

MIECZYŚLAW NOWAK, TERESA BEDNARZ

## Wpływ niskich temperatur na przeżywalność wybranych gatunków glonów

### Influence of low temperatures on the survivability of selected species of algae

Wpłynęło 29 listopada 1975 r.

**Abstract** — The reaction to freezing at temperatures of  $-6$  to  $-8$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  of 6 Polish freshwater algae — *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus acutus*, *S. quadricauda*, *Hormidium flaccidum*, *Stichococcus* sp., and *Anabaena variabilis* — and of two halophilous blue-green algae of foreign origin — *Oscillatoria* sp. and *Spirulina platensis* — was investigated.

The greatest resistance to these processes was shown by *Scenedesmus acutus*, *Anabaena variabilis*, and *Scenedesmus quadricauda*. For freshwater algae the best results of survivability were obtained during freezing at temperatures from  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$  using a 1 per cent aqueous glucose solution as a preservative. Halophilous algae did not survive freezing at such temperatures. This method permits the storage of freshwater algae for 33 months. A longer preservation of samples caused a decrease in their survivability. The freezing of algae at a temperature of  $-196^{\circ}\text{C}$  and the application of a 5 to 10 per cent aqueous glycerol solution gave positive results for the algae *Scenedesmus acutus*, *Anabaena variabilis*, and *Scenedesmus quadricauda*. In other species only a small percentage survived the deep freeze processes.

Vegetative species of alga have a low resistance to the action of low temperatures (Holm-Hansen 1963, Watanabe 1959). When freezing plant or animal cells, various kinds of preservatives were applied causing either dehydration of the protoplast or binding water within the cells (Gehemio, Luyet 1951, Keane 1953, Luyet, Gehemio 1952, Meryman 1969 b). A number of prescriptions for preservatives applied for freezing cells and tissues as well as sperm (Keane 1953, Luyet, Gehemio 1952, Luyet, Keane 1953, Meryman 1960 b, Ridgeway, Hodgins 1964) have been given in literature; elaborations concerning preservatives specific for algae, (Holm-Hansen

sen 1963, Kärcher 1931, Kubinova 1966, Watanabe 1959) are, however, lacking. Investigations carried out in the Independent Laboratory of Fish Biology and Water Environment of the Institute of Zootechniques at Zator aim at giving a decisive answer to the questions of how low temperatures affect the vitality of algae stored in collections and of whether there exists a possibility of preserving algae by means of freezing.

### Material and method

Cultures of fresh water algae: *Chlorella pyrenoidosa* Chick. No 366, *Scenedesmus acutus* Meyen No 1608, *S. quadricauda* (Turp.) Bréb. No 1057, *Hormidium flaccidum* (Kütz.) A. Braun No 1615, *Stichococcus* sp. No 1609 of the green algae type, and *Anabaena variabilis* Kütz. No 1618 of the blue-green algae type, originating from the collection of the Institute of Zootechniques at Zator (Bednarz, Nowak 1971) constituted the experimental material. Two halophilous blue-green algae, *Oscillatoria* sp. and *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl., of foreign origin (Compère, 1968) were also taken for investigation. Apart from the sporulating *Anabaena variabilis*, the other species of algae are exclusively vegetative forms.

Initially only two species of alga: *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus acutus* were subjected to freezing processes. Freezing of these algae was performed at  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$ ,  $-18$ ,  $-72$ , and  $-196^{\circ}\text{C}$ . When freezing at  $-6$  to  $-8$ ,  $-18$  and  $-72^{\circ}\text{C}$  1 per cent aqueous solutions of glucose, sucrose, and glycerol were used as preservatives. At further stages of the investigations the other species of alga were subjected to freezing. Because of the results obtained for *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus acutus*, the authors decided not to freeze the material at  $-18$  and  $-72^{\circ}\text{C}$ ; in freezing at  $-196^{\circ}\text{C}$  only 3, 5, and 10 per cent glycerol solutions were used as preservatives.

All algae subjected to freezing were cultured in conditions assuring optimal growth. After culturing, the material was centrifuged, washed with preservatives, and then suspended in a fresh portion of the medium and subsequently incubated at room temperature for 1 hour. Samples prepared in this way were transferred into Durham tubes which were subsequently placed in an apparatus assuring the required temperature ( $-6$  to  $-8$  and  $-18$  a freezer,  $-72$  a vacuum flask with dry ice plus ethanol,  $-196^{\circ}\text{C}$  a vacuum flask with liquid nitrogen). In all experiments an alga suspension in a proper medium was used as control. For green algae and *Anabaena variabilis* the medium  $L_{51n}$  according to Jankó-

Tabela II. Obserwacje mikroskopowe glonów *Chlorella pyrenoidosa* (Chl.) i *Scenedesmus acutus* (Sc.), po mroźeniu w różnych temperaturachTable II. Microscopic observations of the algae *Chlorella pyrenoidosa* (Chl.) and *Scenedesmus acutus* (Sc.) after freezing at various temperatures

