: 10.1007/s12633-018-9809-0

McGrath, M.S., Daggett, P.M., Dilworth., S. 1978. Freeze-drying of algae: chlorophyta and chrysophyta. *Journal of Phycology*, 14(4): 521-525. DOI:10.1111/j.1529-8817.1978.tb02480.x

Mehrabi, F., Jafarpour, S.A., Nematzadeh, G-A., 2018. Comparison of different cell-wall disruption and fatty acid extraction from *Dunaliella Salina* microalgae. *Research and Innovation in Food Science and Technology* 7(2), 167-176. (in Persian). DOI: 10.22101/JRIFST.2018.07.17.724

Mock, T., Thomas, D., 2005. Recent advances in sea ice microbiology. *Environmental Microbiology* 7, 605-619. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00781.x

Molina Grima, E., Sanchez Perez, J.A., Garcia Camacho, F., Acien Fernandez, F.G., Lopez Alonso, D., Segura del Castillo, C.I. 1994. Preservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile. *Aquaculture*. 123, 377-385. DOI: 10.1016/0044-8486(94)90072-8

Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., Huner, N.P.A., 2006. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 222-252. DOI: 10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006

Nakanishi, K., Deuchi, K., Kuwano, K., 2012. Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage. *Journal of Applied Phycology* 24, 1381–1385. DOI:10.1007/s10811-012-9790-8

Nugroho, W.S.K., Kim, D-A., Kim, D-W., Koo, B-W., Hur, Y.B., Kim, H.J., 2016. Current advances in cryopreservation of microalgae. *Journal of Marine Life Science* 1(1), 70-78.

Núñez-Zarco, E., Sánchez-Saavedra, M., 2011. Cold Storage of Six Marine Benthic Diatoms Native to the Mexico Pacific Coast. *Journal of World Aquaculture Society* 42(4), DOI:10.1111/j.1749-7345.2011.00495.x

Paredes, E., Ward, A., Probert, I., Gouhier, L., Campbell, C.N., 2021. Cryopreservation of algae. In: Wolkers, W.F., Oldenhof, H. (eds). Cryopreservation and freeze-drying protocols. Methods in Molecular Biology, vol 2180. Humana, New York, NY.

Phatarpekar, P., Sreepada, R., Pednekar, C., Achuthankutty, C. 2000. A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture*, 181: 141-155. DOI: 10.1016/S0044-8486(99)00227-6

Prieto-Guevara, M., Alarcón-Furnieles, J., Jiménez-Velásquez, C., Hernández-Julio, Y., Espinosa-Araujo, J., Atencio-García, V. 2023. Cryopreservation of the Microalgae *Scenedesmus* sp. *Cells*, 12 (562): 1-14. DOI: 10.3390/cells12040562

Rhodes, L., Smith, J., Tervit, R., Roberts, R., Adamson, J., Adams, S., Decaer, M., 2006. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. *Cryobiology* 52, 152-156. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2005.10.003

Rodríguez, E.O., López-Elías, J.A., Aguirre-Hinojosa, E., Garza-Aguirre, M.D.C., Constantino-Franco, F., Miranda-Baeza, A., Nieves-Soto, M., 2012. Evaluation of the nutritional quality of *Chaetoceros muelleri* schütt (Chaetocerotales: Chaetocerotaceae) and *Isochrysis* sp. (Isochrysidales: Isochrysidaceae) grown outdoors for the larval development of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda: Penaeidae). *Archives of Biological Sciences* 64(3), 963-970. DOI: 10.2298/ABS1203963R

Salas-Leiva, J., Dupré, E., Salas-Leiva, D., 2016. Proximate composition analysis posterior to the cryopreservation of *Chaetoceros calcitrans*. *Revista MVZ Córdoba* 21(1), 5258-5264. DOI: 10.21897/rmvz.35

Salas-Leiva, J.S., Dupré, E., 2011. Cryopreservation of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen): analysis of the effect of DMSO temperature and light regime during different equilibrium periods. *Latin American Journal of Aquatic Research* 39(2), 271-279. DOI: 10.3856/vol39-issue2-fulltext-8

Sánchez-Saavedra, M., Núñez-Zarco, E., 2012. Photosynthetic and biochemical effects of cold storage on marine benthic diatoms of the Mexican Pacific coast. *Journal of World Aquaculture Society* 43(2), 249-258. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2012.00553.x

Santarius, K., 1996. Freezing of isolated thylakoid membrane in complex media. X. Interactions among various low molecular weight cryoprotectants. *Cryobiology* 33, 118-126. DOI: 10.1007/BF00030062

Scarbrough, C., Wirschell, M., 2016. Comparative analysis of cryopreservation methods in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cryobiology*, 73(2), 291-295. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2016.07.011

Soxhlet, F. 1879. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dinglers Polytechnisches Journal* 232, 461-465.

Tapia-Gallardo, Y.D., Río-Portilla, M.A., Molina-Cárdenas, C.A., Sánchez-Saavedra, M.P., 2021. Antibacterial activity in three *Chaetoceros* microalgae species cultures by using antibiotics. Revista de *Biología Marina y Oceanografía* 56(2), 111-121, 2021 DOI: 10.22370/rbmo.2021.56.2.3055

Taylor, R., Fletcher, R.L., 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae -a review of methodologies. *Journal of Applied Phycology* 10, 481-501. DOI: 10.1023/A:1008094622412

Tessarolli, L.P., Day, J.G., Vieira, A.A.H., 2017. Establishment of a cryopreserved biobank for the Culture Collection of Freshwater Microalgae (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica* 17(2), 1-9. DOI: 10.1590/1676-0611-BN-2016-0299

Tzovenis, I., Triantaphyllidis, G., Naihong, X., Chatzinikolaou, E., Papadopoulou, K., Xouri, G., Tafas, T. 2004. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. *Aquaculture* 230, 457-473. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00444-7

Wolkers, W.F., Oldenhof, H., 2021. Principles underlying cryopreservation and freeze-drying of cells and tissues. In: Wolkers, W.F., Oldenhof, H. (eds). Cryopreservation and freeze-drying protocols. Methods in molecular biology, vol 2180. Humana, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-0716-0783-1_1.

Yang, D., Li, W., 2016. Methanol-promoted lipid remodelling during cooling sustains cryopreservation survival of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS One* 11(1), e0146255. DOI: 10.1371/journal.pone.0146255

Youn, J.Y., Hur, S.B., 2009. Cryopreserved marine microalgae grown using different freezing methods. *Algae* 24(4): 257-265. DOI: 10.4490/ALGAE.2009.24.4.257

Zar, J.H. 2010. Biostatistical analysis. 5th edition. Pearson, New Jersey, USA. 960 p.