

패류 인공종묘 생산시 이용되는 *Isochrysis galbana*의 냉동보존 및 먹이효과

강경호, 김영훈, 안승진, 한찬배, 박해중

전남대학교 해양기술학부

Dietary Value and Cryopreservation of the *Isochrysis galbana* used Shellfish Artificial Seed Production

Kyoung Ho Kang, Young Hun Kim, Seung Jin An, Chan Bae Han and Hae-Joong Park

Division of Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu, 550-749, Korea

ABSTRACT

This study examined the possibility on the dietary value and cryopreservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*. Four cryoprotectants, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), glycerol (Gly) and 1,2-propanediol (PD) were tested at the concentrations of 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 M respectively. The highest survival rates were obtained with 1.5 and 2.0 M of four cryoprotectants yielding a survival rate of 80%. Cell concentration of 30×10^4 cell/ml at the initial point of the experiment was increased to 365×10^4 cell/ml in 1.5 M of dimethyl sulfoxide, 298×10^4 cell/ml in 1.5 M of ethylene glycol, 512×10^4 cell/ml in 1.5 M of glycerol, and 385×10^4 cell/ml in 1.5 M of 1,2-propanediol after five days, respectively. In dietary value experiment, survival rate and growth were not significantly different.

Keywords: Dietary value, Cryopreservation, *Isochrysis galbana*, Shellfish, Seed production.

서 론

패류 유생 사육시 먹이생물로 이용되는 미세조류는 영양면에서 균형 잡혀 있어야 하며 지방산 중 코도불포화지방산의 비

율이 높아야 한다 (Langdon and Waldock, 1981; Chu and Webb, 1984). 또한 대상생물에게 먹이로서의 공급이 원활할 수 있도록 배양이 쉬워야 하고 (Herrero and Lid, 1991; Lid *et al.*, 1992) 유생이 섭취할 수 있는 적당한 크기여야 하며 (Haven and Morales-Alamo, 1970) 섭취시 쉽게 소화되어야 한다고 보고되어 있다 (Epifanio *et al.*, 1981).

이때패류의 종묘생산 현장에서 유용한 먹이생물로 이용되는 황갈색편모조류에 속하는 *Isochrysis galbana*는 연체동물 양식 먹이생물로 사용된 첫 번째 종일 뿐 아니라 크기가 작고 소화가 잘 되어 먹이생물로 매우 적합하며 (Bruce *et al.*, 1940) 고도불포화 지방산의 함량이 높아 (Kaplan *et al.*, 1986) 패류의 인공종묘 생산시 먹이생물로 적합한 종이라고 하였다 (Enright *et al.*, 1986).

*Isochrysis galbana*의 효과적인 냉동보존을 위해서는 우선적으로 적정 동해방지제의 선택 및 농도가 요구되는데 먹이생물로 이용되는 식물성플랑크톤의 냉동보존에 관한 연구는 국내의 경우 찾아 볼 수 없으나 어류나 무척추동물의 배우자 냉동보존에 관한 연구로는 Kim *et al.* (2000) 이 북방대합, *Spisula sachalinensis*에 관하여, Jo *et al.* (2002) 은 피조개, *Scapharca broughtonii*에 대하여, 그리고 Kang *et al.* (2004) 은 말쥐치, *Thamnaconus septentrionalis*와 개불, *Urechis unicinctus*에 관하여 연구보고 하였을 뿐으로 먹이생물로 이용되는 미세조류의 효과적인 냉동보존 방법에 대하여는 체계적인 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

한편 외국의 경우를 보면, Canavate and Lubian (1995) 은 유용 해산동물의 먹이로 이용되는 미세조류의 냉동보존에 관하여 보고하였고 Gwo *et al.* (2005) 은 *Nannochloropsis oculata*의 냉동보존에 대하여 연구하였으나 동해방지제의 중

Received March 20, 2007; Accepted June 8, 2007

Corresponding author: Kang, Kyoung Ho

Tel: +82 (61) 659-3165 e-mail: mobidic@chonnam.ac.kr
1225-3480/23107

© The Malacological Society of Korea

류와 농도, 냉각속도, 평형시간 등에 따라 생존율에 차이를 보이고 있어 보다 구체적인 연구가 뒤따라야 할 것이다.