Ośrodek ochronny Preservative	Glon Alga	Obserwacje mikroskopowe Microscopic observations					
		Temperatura -6 do -8°C Temperature -6 to -8°C	Temperatura -18°C Temperature -18°C	Temperatura -72°C Temperature -72°C	Temperatura -72°C Temperature -72°C		
		komórki z barwionym cyjankiem % of cells stained with eosin	komórki z barwionym cyjankiem % of cells stained with eosin	komórki z barwionym cyjankiem % of cells stained with eosin	komórki z barwionym cyjankiem % of cells stained with eosin		
Roztwór sacherozy Sucrose solution	Chl.	Niektóre komórki lekko zniekształcone, o zarysie kanciastym. Większość komórek z wypłukanym chlorofilem, inne, około 10% wygląda normalnie. Some cells slightly deformed with angular outline. Majority of cells with chlorophyll washed out, others, about 10 per cent. of normal appearance	97	Treść komórkowa przykurczona, często zziarniała. Komórki kanciaste, czasem wymyta treść Cell content contracted, often granulated. Cells angular, cell content sometimes washed out	100	Treść komórkowa przykurczona, zziarniała. Komórki kanciaste, treść wymyta Cell content contracted, granulated. Cells angular, cell content washed out	100
	Bo.	Ponad 50 % komórek białych, z wypłukanym chlorofilem, lub lekko przykurczoną treścią. Po kilka komórek na każde pole widzenia bez treści. Około 70% to komórki pojedynczo, reszta w ceno-biach Over 50 per cent pale cells, with chlorophyll washed out or cell content contracted. In every microscopic field a few cells without content. About 70 per cent single cells, others in cenobios	61	Protoplast odstający od błon, przykurczony, zziarniały. Często komórki z wymytą treścią Protoplast detached from membranes, contracted, granulated. Cells often with content washed out	100	Protoplast odstający od błony, zziarniały. Często komórki z wymytą treścią Protoplast detached from membranes, granulated. Cells often with cell content washed out	100
Roztwór glukozy Glucose solution	Chl.	Liczne komórki z wypłukanym chlorofilem, o zarysie kanciastym. Wyraźna tendencja do tworzenia zlepisk. Około 4% wygląda normalnie. Numerous cells with chlorophyll washed out, with angular outline. Distinct tendency to cluster formation. About 4 per cent appear normal	95	Protoplast przykurczony, komórki kanciaste. Często z wymytą treścią Protoplast contracted, cells angular, often with cell content washed out	100	Protoplast przykurczony, komórki kanciaste, często wymyte Protoplast contracted, cells angular, cell content often washed out	100
	Bo.	Przeważają komórki w ceno-biach, o normalnym wyglądzie. Mała liczba komórek z wypłukanym chlorofilem i przykurczonym protoplastem Cells in cenobios with normal appearance predominate. A few cells with chlorophyll leached and protoplast contracted	58	Protoplast odstający od błon, zziarniały. Często wymyta treść komórkowa Protoplast detached from membranes, granulated. Cell content often washed out	100	Protoplast przykurczony, zziarniały. Często wymyta treść komórkowa Protoplast contracted, granulated. Cell content often washed out	100
Roztwór glicerolu Glycerol solution	Chl.	Treść komórek wyraźnie zziarniała. Często zlepiska komórek. Przeważają komórki z wypłukanym chlorofilem i o przykurczonym protoplastem. Nieliczne komórki o normalnym wyglądzie Cell content distinctly granular. Frequent cell clusters. Cells with chlorophyll washed out and contracted protoplast predominate. A few cells normal	96	Treść komórkowa przykurczona, komórki w zarysie kanciaste. Często wymyta treść komórkowa Cell content contracted. Cells angular in outline. Cell content often washed out	100	Protoplast przykurczony, zziarniały, komórki kanciaste często wypłukane Protoplast contracted, granulated. Cells angular often with cell content washed out	100
	Sc.	Około 80% komórek pojedynczych. Zdarzają się komórki potworkowate. Z rzadka komórki z wymytym chlorofilem. U niektórych komórek protoplast jest przykurczony, zwłaszcza na końcach komórek About 80 per cent single cells. Monstrous cells occur. Rarely cells with chlorophyll washed out. In some cells protoplast contracted, especially at cell ends	63	Protoplast odstający od błon, przykurczony, zziarniały. Często komórki z wypłukaną treścią Protoplast detached from membranes, contracted, granulated. Cells often with cell content washed out	100	Protoplast odstający od błon zziarniały. Często komórki z wypłukaną treścią Protoplast detached from membranes granulated. Cells often with cell content washed out	100
Kontrola, pożywa Control, medium	Chl.	Prawie wszystkie komórki białe, w zarysie kanciaste, tworzą często zlepiska. Mniej niż 1% komórek ma normalny wygląd Almost all cells pale, angular in outline, frequently forming clusters. Less than 1 per cent cells of normal appearance	98	Protoplast przykurczony, zziarniały. Często komórki z wypłukaną treścią Protoplast contracted, granulated. Cells often with cell content washed out	100	Protoplast przykurczony, odstający od błon. Wszystkie komórki zziarniałe lub wypłukane Protoplast contracted, detached from membranes. All cells granulated or with cell content washed out	100
	Sc.	Cenobia występują jedynie sporadycznie. Często zlepiska pojedynczych komórek, o normalnym wyglądzie, lub przykurczonym protoplastem Cenobios occur only sporadically. Frequent clusters of single cells, of normal appearance or with contracted protoplast	72	Protoplast przykurczony, odstający od błon, zziarniały. Często komórki z wypłukaną treścią Protoplast contracted, detached from membranes, granulated. Cells often with cell content washed out	100	Protoplast przykurczony, odstający od błon. Często wypłukana treść komórkowa Protoplast contracted, detached from membranes. Cell content often washed out	100

Tabela I. Ożywienie glonów *Chlorella pyrenoidosa* i *Scenedesmus acutus* po zamrożeniu w -6 do -8°C

Objaśnienie: - kultura obumarła; + przyrosty kultur po 10-14 dniach; ++ przyrosty kultur po 4-6 dniach

