

Respons Morphotype *Phaeodactylum tricornutum* terhadap Cryopreservation

Person Pesona Renta^{1*} dan Widayat²

¹Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu
Jl. WR. Supratman, Kandang Limun, Kec. Muara Bangka Hulu, Kota Bengkulu 38371 Indonesia

²Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, S.H., Tembalang, Semarang 50275 Indonesia
Corresponding author, e-mail: pprenta@unib.ac.id

ABSTRAK: *Phaeodactylum tricornutum* merupakan diatom laut yang banyak dimanfaatkan sebagai organisme model dalam kajian fisiologi dan bioteknologi mikroalga serta memiliki plastisitas morfologi berupa beberapa morphotype yang diduga menunjukkan respons berbeda terhadap kondisi stres, termasuk cryopreservation. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi respons cryopreservation yang bersifat morphotype-specific pada *P. tricornutum* morphotype fusiform dan oval. Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan mengkultur kedua morphotype secara terpisah, kemudian mengawetkannya melalui metode pembekuan bertahap menggunakan dua jenis cryoprotectant, yaitu dimetil sulfoksida (DMSO) dan gliserol, pada konsentrasi 5%, 10%, dan 15%. Sampel disimpan pada suhu -80°C selama satu minggu, kemudian direcoveri dan dikultur kembali pada media F/2. Keberhasilan cryopreservation dievaluasi berdasarkan kemampuan pembentukan koloni pada media agar serta kepadatan sel pada kultur cair setelah dua minggu inkubasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa respons cryopreservation berbeda antar morphotype dan dipengaruhi oleh jenis serta konsentrasi cryoprotectant. Morphotype fusiform menunjukkan variasi kepadatan sel yang lebih tinggi pada kultur cair pasca-pemulihan, khususnya pada perlakuan DMSO konsentrasi rendah hingga menengah dan gliserol konsentrasi menengah hingga tinggi. Sebaliknya, morphotype oval menunjukkan kemampuan pembentukan koloni yang lebih jelas pada media agar, meskipun kepadatan sel pada kultur cair relatif lebih rendah. Temuan ini mengindikasikan bahwa keberhasilan cryopreservation *P. tricornutum* dipengaruhi oleh interaksi antara morphotype dan jenis cryoprotectant, sehingga pengembangan protokol penyimpanan mikroalga perlu mempertimbangkan karakteristik morphotype secara spesifik.

Kata kunci: Cryopreservation; Morphotype; Dimetil sulfoksida; Glicerol

Morphotype Response of Phaeodactylum tricornutum to Cryopreservation

ABSTRACT: *Phaeodactylum tricornutum* is a marine diatom that is widely used as a model organism in microalgal physiology and biotechnology studies and exhibits morphological plasticity in the form of several morphotypes, which are thought to display different responses to stress conditions, including cryopreservation. This study aimed to evaluate morphotype-specific responses to cryopreservation in *P. tricornutum*, focusing on the fusiform and oval morphotypes. The research was conducted experimentally by culturing each morphotype separately, followed by preservation using a stepwise freezing method with two types of cryoprotectants, dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol, at concentrations of 5%, 10%, and 15%. Samples were stored at -80°C for one week, then recovered and re-cultured in F/2 medium. Cryopreservation success was evaluated based on colony formation on agar media and cell density in liquid cultures after two weeks of incubation. The results showed that cryopreservation responses differed between morphotypes and were influenced by both the type and concentration of cryoprotectant. The fusiform morphotype exhibited greater variation and generally higher cell densities in liquid culture after recovery, particularly under low to intermediate DMSO concentrations and intermediate to high glycerol concentrations. In contrast, the oval morphotype demonstrated more distinct colony formation on agar media, although cell densities in liquid culture were relatively lower. These findings indicate that the success of *P. tricornutum* cryopreservation is governed by interactions between morphotype and cryoprotectant type, highlighting the need for morphotype-specific considerations in the development of microalgal storage protocols.