본 연구는 패류의 인공종묘 생산시 먹이로 상용되는 *Isochrysis galbana*의 효과적인 냉동보존 기법을 확립하기 위하여 적정동해방지제의 종류 및 농도 그리고 해동 후 세포 배양과 먹이효과를 조사하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 *Isochrysis galbana*는 전남대학교 복원 생태학연구실의 먹이생물배양실에서 원종 배양중이던 것을 수온 20 ± 1℃, 조도 4,000 lux에서 Conway 배지를 사용하여 20 liter 생수병에 계대배양하였다.

냉동보존을 위한 동해방지제는 dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol (Gly), ethylene glycol (EG), 1,2-propanedial (PD) 등, 네가지의 동해방지제를 사용하였으며 인공해수로 1.0 M에서 3.0 M까지 0.5 M 간격으로 희석하여 이용하였다.

각각의 동해방지제에 침지된 유생은 0.5 ml straw에 5 × 10⁵ cell/개체의 밀도로 수용하였고 평형시간은 20℃에서 20분을 두었다. 유생의 냉동은 프로그램 동결기 (Kryosave integra, Rovers Polska, UK) 를 이용하여 20℃부터 -12℃까지 -1℃/min의 속도로 냉각하였고 -12℃부터 -35℃까지는 -2℃/min의 속도로 냉각한 후, -196℃의 액체질소통 (MVE, USA) 에 보관하였으며 -12℃와 -35℃에서는 5분의 평형시간을 두었다 (Fig. 1).

냉동보존 효과를 위한 생존율 조사는 액체질소에 24시간 보관된 이후, straw를 질소통에서 꺼낸 다음 20℃에서 해동한 결과를 이용하였다.

냉동보존된 *Isochrysis galbana*의 해동 이후의 배양은 각 실험구별로 3 × 10⁵ cell을 채취하여 5일 동안 광학현미경 하에서 관찰하면서 그 성장을 비교하였다.

냉동보존하여 해동한 *Isochrysis galbana*와 비냉동한 *I. galbana*의 먹이효과 실험에는 평균각장, 평균각고, 평균전중이 62.5 ± 5.8 mm, 110.4 ± 10.8 mm, 98.8 ± 31.4 g인 참굴 어미에서 산란유발된 부화 후 1일째 되는 D형 유생을 사용하였다. 부화한 D형 유생은 3 liter 원형 수조에 수용하였고 사육밀도는 사육해수 ml당 5 개체로 하였으며 수온은 25 ± 1℃로 유지하였다.

참굴 부유유생의 사육을 위한 사육해수는 1 μm cartridge 필터로 여과된 여과해수를 사용하였으며 매일 전량 환수하였다.

참굴 부유유생에게 공급한 *Isochrysis galbana*의 실험구는 냉동보존후 해동하여 배양된 실험구와 비냉동보존된 대조구로 구분하여 매일 1 × 10⁴ cell/ml의 농도로 공급하였다.

유생의 성장은 Profile-Project (Nikon, V-12B)를 이용하여 각장과 각고를 0.1 μm까지 측정하였고 생존율을 조사하였다.

결 과

냉동보존된 *Isochrysis galbana*의 해동 후 생존율을 관찰한 결과, dimethyl sulfoxide의 경우는 1.0 M에서 3.0 M까지 각각 79.0%, 94.0%, 86.3%, 69.3%, 60.0%의 생존율을 보였고 ethylene glycol에서는 농도별로 각각 69.7%, 88.0%, 80.7%, 62.3%, 55.0%, glycerol에서는 각각 87.3%, 94.7%, 93.3%, 85.3%, 72.7%를 보였으며 1,2-propanedial에서는 67.0%, 89.3%, 91.7%, 79.3%, 63.7%의 생존율을 보여 glycerol 1.5 M 농도에서 가장 좋았다 (Fig. 2).