Table I. Revival of the algae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus acutus* after freezing at -6 to -8°C

Explanation: - dead culture; + growth increase of cultures after 10 to 14 days; ++ growth increase of cultures after 4 to 6 days

Ośrodek ochronny Preservative	Glon Alga	Czas zamrożenia w dniach Time of freezing in days											
		1	3	10	30	56	90	210	330	510	630	700	990
Roztwór sacharowy Solution of sucrose 1%	Chl.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	So.	++	++	++	+	++	++	++	+	++	+	+	+
Roztwór glukozy Solution of glucose 1%	Chl.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	So.	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	+
Roztwór glicerolu Solution of glycerol 1%	Chl.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	So.	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	+
Kontrola, pożywka L <sub>5m</sub> Control, medium L <sub>5m</sub>	Chl.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	So.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela III. Ożywienie glonów *Chlorella pyrenoidosa* (Chl.) i *Scenedesmus acutus* (So.) po zamrożeniu w różnych temperaturach

- - kultury obumarłe; + - przyrosty kultur po upływie 1 miesiąca, do 1% komórek żywych w posiewie agarowym; ++ - po 16-20 dniach kilkanaście promil komórek żywych po posiewie agarowym; +++ - po 10-14 dniach, 10-20% komórek żywych po posiewie agarowym

Table III. Revival of the algae *Chlorella pyrenoidosa* (Chl.) and *Scenedesmus acutus* (So.) after freezing at various temperatures

- - dead cultures; + - growth increase in cultures after 1 month, to 1 per mille living cells in agar cultures; ++ - after 16 to 20 days more than 10 per mille living cells in agar cultures; +++ - after 10 to 14 days, 10 to 20 per cent living cells in agar cultures

Ośrodek ochronny Preservative	Glon Alga	Temperatura - Temperatures											
		- 18°C				- 72°C				- 196°C			
		Czas zamrożenia w dniach - Time of freezing in days											
		1	3	10	30	1	3	10	30	1	7	14	30
Roztwór sacharowy Sucrose solution 1%	Chl.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	So.	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++
Roztwór glukozy Glucose solution 1%	Chl.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	So.	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++
Roztwór glicerolu Glycerol solution 1%	Chl.	-	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++
	So.	-	-	-	-	-	+	+	-	+++	++	+++	++
Kontrola, pożywka L <sub>5m</sub> Control, medium L <sub>5m</sub>	Chl.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	So.	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++

wski (1964) was used and for the other halophilous blue-green algae according to Zarrouck (1966). At temperature  $-6$  to  $-8$  *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus acutus* were stored successively for 1, 3, 10, 30, 90, 210, 330, 510, 630, 700, and 990 days and the other algae for 1, 10, 30, 90, 210, and 366 days. In liquid nitrogen, samples of all algae were stored successively for 1, 30, 90, 210, and 366 days. Defrosting of samples was carried out at a temperature of 10 to 20°C. After defrosting, the algae were twice washed with nutrient solutions and then suspended in a fresh portion of nutrient solution.

Cultures were grown in the same conditions in which the stock material was obtained. Before culturing, the samples were exposed to light of low intensity for 24 hours. The percentage survivability of alga cells was also determined by means of culturing the defrosted material on a suitable medium solidified with agar and by means of staining with eosiny, soluble in water. All tests were carried out in three parallel repetitions.

#### Freezing at temperatures of $-6$ to $-8$ , $-18$ and $-72^{\circ}\text{C}$

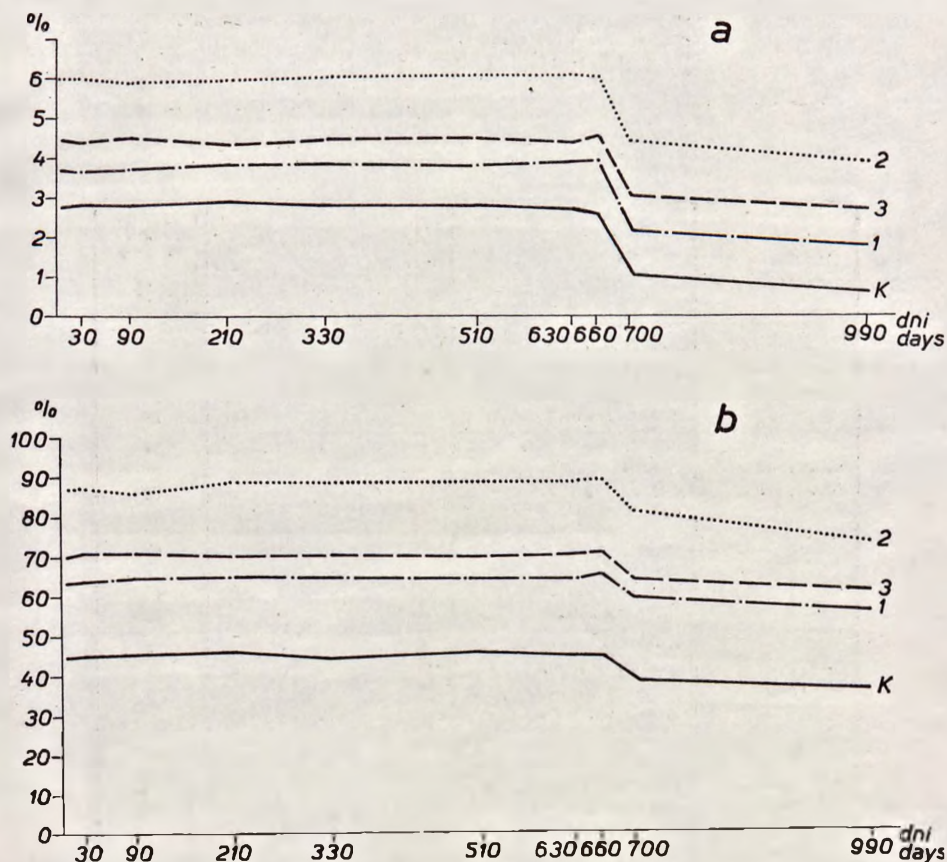
Initially investigations were carried out only on two species of alga: *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus acutus*. In the further course of the investigations other species were also included.