Keywords: Cryopreservation; Morphotype; Dimethyl sulfoxide; Glycerol

PENDAHULUAN

Phaeodactylum tricornutum merupakan diatom laut yang banyak digunakan sebagai organisme model dalam penelitian ekologi, fisiologi, dan bioteknologi mikroalga. Spesies ini mudah dikultur di laboratorium dan mampu beradaptasi terhadap perubahan lingkungan, yang tercermin pada respons fisiologis seperti fotosintesis, akumulasi lipid, dan perubahan pigmen. Selain itu, *P. tricornutum* menghasilkan senyawa bernilai tinggi, termasuk eicosapentaenoic acid dan fucoxanthin, sehingga berpotensi untuk pengembangan produk bioaktif dan biorefinery berbasis mikroalga (Ding *et al.*, 2023, Elshobary *et al.*, 2025). Selain itu, *P. tricornutum* dikenal memiliki plastisitas morfologi yang tinggi dengan beberapa morphotype utama, seperti fusiform, oval, dan triradiate, yang dapat muncul atau berubah tergantung pada kondisi lingkungan dan fase pertumbuhan (Galas *et al.*, 2021).

Keberadaan morphotype yang berbeda pada *P. tricornutum* tidak hanya merepresentasikan variasi bentuk sel, tetapi juga berkaitan dengan perbedaan karakter fisiologis dan respons terhadap stres, seperti regulasi gen respon stres dan toleransi terhadap logam berat antar morphotype (Galas *et al.*, 2021, Chuberre *et al.*, 2022). Variasi ini berpotensi memengaruhi kemampuan sel dalam bertahan terhadap kondisi ekstrem, termasuk proses pembekuan dan pencairan selama cryopreservation. Oleh karena itu, pemeliharaan kultur *P. tricornutum* secara berkelanjutan memerlukan metode penyimpanan jangka panjang yang mampu mempertahankan viabilitas dan karakter biologis sel.

Cryopreservation merupakan metode penyimpanan jangka panjang yang umum digunakan untuk mikroalga karena pada suhu yang sangat rendah semua aktivitas biologis terhenti atau sangat melambat sehingga struktur dan fungsi sel dapat dipertahankan tanpa perubahan besar selama periode penyimpanan yang panjang. Metode ini juga efektif mempertahankan stabilitas genetik dan viabilitas kultur stok mikroalga dibandingkan teknik penyimpanan lain (Kapoore *et al.*, 2019, Foo *et al.*, 2023). Keberhasilan metode ini sangat dipengaruhi oleh jenis cryoprotectant yang digunakan, yang berfungsi melindungi sel dari kerusakan akibat pembentukan kristal es dan stres osmotik selama proses pembekuan. Dimetil sulfoksida (DMSO) dan gliserol merupakan cryoprotectant yang paling sering digunakan dalam cryopreservation mikroalga karena kemampuannya menurunkan titik beku dan mengurangi pembentukan es intraseluler (Whaley *et al.*, 2021).

Meskipun berbagai penelitian telah melaporkan keberhasilan cryopreservation pada *P. tricornutum*, sebagian besar studi masih memperlakukan spesies ini sebagai populasi yang homogen tanpa mempertimbangkan keberadaan morphotype yang berbeda. Padahal, perbedaan morfologi antar morphotype diduga dapat memengaruhi permeabilitas membran sel terhadap cryoprotectant serta toleransi terhadap stres kriogenik. Perbedaan morfologi dan karakter fisiologis antar morphotype pada *P. tricornutum* telah dilaporkan berkaitan dengan variasi sifat permukaan sel dan respons terhadap stres lingkungan. Misalnya, oval, fusiform, dan triradiate morphotype menunjukkan perbedaan bentuk sel, permukaan, dan potensi permukaan yang memengaruhi toleransi terhadap akumulasi logam berat (Ma *et al.*, 2021). Selain itu, analisis proteomik menunjukkan profil protein yang berbeda antar morphotype, mencerminkan variasi fisiologi dasar dan respons terhadap stress (Chuberre *et al.*, 2022). Studi lain juga melaporkan bahwa perubahan kondisi kultur (misalnya salinitas atau temperatur rendah) dapat mengubah proporsi morphotype serta menginduksi ekspresi gen yang terkait dengan osmoregulasi dan metabolisme stress (De Martino *et al.*, 2011).