냉동보존된 *Isochrysis galbana*의 해동 후 배양한 결과는 dimethyl sulfoxide의 경우 1.0 M에서 실험개시시 30 × 10⁴ cell/ml이던 것이 3일 후 98 × 10⁴ cell/ml, 실험종료시인 5일 후에는 308 × 10⁴ cell/ml로 성장하였고, 1.5 M에서는 30 × 10⁴ cell/ml이던 것이 3일 후 107 × 10⁴ cell/ml, 실험종료시인 5일 후에는 365 × 10⁴ cell/ml, 2 M의 실험구에서는 실험개시시 30 × 10⁴ cell/ml이던 것이 3일 후 105 × 10⁴ cell/ml, 실험종료시인 5일 후에는 353 × 10⁴ cell/ml로 성장하였다. 또한 2.5 M의 경우 각각 30 × 10⁴ cell/ml, 67 × 10⁴ cell/ml, 137 × 10⁴ cell/ml로 성장하였으나 3.0 M의 실험구에서는 5일 후 모두 폐사하였다 (Fig. 3).

Ethylene glycol에서 냉동보존된 *Isochrysis galbana*의 해동 후 배양한 결과를 보면 1.0 M에서 실험개시시 30 × 10⁴ cell/ml이던 것이 3일 후 70 × 10⁴ cell/ml로 성장하다가 실험종료시인 5일 후에는 모두 폐사하였다. 또한 1.5 M의 경우, 30 × 10⁴ cell/ml이던 것이 3 후 96 × 10⁴ cell/ml, 5일 후에는 298 × 10⁴ cell/ml로, 2 M의 실험구에서는 실험개시시 30 × 10⁴ cell/ml이던 것이 3일 후 93 × 10⁴ cell/ml,

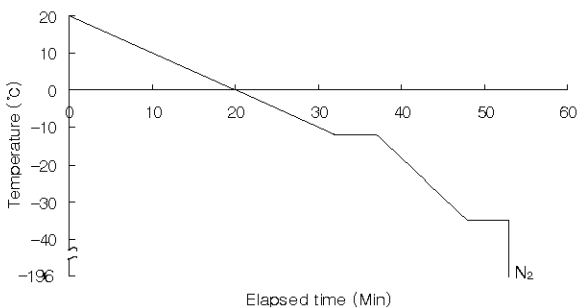


Fig. 1. Two-step freezing procedure used in the experiment.

실험종료시인 5 일 후에는 247×10^4 cell/ml로 성장하였으나 2.5 M과 3.0 M의 경우에는 5 일 후 모두 폐사하였다 (Fig. 4).

Glycerol의 경우 1.0 M에서 실험개시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 경과 후에는 158×10^4 cell/ml, 실험종료시인 5 일 후에는 407×10^4 cell/ml로 성장하였다. 또한 1.5 M 실험구에서는 30×10^4 cell/ml이던 것이 3일 후 190×10^4 cell/ml, 5 일 후에는 512×10^4 cell/ml로 모든 배양 실험구를 통틀어 가장 높은 성장을 보였다. 한편 2 M 실험구에서는 실험개시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 후 176×10^4 cell/ml, 5 일 후에는 462×10^4 cell/ml로 성장한 반면 2.5 M과 3.0 M의 경우, 5 일 후 모두 폐사하였다 (Fig. 5).

냉동보존된 *Isochrysis galbana*의 해동 후 세포 성장을 조

사한 결과, 1,2-propanedial의 1.0 M에서 실험개시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 후에는 107×10^4 cell/ml, 실험 종료시에는 218×10^4 cell/ml로 성장하였고 1.5 M 실험구에서는 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 후 138×10^4 cell/ml, 실험종료시인 5 일 후에는 385×10^4 cell/ml로 성장하였다. 또한 2 M의 경우 실험개시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 실험종료시인 5 일 후에는 360×10^4 cell/ml로 성장한 반면 2.5 M과 3.0 M의 경우 5 일 후 모두 폐사하였다 (Fig. 6).