Revival of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus acutus* frozen at temperatures of  $-18$  and  $-72^{\circ}\text{C}$  for 30 days was unsuccessful (Table III). Changes in the appearance of cells were observed under the microscope (Table II). Revival of agar cultures was also unsuccessful. For this reason no further storage of samples or freezing of other algae at these temperatures was carried out.

Revival of the algae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus acutus* frozen at  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$  was successful (Table I). Apart from a few which were stored in a frozen state for 30 days all the samples were revived. The storage of samples in these temperatures from 1 to 660 days did not affect the survivability of the algae. After a longer storage period a decrease in the vitality of cells was observed (fig. 1).

After defrosting attenuation of the algae was noted in all cases; this was manifested in retarded cell division which started only after some time. In several attempts at revival *Scenedesmus acutus* began to grow much sooner than *Chlorella pyrenoidosa*. Stored for 660 days, it started division after 4 to 6 days whereas *Chlorella* began to increase only after 10 to 14 days.

In staining defrosted samples with eosin 95 to 98 per cent of *Chlorella* cells stained distinctly red were obtained. About 60 per cent of cells of *Scenedesmus acutus* stained poorly (Table II). In agar cultures



Ryc. 1. Procentowa przeżywalność glonów *Chlorella pyrenoidosa* (a) i *Scenedesmus acutus* (b), poddanych mrożeniu w  $-6$  do  $-8^{\circ}\text{C}$  określona drogą posiewów na podłoża mineralne zestalone agarem, 1 — 1% roztwór sacharozy, 2 — 1% roztwór glukozy, 3 — 1% roztwór glicerolu, K — kontrola, pożywka  $L_5m$

Fig. 1. Percentage survivability of the algae *Chlorella pyrenoidosa* (a) and *Scenedesmus acutus* (b), subjected to freezing at  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$ , determined by means of cultures on a mineral medium solidified with agar: 1 — 1 per cent sucrose solution, 2 — 1 per cent glucose solution, 3 — 1 per cent glycerol solution, K — control, medium  $L_5m$

(fig. 1) similar results were obtained as in staining with eosin, except that a larger number of *Scenedesmus acutus* cells were found to be alive than indicated by staining (Table II). Storage of frozen samples for longer than 660 days caused a decrease in the number of cells able to live after defrosting. The time necessary for cultures to begin growth lengthened. *Chlorella* began to increase after 18 days and *Scenedesmus acutus* after 14 days. Staining with eosin did not show a larger number of stained cells, but in agar cultures a decrease in living cells was observed (fig. 1). In all defrosted samples the appearance of algae cells differed from nor-

Tabela IV. Ożywienie różnych gatunków glonów po mrożeniu w  $-6$  do  $-8^{\circ}\text{C}$ 

- - kultura ebumarża;  
 + - przyrosty kultur po upływie 10-20 dni;  
 ++ - przyrosty kultur po upływie 5-9 dni

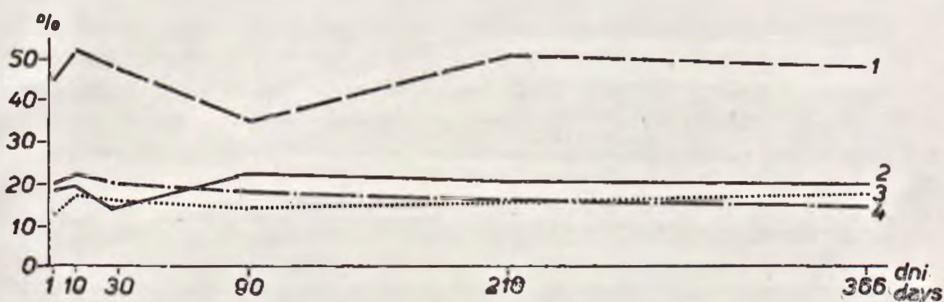
Table IV. Revival of various species of algae after freezing at  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$ 

- - dead culture;  
 + - growth increase in cultures after 10 to 20 days;  
 ++ - growth increase in cultures after 5 to 9 days