DMSO diketahui memiliki permeabilitas membran yang tinggi, sehingga efektif melindungi sel dari kerusakan pembekuan, namun juga berpotensi bersifat toksik pada konsentrasi tertentu. Sebaliknya, gliserol memiliki tingkat toksisitas yang lebih rendah, tetapi penetrasi ke dalam sel relatif lebih lambat, sehingga efektivitasnya dapat bervariasi tergantung pada karakteristik sel yang diawetkan (Best, 2015, Akhoondi *et al.*, 2012).

Keterbatasan informasi mengenai respons spesifik morphotype *P. tricornutum* terhadap cryopreservation menimbulkan permasalahan dalam penyimpanan isolat mikroalga secara optimal, terutama ketika kultur didominasi oleh morphotype tertentu yang memiliki nilai penting dalam penelitian atau aplikasi bioteknologi. Hingga saat ini, kajian yang secara langsung membandingkan tingkat kelangsungan hidup morphotype fusiform dan oval *P. tricornutum* terhadap penggunaan

cryoprotectant yang berbeda masih sangat terbatas.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi tingkat kelangsungan hidup morphotype fusiform dan oval *P. tricornutum* setelah proses cryopreservation menggunakan DMSO dan gliserol, serta membandingkan efektivitas kedua cryoprotectant tersebut dalam mempertahankan viabilitas sel. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan metode cryopreservation mikroalga yang lebih spesifik terhadap morphotype, sehingga mendukung pendayagunaan kultur *P. tricornutum* secara lebih efektif untuk keperluan penelitian dan aplikasi bioteknologi kelautan.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan diatom laut *Phaeodactylum tricornutum* dengan dua morphotype, yaitu fusiform dan oval, yang diperoleh berdasarkan hasil pengamatan morfologi pada kultur pendahuluan. Masing-masing morphotype dikultur secara terpisah dalam tabung reaksi berisi medium F/2 dengan salinitas 28 ppt (Guillard dan Ryther, 1962, Guillard, 1975). Sebanyak 0,5 mL kultur diinokulasikan ke dalam 4,5 mL medium dan dipelihara pada suhu 24 °C di bawah pencahayaan buatan menggunakan lampu LED putih dengan intensitas 3000 lux. Kultur dipelihara selama dua minggu hingga mencapai fase pertumbuhan stabil, yang ditandai dengan peningkatan kepadatan sel yang relatif konstan. Kepadatan awal sel masing-masing morphotype dihitung menggunakan haemocytometer dan diamati dengan mikroskop cahaya majemuk (Olympus CX23) pada perbesaran 200×

Proses cryopreservation dilakukan dengan mencampurkan suspensi sel dari masing-masing morphotype dengan cryoprotectant berupa dimetil sulfoksida (DMSO) dan gliserol pada tiga konsentrasi berbeda, yaitu 5%, 10%, dan 15% (v/v). Campuran sel dan cryoprotectant dimasukkan ke dalam tabung mikro (Eppendorf) steril dengan volume akhir 1 mL untuk setiap sampel. Setiap kombinasi morphotype dan konsentrasi cryoprotectant dibuat dalam tiga ulangan.

Pembekuan dilakukan secara bertahap untuk meminimalkan kerusakan sel akibat pembentukan kristal es. Sampel terlebih dahulu disimpan pada suhu 4 °C selama 2 jam, kemudian dipindahkan ke suhu -20 °C selama 2 jam, dan selanjutnya disimpan pada suhu -80 °C sebagai suhu pembekuan akhir. Sampel disimpan pada suhu -80 °C selama satu minggu sebelum dilakukan proses pemulihan kultur.

Setelah masa penyimpanan, sampel beku dari masing-masing morphotype dicairkan pada suhu ruang hingga suspensi mencair sempurna. Sampel kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifus mikro untuk tabung Eppendorf (Thermo Scientific) pada kecepatan 5000 ×g selama 3 menit untuk mengendapkan sel. Supernatan yang mengandung cryoprotectant dibuang, kemudian pelet sel disuspensikan kembali dengan medium F/2 sebanyak 500 µL dan dihomogenkan menggunakan vortex mixer.