참갈 D형 유생을 대상으로 먹이효과 실험을 조사한 결과 각각의 경우 냉동보존 후 배양된 먹이 실험구에서 실험개시시 $72.5 \pm 2.8 \mu\text{m}$ 이던 것이 3 일후 $84.1 \pm 3.2 \mu\text{m}$, 실험 종료시인 5 일 후에는 $117.4 \pm 8.2 \mu\text{m}$ 로 성장하였다. 대조구

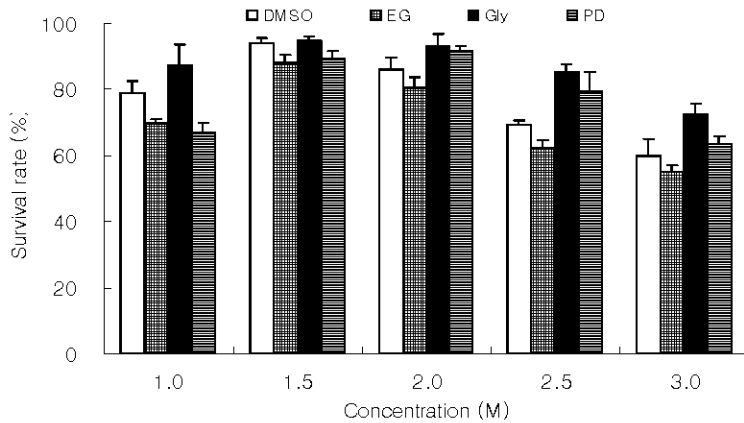


Fig. 2. Survival rates of after thawing *Isochrysis galbana* with various cryoprotectants concentration.

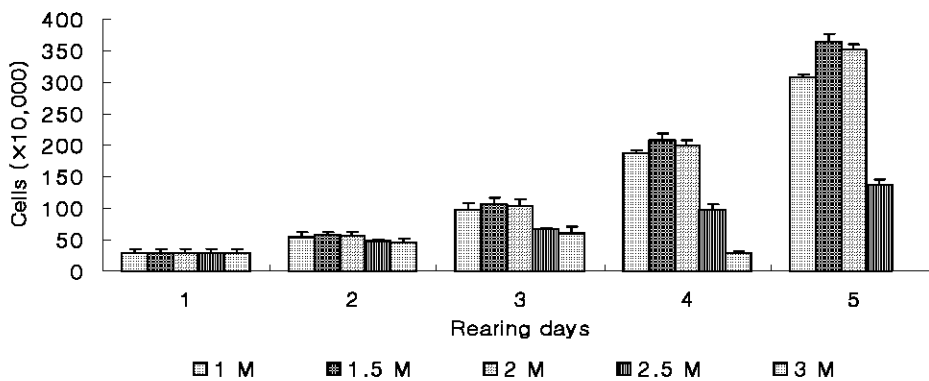


Fig. 3. Relationship of reproduction of *Isochrysis galbana* cells in during the rearing period in tank using dimethyl sulfoxide.

의 경우 실험개시시 $72.5 \pm 2.8 \mu\text{m}$ 이던 것이 3 일후 $87.0 \pm 3.6 \mu\text{m}$ 실험 종료시인 5 일 후에는 $121.6 \pm 7.4 \mu\text{m}$ 로 성장하여 각장의 경우 큰 성장의 차이는 보이지 않았다 (Fig. 7).

참굴 D상 유생 각고의 경우, 냉동보존 후 배양된 먹이 실험구에서 실험개시시 $62.2 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 이던 것이 3 일 후 $79.3 \pm 2.5 \mu\text{m}$, 실험 종료시인 5 일 후에는 $128.4 \pm 7.8 \mu\text{m}$ 로 성장하였고, 대조구의 경우 실험개시시 $62.2 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 이던 것이 3 일 후 $81.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$, 실험 종료시인 5 일 후에는 $131.3 \pm 8.2 \mu\text{m}$ 로 성장하여 각고의 경우 큰 성장의 차이는 보이지 않았다 (Fig. 8).

참굴 D상 유생의 생존율은 냉동보존 후 배양된 먹이 실험구에서 실험개시시 100%이던 것이 3 일 후 84.6%, 실험 종료시인 5일 후에는 65.2%의 생존율을 보였고, 대조구의 경우 실험

개시시 100%이던 것이 3 일 후 85.4%, 실험 종료시인 5 일 후에는 67.8%의 생존율을 보여 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 9).

고 찰

동해방지제는 냉동에 의한 손상을 감소시키거나 방지할 수 있고, 삼투압 농도를 상승시켜 평형을 유지하게 하는 반면, 동해방지제 자체의 독성으로 인하여 세포를 손상시킬 수도 있다고 Rall *et al.* (1978) 은 보고하였다.