Gatunek glonu Species of alga	Ośrodek ochronny Preservative	Czas zamrożenia w dniach Time of freezing in days					% Wydruk mbarwie- nych cew- na % of cells stained with osain
		1	10	30	90	210	
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	sacharoza-sucrose 1 %	+	+	+	+	+	78
	glukoza-glucose 1 %	+	++	+	+	+	80
	glicerol-glycerol 1 %	+	+	+	+	+	75
	kontrola-control $L_5$	+	+	+	+	+	85
<i>Hormidium flaccidum</i>	sacharoza-sucrose 1 %	+	+	++	++	+	86
	glukoza-glucose 1 %	+	+	++	++	+	83
	glicerol-glycerol 1 %	+	+	+	++	+	78
	kontrola-control $L_5$	+	+	++	+	+	82
<i>Stichococcus sp.</i>	sacharoza-sucrose 1 %	++	+	++	+	+	87
	glukoza-glucose 1 %	+	++	+	++	+	79
	glicerol-glycerol 1 %	+	++	+	+	+	80
	kontrola-control $L_5$	++	+	+	+	+	80
<i>Anabaena variabilis</i>	sacharoza-sucrose 1 %	+	+	+	+	+	8
	glukoza-glucose 1 %	+	++	+	+	+	12
	glicerol-glycerol 1 %	+	+	+	++	+	18
	kontrola-control (połyska-median)	+	++	+	++	+	20
<i>Spirulina platensis</i>	sacharoza-sucrose 1 %	-	-	-	-	-	Brak nie widać żadnych barwie- nych celek
	glukoza-glucose 1 %	-	-	-	-	-	
	glicerol-glycerol 1 %	-	-	-	-	-	
	kontrola-control (połyska og. iarrowak) (medium 200.10)	-	-	-	-	-	
<i>Oscillatoria sp.</i>	sacharoza-sucrose 1 %	-	-	-	-	-	Brak nie widać żadnych barwie- nych celek
	glukoza-glucose 1 %	-	-	-	-	-	
	glicerol-glycerol 1 %	-	-	-	-	-	
	kontrola-control (połyska og. iarrowak) (medium 200.10)	-	-	-	-	-	

mal. Table II gives the results of microscopic observations. From the applied preservatives the best results were obtained with the 1 per cent glucose solution (fig. 1). Using this preservative the smallest number of details distinguishing defrosted from fresh algae were observed.

Attempts of reviving *Scenedesmus quadricauda*, *Hormidium flaccidum*, *Stichococcus* sp., and *Anabaena variabilis* (Table IV) were successful whatever the preservative applied. Among them the best results were obtained for the alga *Anabaena variabilis*, slightly poorer ones for *Hormidium flaccidum* and *Stichococcus* sp., and the poorest for *Scenedesmus quadricauda*. The halophyllous blue-green algae *Spirulina platensis* and *Oscillatoria* sp. subjected to freezing at  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$  could not be revived.



Ryc. 2. Procentowa przeżywalność różnych gatunków glonów poddanych mrożeniu w  $-6$  do  $-8^{\circ}\text{C}$ , określona drogą posiewów na podłoża mineralne zestalone agarem: 1 — *Anabaena variabilis*, 2 — *Scenedesmus quadricauda*, 3 — *Stichococcus* sp., 4 — *Hormidium flaccidum*

Fig. 2. Percentage survivability of various species of algae subjected to freezing at  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$ , determined by means of cultures on a mineral medium solidified with agar: 1 — *Anabaena variabilis*, 2 — *Scenedesmus quadricauda*, 3 — *Stichococcus* sp., 4 — *Hormidium flaccidum*

Agar cultures of defrosted samples (fig. 2) gave similar results, though slightly poorer than those obtained by means of staining with eosin (Table IV).

#### Freezing in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ )

Preliminary freezing of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus acutus* was performed at  $-196^{\circ}\text{C}$  after pretreatment with preservatives (Table III, V). Only after the addition of glycerol was a slightly better survivability of the algae observed. Increase of the sucrose and glucose concentration to 3 and 5 per cent respectively did not cause any increase in cell survivability, but raising the glycerol concentration to 10 per cent had a positive effect (Table VI). In the microscopic picture of defrosted samples (Table VII) as well as in the revival results *Scenedesmus acutus* showed a much greater resistance to freezing processes. After only 4 to 6 days the resumption of cell division was observed, whereas in *Chlorella* growth increase in cultures began only after 16 to 20 days. Staining with eosin showed coloration of 100 per cent of *Chlorella* cells, whereas for *Scenedesmus acutus* this concerned about 20 per cent. Similar results were obtained in cultures on agar substrate (Table VI).

With an increase in glycerol concentration to 10 per cent an increase in survivability of the alga *Scenedesmus* as observed. A further increase in concentration, however, brought no improvement (Table VI). These relations were not evident for *Chlorella*.

When freezing other species of algae in liquid nitrogen only 3, 5, and 10 per cent glycerol solutions were used as preservatives. Great differences in survivability between particular species of algae were



observed (Table VIII). Cultures of *Anabaena variabilis* and *Scenedesmus quadricauda* were the first to begin growth (after 3 weeks) and *Spirulina platensis* the last i.e. only after 6 weeks. The long period of time, when no growth of cultures took place, gives evidence of great attenuation of the algae. Agar cultures gave similar results as revival in liquid media (Table VIII).

An increase in cell survivability proportional to the glycerol concen-

Tabela V. Obserwacje mikroskopowe glonów *Chlorella pyrenoidosa* (Chl.) i *Scenedesmus acutus* (So.), po zrośnięciu w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$  przy różnych ośrodkach ochronnych

Table V. Microscopic observations of the algae *Chlorella pyrenoidosa* (Chl.) and *Scenedesmus acutus* (So.), after freezing at temperature  $-196^{\circ}\text{C}$ , using various preservatives