Sebanyak 100 µL suspensi sel hasil resuspensi ditumbuhkan pada medium agar F/2 dan diinkubasi selama dua minggu hingga koloni mikroalga terbentuk. Setelah periode tersebut, beberapa koloni diambil menggunakan jarum ose steril dan dipindahkan ke dalam medium F/2 cair sebanyak 5 mL yang ditempatkan dalam tabung reaksi berukuran 50 mL. Kultur cair diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 24 °C dengan pencahayaan dan pengadukan menggunakan shaker pada kecepatan 150 rpm selama dua minggu.

Setelah masa inkubasi, pertumbuhan kultur hasil cryopreservation dievaluasi dengan menghitung kepadatan sel menggunakan mikroskop cahaya. Nilai kepadatan sel digunakan sebagai indikator kelangsungan hidup dan kemampuan pemulihan masing-masing morphotype pada setiap perlakuan cryoprotectant. Seluruh perlakuan dilakukan dengan tiga ulangan. Pada tahap analisis, data yang tersedia berupa nilai rata-rata kepadatan sel untuk setiap perlakuan, sehingga hasil disajikan dalam bentuk statistik deskriptif histogram.

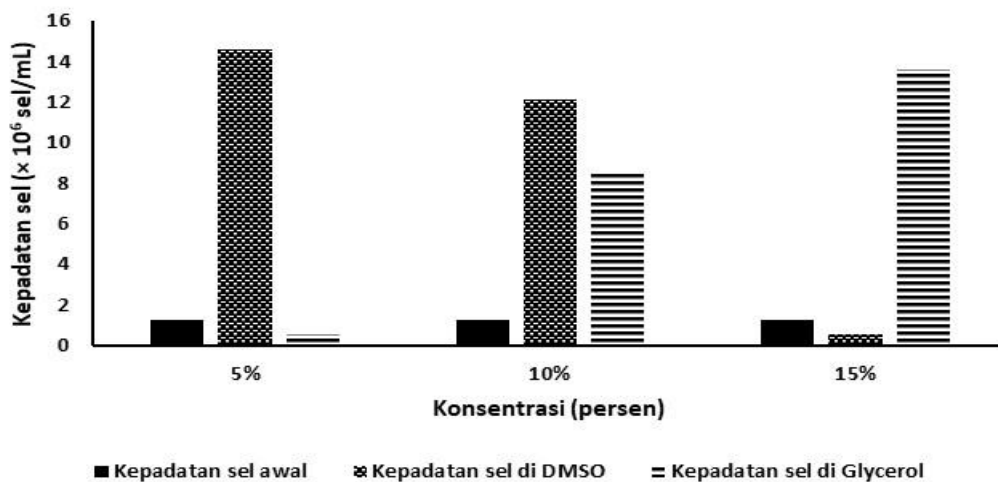
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa keberhasilan cryopreservation *Phaeodactylum*

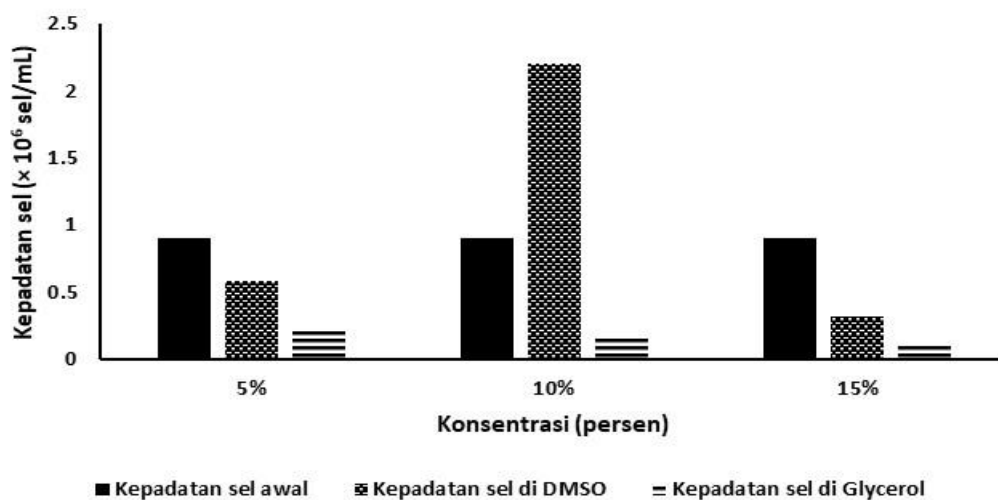
tricornutum dipengaruhi oleh morphotype, jenis cryoprotectant, dan konsentrasi yang digunakan. Evaluasi dilakukan dengan membandingkan kepadatan sel awal dengan kepadatan sel setelah dua minggu kultur pasca-pemulihan dari penyimpanan beku pada suhu -80°C .