세포의 냉동보존시 glycerol (1.0 - 1.4 M)의 첨가는 세포의 삼투질 농도를 300 mOsm/kg에서 1500 mOsm/kg까지 증가시킬 수 있는데 (Niemann, 1982), 이러한 원인 으로는 동해방지제와 삼투압 평형을 이루기 위해 삼투압 상승이 급속히 일어나기 때문으로 충분한 시간을 주어 단계적인 방법으로 동해

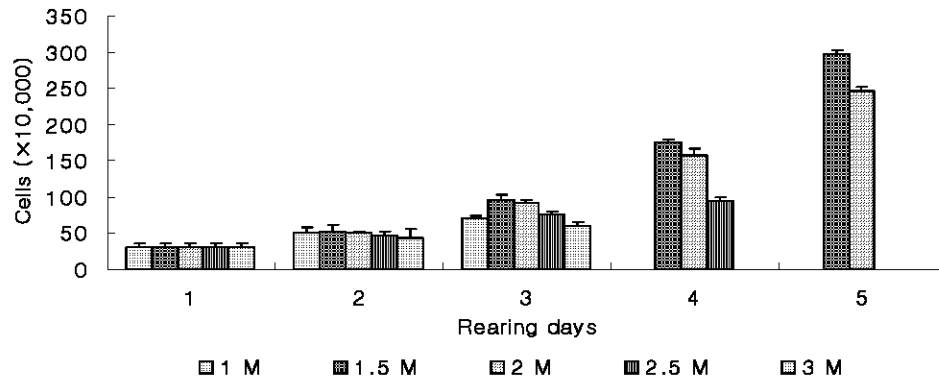


Fig. 4. Relationship of reproduction of *Isochrysis galbana* cells in during the rearing period in tank using ethylene glycol.

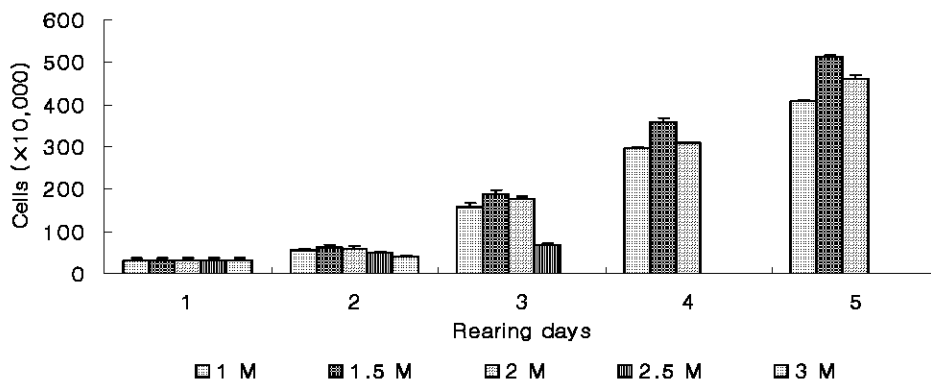


Fig. 5. Relationship of reproduction of *Isochrysis galbana* cells during the rearing period in tank using glycerol.

방지제를 첨가해야 한다고 하였다 (Niemann, 1983).

동해방지제는 세포막의 통과여부에 따라 투과형과 비투과형으로 나뉘어지는데, 투과형으로는 methanol, ethylene glycol, acetamide, propylene glycol, dimethyl sulfoxide,

glycerin 등이 있으며, 비투과형으로는 sucrose, polyethylene glycol, dextran 등이 있다. 냉동보존에서 세포내 삼투질 농도 상승과 세포내외의 빙결정 (icecrystal) 형성 등을 완화 조절하기 위하여 동해방지제 사용은 필수적인 요소이다 (Kang *et*