Ośrodek ochronny Preservative	Glon Alga	Obserwacje mikroskopowe Microscopic observations	% komórek zabarwionych eosyną % of cells stained with eosin
Roztwór sacharozowy 1 % Sacrose solution	Chl.	Komórki często z ziarnistym protoplazmem, nieco sbruniałe lub szółkłe. Niekiedy kanciaste. Pojedynczo występują komórki z wymytym chlorofilem Cells frequently with a granulated protoplast, slightly brownish or yellowish. Occasionally angular. Cells with oblerophyll washed out occur singly	100
	So.	Tylko pojedyncze komórki. Na końcach komórek obserwuje się lekkie przykurczenie treści. Pojedynczo komórki z wymytym chlorofilem, z ziarnistą treścią. Reszta komórek o wyglądzie normalnym Only single cells. At the ends of cells a slight contraction of the cell content. Single cells with oblerophyll washed out and granulated content. Other cells of normal appearance	81
Roztwór glukozy 1 % Glucose solution	Chl.	Często komórki z wymytym chlorofilem i ziarnieniami. Niekiedy lekko zdeformowane. Komórki nieco różowe i jaśniejsze niż normalnie Numerous cells with chlorophyll washed out and granularities. Occasionally slightly deformed. Cells slightly yellowish or paler than normal	100
	So.	Tylko pojedyncze komórki. Na końcach większość komórek obserwuje się lekkie przykurczenie protoplazmu. Pojedynczo występują komórki z ziarnieniami lub wypukłym oblerofilem. Reszta komórek o wyglądzie normalnym Only single cells. At the ends of most cells a slight contraction of the protoplast. Cells with granularities or oblerophyll washed out occur singly. Other cells of normal appearance	80
Roztwór glicerolu 1 % Glycerol solution	Chl.	Komórki zielone, lekko zdeformowane z wyraźnie zaznaczonych strukturami wewnętrznymi, bez ziarnistości. Sprowadzenie komórki o wypukłej, lub lekko obkurzonej treści Cells green, slightly deformed, with distinctly marked inner structures without granularities. Specially cells with content washed out or slightly contracted	100
	So.	Obserwuje się wyraźne zziarnienie protoplazmu. Wszystkie komórki lekko na końcach obkurzone. Struktury wewnętrzne widoczne. Sprowadzenie komórki bez zmian Distinctly marked granularities of the protoplast are observed. All cells slightly contracted at the ends. Inner structures visible. Specially cells without any changes	24
Kontrola potywna 1 <sub>5</sub> Control medium 1 <sub>5</sub>	Chl.	Komórki jakgdyby lekko szółkłe, często ziarnienia w protoplazmie, niekiedy blade, z wypukłym oblerofilem. Nie przykurzone Cells as if slightly yellowish, frequent granularities in the protoplast, occasionally pale with oblerophyll washed out. Not contracted	100
	So.	Komórki z protoplazmem nie przykurczonym na końcach, lub to tylko występuje z kilka w polu widzenia. Dużo liczne komórki z wymytym oblerofilem, oraz z licznymi ziarnieniami w protoplazmie Cells with protoplast not contracted at the ends or only in a few in the microscopic field. Fairly numerous cells with oblerophyll washed out and numerous granularities in the protoplast	83



Tablica VII. Obserwacje mikroskopowe na komórkach *Chlorella pyrenoidosa* (Chl.) i *Scenedesmus acutus* (So.) z zamrożeniem w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$  przy różnym stężeniu glicerolu

Table VII. Microscopic observations of the algae *Chlorella pyrenoidosa* (Chl.) and *Scenedesmus acutus* (So.) after freezing at  $-196^{\circ}\text{C}$  using various glycerol concentrations

Stężenie glicerolu % Percentage concentration of glycerol	Glon Alga	Obserwacja mikroskopowa Microscopic observation	% komórek zabarwionych eozyną % of cells stained with eosin
1	Chl.	Komórki zielone, lekko zdeformowane, o wyraźnie zaznaczonych strukturach wewnętrznych, bez zziarnień. Sporadycznie komórki o wypłukanej, lub lekko obkurczonej treści Cells green, slightly deformed, with distinctly marked inner structures, without granularities. Sporadic cells with cell content washed out or slightly contracted	100
	So.	Obserwuje się wyraźne zziarnienia protoplastu. Wszystkie komórki lekko na końcach obkurczone. Struktury wewnętrzne widoczne. Sporadycznie komórki bez zmian Distinct granularities of the protoplast are observed. All cells slightly contracted at the ends. Inner structures visible. Sporadic cells unchanged	24
3	Chl.	Połowa komórek kanciastych i z zziarnieniami, połowa bez zmian. Struktury w wszystkich dobrze widoczne. Sporadycznie komórki z wymytą treścią Half the cells angular with granularities, half without any changes. Structures in all cells clearly visible. Sporadic cells with content washed out	100
	So.	Komórki z obkurczonym protoplastem, zwłaszcza na końcach. Często z zziarnieniami. Pirenoidy zawsze widoczne. Sporadycznie komórki bez struktur Cells with protoplast contracted, especially at the ends. Frequently with granularities. Pyrenoids always visible. Sporadic cells without structures	18
5	Chl.	Przeważnie komórki normalne. Niewiele komórek obkurczonych i zdeformowanych. Struktury wewnętrzne widoczne, pojedynczo w komórkach z zziarnieniami Cells mostly normal. Few cells contracted and deformed. Inner structures visible, sporadic granularities in cells	100
	So.	Wszystkie komórki obkurczone, szczególnie na końcach. Barwa i struktury wewnętrzne normalne. Bez zziarnień. Pojedynczo komórki wypłukane, bez struktur All cells contracted, especially at the ends. Colour and inner structure normal. Without granularities. Individual cells washed out, without structures	15
10	Chl.	Na ogół kanciasty zarys komórek, lub gwiaździsty. Zziarnienia sporadycznie, lecz nie u gwiaździstych. Czasem komórki o normalnym wyglądzie Generally angular or asteroid cell outline. Sporadic granularities but not in asteroid cells. Occasionally cells of normal appearance	100
	So.	Wszystkie komórki obkurczone, szczególnie na końcach. Barwa i struktury wewnętrzne normalne. Bez zziarnień. Pojedynczo komórki wypłukane, bez struktur All cells contracted, especially at the ends. Colour and inner structure normal. Without granularities. Individual cells washed out, without structures	14
Kontrola - peżyłka L <sub>5m</sub> Control - seedling L <sub>5m</sub>	Chl.	Komórki nieobkurczone, nie kanciaste, lecz żółtawe, często w zlepiskach. Niekiedy z zziarnieniami, nie zlepione, lecz mniej zielone. Komórki na ogół z strukturami wewnętrznymi. Cells not contracted, not angular, yellowish, frequently in clusters. Occasionally with granularities, not clustered but less green. Cells generally without inner structures	100
	So.	Komórki normalnie zabarwione, niekiedy z zziarnieniami. Czasem lekko obkurczone na końcach. Pirenoidy i wewnętrzne struktury dobrze widoczne Cells normally coloured, occasionally with granularities. Sometimes slightly contracted at the ends. Pyrenoids and inner structures clearly visible	88