Pada morphotype fusiform (Gambar 1), kepadatan sel awal seragam pada seluruh perlakuan, yaitu $1,30 \times 10^6$ sel mL^{-1} . Setelah proses cryopreservation dan pemulihan, perlakuan DMSO menghasilkan peningkatan kepadatan sel yang tinggi pada konsentrasi 5% dan 10%, sedangkan pada konsentrasi 15% terjadi penurunan kepadatan sel. Perlakuan gliserol menunjukkan kepadatan sel yang relatif rendah pada konsentrasi 5%, namun meningkat pada konsentrasi 10% dan 15%.

Pada morphotype oval (Gambar 2), kepadatan sel awal juga seragam pada seluruh perlakuan, yaitu $9,0 \times 10^5$ sel mL^{-1} . Setelah pemulihan, perlakuan DMSO menunjukkan peningkatan kepadatan sel pada konsentrasi 10%, sementara pada konsentrasi 5% dan 15% kepadatan sel lebih rendah. Perlakuan gliserol pada morphotype oval menghasilkan kepadatan sel yang relatif rendah pada seluruh konsentrasi yang diuji.



Gambar 1. Titik Sampling Lokasi Penelitian Kepadatan sel *P. tricornutum* morphotype fusiform sebelum cryopreservation (kepadatan sel awal) dan setelah pemulihan kultur cair selama dua minggu menggunakan DMSO dan gliserol pada konsentrasi 5%, 10%, dan 15%. Data ditampilkan sebagai nilai rata-rata.

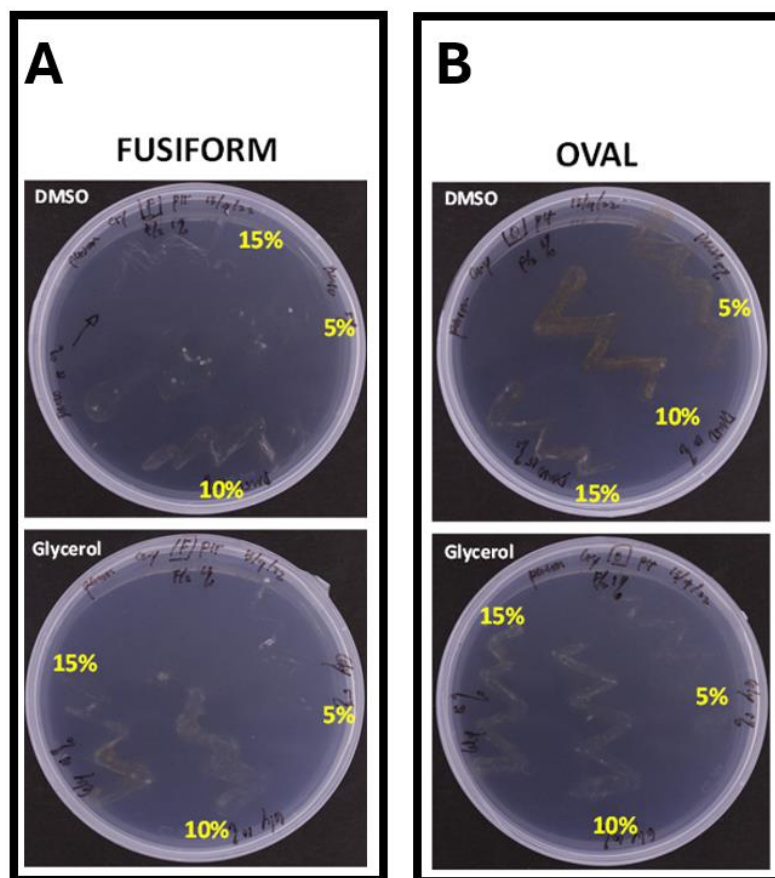


Gambar 2. Kepadatan sel *P. tricornutum* morphotype oval sebelum cryopreservation (kepadatan sel awal) dan setelah pemulihan kultur cair selama dua minggu menggunakan DMSO dan gliserol pada konsentrasi 5%, 10%, dan 15%. Data ditampilkan sebagai nilai rata-rata.