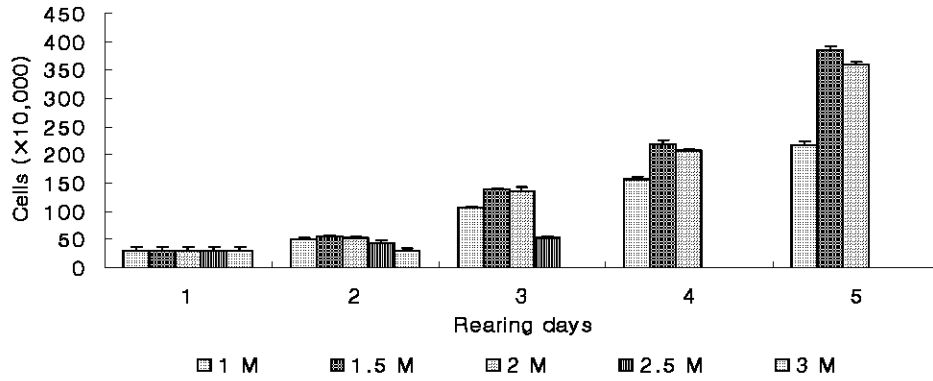


Fig. 6. Relationship of reproduction of *Isochrysis galbana* cells in during the rearing period in tank using 1.2-propanedial.

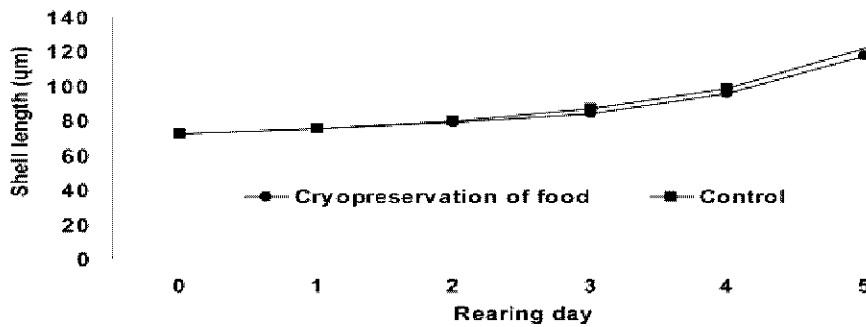


Fig. 7. Growth of shell length of *Crassostrea gigas* larvae.

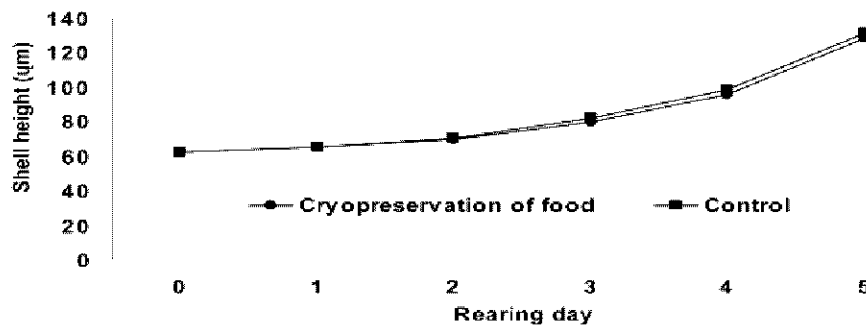


Fig. 8. Growth of shell height of *Crassostrea gigas* larvae.

al., 2004).

냉동보존에 있어서 동해방지제의 독성에 대한 발생배의 내성은 살아있는 세포를 성공적으로 보존하기 위해 우선적으로 고려해야 하는 중요한 요인이자 하였으며, 많은 연구자들이 동해방지제의 독성은 동해방지제의 종류와 농도, 냉동전 평형시간 동안의 온도와 노출시간에 따라 달라진다고 보고하였다 (Kasai et al., 1981; Fahy et al., 1984; Steponkus et al., 1991).

*Isochrysis galbana*의 냉동보존 효과를 조사하기 위해 해동 후 생존율을 관찰한 결과, 각 동해방지제의 농도 1.5 M과 2 M에서는 80% 이상의 생존율을 보임으로서 동해방지제 간의 유의한 차이는 없었다. 동해방지제의 농도 1 M, 2.5 M 및 3 M의 실험구에서는 60%이상의 생존율을 보여 Canavate and Lubian (1995) 이 보고한 생존율 40%와는 차이를 보이고 있는데, 이러한 원인으로는 *I. galbana*의 경우, 동해방지제의 종류와 농도 및 독성, 냉각속도, 평형시간 등 복합요인에 따라 생존율에 차이를 보일 수 있다고 판단되어지나, 금후 종 특이성에 대한 적정 동해방지제의 종류와 농도에 관한 연구가 계속되어야 할 것이다.