Tabela VIII. Wpływ głębokiego mrożenia ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) na przeżywalność poszczególnych gatunków glonów przy różnym stężeniu glicerolu jako ośrodka ochronnego

- - kultura obumarła;
- + - przyrosty kultur po 5-6 tygodniach do 2 % przeżywalności;
- ++ - przyrosty kultur po 4-5 tygodniach 0.1 - 1 % przeżywalności;
- +++ - przyrosty kultur do 3 tygodni 3 % przeżywalności

Table VIII. Effect of deep freezing ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) on the survival of particular species of algae using various glycerol concentrations as preservative

- - dead culture;
- + - growth increase in cultures after 5 to 6 weeks to 2 per cent survivability;
- ++ - growth increase in cultures after 4 to 5 weeks 0.1 to 1 per cent survivability;
- +++ - growth increase in cultures to 3 weeks 3 per cent survivability

Gatunek glonu Species of algae	Stężenie glicerolu * % Percentage concentration of glycerol	Czas zamrożenia w dniach Time of freezing in days					
		1	10	30	90	210	360
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	3	+	++	+	++	+	+
	5	++	++	++	++	++	++
	10	+	++	++	+++	++	++
<i>Nannidium fracticidum</i>	3	++	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	++	+	+
	10	+	++	+	+	+	+
<i>Stichococcus</i> sp.	3	+	+	+	+	+	+
	5	+	++	+	+	+	++
	10	+	+	++	+	++	+
<i>Anabaena variabilis</i>	3	++	++	++	++	++	++
	5	++	++	+++	++	++	++
	10	++	++	++	++	+++	++
<i>Spirulina platensis</i>	3	-	+	-	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
<i>Oocillatoria</i> sp.	3	-	+	+	+	+	+
	5	+	+	-	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+

For the majority of the investigated algae the best results were obtained in freezing at  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$  when a 1 per cent glucose solution was used as a preservative. This method permits freshwater algae to be preserved for a period of 33 months. Longer storage of algae in this temperature causes a decrease in their vitality. It is not, however, suitable for preservation of the investigated halophilous species.

Deep freezing in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) permits storage of the biological material for an almost unlimited period (Meryman 1960 a, Ridgeway, Hodgins 1964, Watanabe 1959). It therefore also gives a better prognosis in maintaining collections of algae than freezing at higher temperatures. Though the results of these investigations are in agreement with published data (Holm-Hansen 1963, Kubinova 1966, Watanabe 1959), they indicate a small applicability of the

method, since for most of the investigated algae a too low percentage survivability was obtained. During deep freezing the best survivability conditions were obtained for the alga *Scenedesmus acutus* with 5 to 10 per cent glycerol solutions used as preservative. With an increase in the glycerol concentration to 10 per cent an increase in cell survivability was observed in *Scenedesmus acutus*, *S. quadricauda*, and *Anabaena variabilis*. In other algae, however, such as dependence was not noticed.

The highest percentage survivability in freezing at  $-196^{\circ}\text{C}$ , amounting to 50 per cent of cells, was recorded for the alga *Scenedesmus acutus*; survivability of a few cent was obtained for *S. quadricauda* and *Anabaena variabilis*. For other species of algae the highest survivability values reached only a few pro mille.

In the light of the above, the deep freeze method can be advised for long term storage of the algae *Scenedesmus acutus*, *S. quadricauda*, and *Anabaena variabilis*, using 5 and 10 per cent aqueous solutions of glycerol as preservative. For other freshwater algae — *Chlorella pyrenoidosa*, *Hormidium flaccidum*, and *Stichococcus* sp. — the method of choice would be freezing at  $-6$  to  $-8^{\circ}\text{C}$  applied, however, for not longer than 33 months.

#### STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania nad wpływem mrożenia w temperaturach  $-6$  do  $-8$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$  na sześć krajowych gatunków glonów słodkowodnych: *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus acutus*, *S. quadricauda*, *Hormidium flaccidum*, *Stichococcus* sp. i *Anabaena variabilis* z kolekcji własnej Instytutu Zootechniki w Zatorze oraz dwóch halofilnych obcego pochodzenia: *Oscillatoria* sp. i *Spirulina platensis*. Prowadzono obserwacje nad wzrostem glonów poprzednio zamrożonych i zmianami cytologicznymi wynikłymi na skutek mrożenia. Określano również procent komórek żywych w rozmrożonym materiale, drogą posiewów na podłoża mineralne zestalone agarem, oraz metodą barwienia eozyną y.