Pengamatan visual pada media agar F/2 (Gambar 3) menunjukkan bahwa kedua morphotype mampu tumbuh kembali setelah proses cryopreservation. Namun, intensitas dan kepadatan koloni yang terbentuk berbeda antar morphotype, di mana morphotype oval memperlihatkan pertumbuhan koloni yang lebih jelas dan padat dibandingkan morphotype fusiform.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa respons cryopreservation *P. tricornutum* bersifat morphotype-specific, di mana morphotype fusiform dan oval menunjukkan pola pemulihan yang berbeda terhadap jenis dan konsentrasi cryoprotectant. Temuan ini sejalan dengan laporan sebelumnya yang menyatakan bahwa morphotype *P. tricornutum* tidak hanya mencerminkan variasi morfologi, tetapi juga berkaitan dengan perbedaan fisiologis dan strategi adaptasi terhadap stres lingkungan (Ma *et al.*, 2021, Chuberre *et al.*, 2022, Hong *et al.*, 2023, Hao *et al.*, 2025).

Pada kultur cair, morphotype fusiform menunjukkan peningkatan kepadatan sel yang relatif tinggi pada perlakuan DMSO dengan konsentrasi rendah hingga menengah. DMSO dikenal sebagai cryoprotectant permeabel yang mampu menembus membran sel dan mengurangi pembentukan kristal es intraseluler selama proses pembekuan (Weng dan Beauchesne, 2020, Prieto-Guevara *et al.*, 2023, Aarattuthodi *et al.*, 2025). Namun, penurunan kepadatan sel pada konsentrasi DMSO yang lebih tinggi menunjukkan adanya efek toksik yang dapat mengganggu integritas membran dan keseimbangan osmotik sel. Hal ini konsisten dengan studi yang menunjukkan bahwa penggunaan DMSO pada konsentrasi tinggi dalam cryopreservation dapat meningkatkan apoptosis, kerusakan DNA, dan stres oksidatif pada sel eukariotik pasca-thaw serta bahwa cryoprotectant seperti DMSO dapat memiliki efek toksik pada viabilitas sel bila melebihi ambang toleransi (misalnya dalam kultur mikroalga), sehingga menimbulkan kebutuhan akan pendekatan cryopreservation yang lebih selektif dan optimal untuk setiap organisme (Foo *et al.*, 2023, Ding *et al.*, 2024).



Gambar 3. Pertumbuhan kembali *P. tricornutum* morphotype (A) fusiform dan (B) oval pada media agar F/2 setelah proses cryopreservation menggunakan DMSO dan gliserol pada berbagai konsentrasi.

Perlakuan gliserol menunjukkan pola respons yang berbeda, terutama pada morphotype fusiform, di mana peningkatan kepadatan sel terjadi pada konsentrasi menengah hingga tinggi. Gliserol memiliki toksisitas yang relatif lebih rendah dibandingkan DMSO, tetapi penetrasinya ke dalam sel berlangsung lebih lambat, sehingga efektivitasnya dalam melindungi struktur sel selama pembekuan dan pencairan sangat dipengaruhi oleh karakteristik fisiologis sel dan kemampuan adaptasi osmotik serta interaksi membran yang berbeda dibanding DMSO, yang umumnya lebih cepat menembus membran sel namun dapat bersifat lebih toksik pada konsentrasi tinggi (Vozovyyk *et al.*, 2023, Aarattuthodi *et al.*, 2025, Ramasamy *et al.*, 2025).