냉동보존된 *Isochrysis galbana*의 해동 후 세포의 성장과 수질변화와의 관계를 조사한 결과, glycerol의 경우 1.5 M에서 실험개시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 후 190×10^4 cell/ml로 성장하였고 실험종료시인 5 일 후에는 512×10^4 cell/ml로 모든 실험구를 통하여 가장 높은 성장을 보였다. 이와 같이 가장 높은 성장을 보였을 때의 질산과 아질산 및 암모니아의 변화량을 보면 실험개시시 각각 $19.4 \mu\text{M}$, $10.4 \mu\text{M}$, $8.4 \mu\text{M}$ 로 총질소량 $38.2 \mu\text{M}$ 이던 것이 실험종료시에는 $8.0 \mu\text{M}$, $6.0 \mu\text{M}$, $1.3 \mu\text{M}$ 로 총질소량이 $15.3 \mu\text{M}$ 로 가장 낮아 세포증가율은 총질소량과 반비례하였다.

본 연구의 결과, 동해방지제의 종류와 농도에 따라 생존율이

차이를 보임으로써 냉동보존시 종별 동해방지제의 선택과 평형 시간 및 각 단계별 온도 등에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히 생존율에 큰 영향을 미친다고 보고되어 있는 동해방지제의 독성 및 투과성 여부와 관련한 복합요인의 작용에 관한 연구가 이루어져야 할 것이다. 또한 해양 미세조류 냉동보존의 산업적인 유용성을 위해 냉동보존 후 생존율 확인뿐만 아니라 보존한 미세조류를 배양시켜 먹이로 이용할 수 있는 기법도 개발되어야 할 것으로 판단되며 이와 같은 기법이 확립됨으로써 해양 유용동물의 인공종묘 생산시 냉동보존된 미세조류의 먹이생물로서의 역할도 가능해 질 것이라 생각된다.

요 약

*Isochrysis galbana*의 냉동보존 효과를 조사하기 위해 해동 후 생존율을 관찰한 결과 각 동해방지제의 1.5 M과 2 M에서 80% 이상의 생존율을 보여 동해방지제 간의 유의한 차이는 없었다. 또한 1 M, 2.5 M, 3 M 실험구에서 60%이상의 생존율을 보여 *I. galbana*의 경우 동해방지제 농도에 따라 생존율의 차이를 보였다. 냉동보존 후 세포 증식을 조사한 결과 dimethyl sulfoxide 1.5 M 실험구에서는 실험개시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 후 107×10^4 cell/ml였고, 실험종료시인 5 일 후에는 365×10^4 cell/ml로 증식되어 가장 높은 증식률을 보였다. Ethylene glycol 1.5 M 실험구에서는 실험개시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 후 96×10^4 cell/ml였고, 실험종료시인 5 일 후에는 298×10^4 cell/ml로 증식되어 가장 높은 증식률을 보였다. Glycerol 1.5 M 실험구에서는 실험개시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 후 190×10^4 cell/ml, 실험종료시인 5 일 후에는 512×10^4 cell/ml로 증식되어 전 실험구 중에서 가장 높은 생존율 및 증식률을 보였다. 1,2-propanediol 1.5 M 실험구에서는 실험개

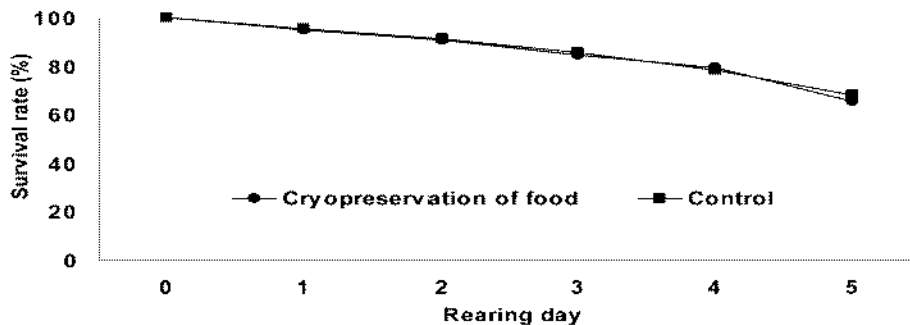


Fig. 9. Survival rate (%) of *Crassostrea gigas* larvae.