Największą odpornością na działanie niskich temperatur odznaczały się glony *Scenedesmus acutus*, *Anabaena variabilis* i *Scenedesmus quadricauda*. Dla słodkowodnych glonów największą procentową przeżywalność komórek uzyskano podczas wymrażania w temperaturze  $-6$  do  $-8^{\circ}\text{C}$  (ryc. 2, tabele I, II, IV), przy zastosowaniu 1% wodnego roztworu glukozy jako ośrodka ochronnego (ryc. 1, 2). Halofilne glony nie przeżywały zamrożenia w tej temperaturze.

Mrożenie w  $-6$  do  $-8^{\circ}\text{C}$  pozwala na konserwowanie glonów słodkowodnych przez okres 33 miesięcy. Dłuższe przechowywanie prób powodowało spadek żywotności komórek (ryc. 1).

Mrożeniu w  $-18$  i  $-72^{\circ}\text{C}$  poddano tylko dwa gatunki glonów: *Chlorella pyrenoidosa* i *Scenedesmus acutus*. Temperatura  $-18$  i  $-72^{\circ}\text{C}$  powodowała nieodwracalne uszkodzenie komórek testowanych glonów (tabele II, III). Z tego względu zrezygnowano z mrożenia w tej temperaturze pozostałych gatunków glonów.

Głębokie mrożenie w ciekłym azocie ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) glony, a zwłaszcza *Scenedesmus acutus*, *Anabaena variabilis* i *Scenedesmus quadricauda*, znosiły najlepiej przy zastosowaniu 5 i 10% wodnych roztworach glicerolu (tabele III, V, VI, VII, VIII). Naj-

większy procent przeżywalności, wynoszący 50% komórek, uzyskano dla glonu *Scenedesmus acutus* (tabela VI). Kilkuprocentową przeżywalność stwierdzono u glonów *Scenedesmus quadricauda* i *Anabaena variabilis* (tabela VIII). Pozostałe gatunki glonów proces głębokiego mrożenia przeżywały co najwyżej w kilku promilach (tabela VI, VIII).

## REFERENCES

- Bednarz T., M. Nowak, 1971. Katalog szczepów glonów Instytutu Zootechniki. Catalogue of algae strains of the Institute of Zootechniques. Inst. Zootechn. Kraków, 259.
- Compère P., 1968. Une algue Bleu (*Cyanophyceae*) intéressante pour la production de protéines: *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl. Materiały 6-go Sympoziuma SEV. Izdat. Inst. Genet. i Selekcji Rast. Akad. Selsk.-choz. Nauk Bolgarii, Sofija.
- Geheimio P. M., B. J. Luyet, 1951. Effect of a preliminary slight dehydration on the survival of "Vinegareels" frozen at  $-77^{\circ}\text{C}$ . *Biodynamica*, 7, 41—52.
- Holm-Hansen O., 1963. Viability of Blue-green and Green algae after freezing. *Phys. Plant.*, 16, 537—540.
- Jankowski A., 1964. Badania nad selekcją glonów dla potrzeb kultur masowych. Inst. Zootechn. Kraków, 176.
- Kärcher H., 1931. Über die Kalteresistenz einer Pilze und Algen *Planta*, 14, 515—516.
- Keane J. F., 1953. Comparative efficiency of some compounds containing the amido groups in protecting tissues against freezing injury. *Biodynamica*, 7, 175—169.
- Kubínová A., 1966. Konservace produktu nízkými teplotami se zřetelem k zachování aktivity řas. Diplomová práce, ČSAV Mikrobiologický ústav, Třeboň.
- Luyet B. J., P. M. Geheimio, 1952. Effect of glycerol in limiting ice formation in tissues subjected to low temperatures. *Biodynamica*, 7, 107—118.
- Luyet B. J., J. F. Keane, 1953. On the role of osmotic dehydration in the protective action of glycerol against freezing injury. *Biodynamica*, 7, 141—155.
- Meryman H. T., 1960a. Freezing and drying of biological materials *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85, 723—728.
- Meryman H. T., 1960b. General principles of freezing and freezing injury in cellular materials. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 85, 503—509.
- Ridgeway G. J., H. O. Hodgins, 1964. Recovery of viable salmon spermatozoa after fast-freezing. *Progres. Fish Culturist*, 26, 2—95.
- Watanabe A., 1959. Some devices for preserving Blue-green algae in viable state. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 153—157.
- Zarrouck C., 1966. Contribution a l'étude d'une *Cyanophyceae*. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima*. Thes. Doctor. Sci. appliq. Paris, C. N. R. S., 1—62.

Adres autorów — Authors' addresses

mgr Mieczysław Nowak

Samodzielna Pracownia Biologii Ryb i Środowiska Wodnego, Instytut Zootechniki, Pl. Kościuszki 1, 32-640 Zator

mgr Teresa Bednarz

Samodzielna Pracownia Biologii Ryb i Środowiska Wodnego, Instytut Zootechniki, Pl. Kościuszki 1, 32-640 Zator

## ERRATA

Strona Page	Wiersz — Line		Zamiast — Instead of	Winno być — Ought to be
	od góry from above	od dołu from below		
323		21	The evaluate	To evaluate
324		14	of	or
327		22	mg/	mg/l
332				
tab. II	2		Scenedesmus	Scenedesmus
341				
tab. VIII				
col. I		9	fraccidum	flaccidum
368				
tab. IV	1		splyw	splywów
408	2		2,1‰	2,1‰
422				
fig. 1		5	C — XII—XII	C — XI—XII
425		8	appeared	appeared
425		9	chiefly	chiefly
426		9	<i>eurpcephala</i>	<i>eurycephala</i>