Morphotype oval menunjukkan kepadatan sel yang relatif lebih rendah pada kultur cair pasca-pemulihan pada seluruh perlakuan cryoprotectant. Hal ini mengindikasikan bahwa morphotype oval memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap stres pembekuan dan pencairan. Perbedaan respons antar morphotype ini diduga berkaitan dengan variasi struktur sel, rasio luas permukaan terhadap volume, serta regulasi metabolisme yang memengaruhi toleransi terhadap stres fisik ekstrem (Su *et al.*, 2023, Ding *et al.*, 2023).

Menariknya, hasil pengamatan pada media agar menunjukkan bahwa morphotype oval membentuk koloni yang lebih jelas dan padat dibandingkan morphotype fusiform. Fenomena ini menunjukkan bahwa kemampuan bertahan hidup dan membentuk koloni awal pada media padat tidak selalu sejalan dengan laju pertumbuhan sel pada fase kultur cair. Perbedaan antara fase recovery awal dan fase proliferasi lanjutan juga telah dilaporkan pada studi cryopreservation mikroalga lainnya (Scarborough dan Wirschell, 2016, Boswell *et al.*, 2021).

Perbedaan respons antara media padat dan cair menegaskan bahwa evaluasi keberhasilan cryopreservation mikroalga sebaiknya tidak hanya didasarkan pada satu parameter pertumbuhan. Penggunaan kombinasi pendekatan kuantitatif dan observasi visual memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai kemampuan pemulihan sel pasca-penyimpanan beku (Bui *et al.*, 2013, Chernobai *et al.*, 2025).

Selain itu, *P. tricornutum* telah banyak digunakan sebagai organisme model dalam studi stres dan fisiologi mikroalga karena kemudahan kultur serta ketersediaan informasi genomiknya yang relatif lengkap (Russo *et al.*, 2023, Wang dan Hu, 2025, Sérès *et al.*, 2025). Berbagai penelitian juga menunjukkan bahwa variasi respons pertumbuhan dan stres pada diatom sangat dipengaruhi oleh kondisi kultur dan karakter seluler spesifik, termasuk bentuk dan ukuran sel (Liu *et al.*, 2024, Hattich *et al.*, 2024, Zhao *et al.*, 2025).

Keberhasilan pemulihan kultur pasca-cryopreservation juga sangat bergantung pada kondisi media dan teknik kultur lanjutan, seperti penggunaan media F/2 serta metode pemindahan koloni dari media padat ke media cair (de Almeida *et al.*, 2024). Dalam konteks aplikasi bioteknologi, optimasi penyimpanan mikroalga melalui cryopreservation memiliki peran penting dalam mendukung keberlanjutan koleksi kultur dan pemanfaatan mikroalga bernilai tinggi secara berkelanjutan (Abreu *et al.*, 2012, Ali *et al.*, 2021).

Penelitian ini memiliki keterbatasan pada ketersediaan data ulangan individu, sehingga analisis dilakukan berdasarkan nilai rata-rata dan interpretasi hasil bersifat deskriptif. Meskipun demikian, hasil yang diperoleh tetap memberikan informasi awal yang relevan mengenai respons morphotype-specific *P. tricornutum* terhadap cryopreservation dan dapat menjadi dasar bagi penelitian lanjutan dengan pendekatan eksperimental yang lebih komprehensif.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa keberhasilan cryopreservation *Phaeodactylum tricornutum* dipengaruhi oleh morphotype serta jenis dan konsentrasi cryoprotectant yang digunakan. Morphotype fusiform dan oval memperlihatkan respons pemulihan yang berbeda pada kultur cair dan media padat, yang mengindikasikan adanya perbedaan fisiologis yang bersifat morphotype-specific. DMSO dan gliserol menunjukkan efektivitas yang bervariasi tergantung pada konsentrasi dan morphotype, sehingga optimasi protokol cryopreservation perlu mempertimbangkan variasi intra-spesies. Temuan ini memberikan dasar bagi pengembangan strategi penyimpanan jangka panjang mikroalga yang lebih selektif dan efisien.