시시 30×10^4 cell/ml이던 것이 3 일 후 138×10^4 cell/ml 였고, 실험종료시인 5 일 후에는 385×10^4 cell/ml로 증식되어 가장 높은 증식률을 보였다. 참굴 D상 유생을 대상으로 먹이효과를 조사한 결과 실험구와 대조구간 유생의 성장 및 생존율에 유의한 차이를 보이지 않았다.

REFERENCES

- Bruce, J.R., Knight, M. and Parke, M.W. (1940) The rearing of oyster larvae on an algal diet. *Journal of Marine Biology Association, UK*, **24**: 337-374.
- Canavate, J.P. and Lubian, L.M. (1995) Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species. *Aquaculture*, **136**: 277-290.
- Chu, F.L.E. and Webb, K.L. (1984) Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids*, **19**: 815-820.
- Enright, C.T., Newkirk, G.F., Craigie, J.S. and Castell, J.D. (1986) Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis*. L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **96**: 1-13.
- Epifanio, C.E., Valenti, C.C. and Turk, C.L. (1981) A comparison of *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* as foods for the oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, **23**: 347-353.
- Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A. and Meryman, H.T. (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, **21**: 407-426.
- Gwo, J.C., Chiu, J.Y., Chou, C.C. and Cheng H.Y. (2005) Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology*, **50**: 338-343.
- Haven, D.S. and Morales-Alamo, R. (1970) Filtration of particles from suspension by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin*, **139**: 248-264.
- Jo, P.G., Choi, Y.H., Kang, K.H., Kho, K.H., Go, C.S., Kim, B.H., Lim, H.K., Choi, C.Y. and Chang, Y.J. (2002) Comparison of cryopreservation effects on D-shaped larvae of arkshell, *Scapharca brughotonii* (Pelecypoda Arcidae) by the kinds of additive and the concentration of cryoprotectant. *Korean Journal of Malacology*, **18**(2): 77-82.
- Kang, K.H., Kho, K.H., Chen, Z.T., Kim, J.M. and Kim Y.H. (2004a) Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis*) sperm. *Aquaculture Research*, **35**(15): 1429-1433.
- Kang, K.H., Shao, M.Y., Kho, K.H. and Zhang, Z.F. (2004b) Short-term storage and cryopreservation of *Urechis unicinctus* (Echiura: Urechidae) sperm. *Aquaculture Research*, **35**(13): 1195-1201.
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z. and Aaronson, S. (1986) Algal nutrition. In: Handbook of Microalgal Mass Culture. (ed. by Richmond, A.) pp. 95-97. CRC Press, FL.
- Kasai, M., Niwa, K. and Iritani, A. (1981) Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertilization*, **63**: 175-180.
- Kim, Y.S., Choi, Y.H., Lee, J.Y. and Chang Y.J. (2000) Selection of cryoprotectant for the cryopreservation of trochophores and early D-shaped larvae of surf clam, *Spisula sachalinensis*. *Journal of Korean Fisheries Society*, **33**(6): 597-599.
- Langdon, C.J. and Waldock, M.J. (1981) The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of Marine Biology Association, UK*, **61**: 431-448.
- Lid, A.J., and Abalde, H.C. (1992) High yield mixotrophic culture of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (Prasinophyceae). *Journal of Applied Phycology*, **4**: 31-37.
- Niemann, H. (1982) Neuere ergebnisse und erkenntnisse aus tiefgefrierersuchen mit rinderembryonen. *Tierzuchter*, **34**(S): 412-413.
- Niemann, H. (1983) Theoretical and practical aspects of deep freezing cattle embryos. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **90**(3): 109-114.
- Rall, W.F., Mazur, P. and Souzu, H. (1978) Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. *Biophysical Journal*, **23**: 101-120.
- Steponkus, P.L., Myers, S.P., Lynch, D.V., Pitt, R.E., Lin, T., MacIntyre, R.J., Leibo, S.P. and Rall, W.F. (1991) Cryobiology of *Drosophila melanogaster* embryos. In: Insects at Low Temperature. (ed. by Lee, R.E. and Denlinger, D.L.) pp. 408-423. Shapman and Hall, New York.