DAFTAR PUSTAKA

- Aarattuthodi, S., Kang, D., Gupta, S.K., Chen, P., Redel, B., Matuha, M., Mohammed, H. & Sinha, A.K. 2025. Cryopreservation of biological materials: applications and economic perspectives. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 1–24. DOI: 10.1007/s11626-025-01027-0.
- Abreu, L., Borges, L.D.V., Marangoni, J.C. & 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.
- Akhoondi, M., Oldenhof, H., Sieme, H. & Wolkers, W.F. 2012. Freezing-induced cellular and membrane dehydration in the presence of cryoprotective agents. *Molecular Membrane Biology*, 29: 197–206. DOI: 10.3109/09687688.2012.699106.
- Ali, P., Fucich, D., Shah, A.A., Hasan, F. & Chen, F. 2021. Cryopreservation of Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae Using Exopolysaccharide Extracted from a Glacier Bacterium. *Microorganisms*, 9: 395. DOI: 10.3390/microorganisms9020395.
- Best, B.P. 2015. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Research*, 18: 422–436. DOI: 10.1089/rej.2014.1656.
- Boswell, J., Lindsey, C.R., Cook, E., Rosenzweig, F. & Herron, M. 2021. Cryopreservation of clonal and polyclonal populations of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biology Methods and Protocols*, 6: bpab011. DOI: 10.1093/biomethods/bpab011.
- Bui, T.V., Ross, I.L., Jakob, G. & Hankamer, B. 2013. Impact of procedural steps and cryopreservation agents in the cryopreservation of chlorophyte microalgae. *PLoS One*, 8: e78668. DOI: 10.1371/journal.pone.0078668.
- Chernobai, N., Gerilovych, A. & Shevchenko, N. 2025. Biotechnological potential of microalgae: storage methods and non-cryogenic factors of cryopreservation efficiency. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 35: 57–67. DOI: 10.15407/cryo35.02.057.
- Chubierre, C., Chan, P., Walet-Balieu, M.-L., Thiébert, F., Burel, C., Hardouin, J., Gügi, B. & Bardor, M. 2022. Comparative proteomic analysis of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* reveals new insights into intra- and extra-cellular protein contents of its oval, fusiform, and triradiate morphotypes. *Frontiers in Plant Science*, 13: 673113. DOI: 10.3389/fpls.2022.673113.
- De Almeida, A.C.A., Da Silva Vaz, B., Costa, J.a.V. & De Morais, M.G. 2024. Innovative technology for microalgal cell preservation through immobilization in polylactic acid nanofibers. *Algal Research*. DOI: 10.1016/j.algal.2024.103781.
- De Martino, A., Bartual, A., Willis, A., Meichenin, A., Villazán, B., Maheswari, U. & Bowler, C. 2011. Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, 162: 462–481. DOI: 10.1016/j.protis.2011.02.002.
- Ding, W., Ye, Y., Yu, L., Liu, M. & Liu, J. 2023. Physiochemical and molecular responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to illumination transitions. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16: 103. DOI: 10.1186/s13068-023-02352-w.
- Ding, Y., Liu, S., Liu, J., Jin, S. & Wang, J. 2024. Cryopreservation with DMSO affects the DNA integrity, apoptosis, cell cycle and function of human bone mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 114: 104847. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2024.104847.
- Elshobary, M.E., Abo-Shanab, W.A., Ende, S.S., Alquraishi, M. & El-Shenody, R.A. 2025. Optimizing *Phaeodactylum tricornutum* cultivation: integrated strategies for enhancing biomass, lipid, and fucoxanthin production. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 18: 7. DOI: 10.1186/s13068-024-02602-5.
- Foo, S.C., Mok, C.Y., Ho, S.Y. & Khong, N.M. 2023. Microalgal culture preservation: Progress, trends and future developments. *Algal Research*, 71: 103007. DOI: 10.1016/j.algal.2023.103007.
- Galas, L., Burel, C., Schapman, D., Ropitiaux, M., Bernard, S., Bénard, M. & Bardor, M. 2021. Comparative structural and functional analyses of the fusiform, oval, and triradiate morphotypes of *Phaeodactylum tricornutum* Pt3 strain. *Frontiers in Plant Science*, 12: 638181. DOI: 10.3389/fpls.2021.638181.
- Guillard, R.R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings—1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals* Greenport, 29–60. Springer.

- Guillard, R.R. & Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229–239. DOI: 10.1139/m62-029.
- Hao, T.-B., Lai, P.-Y., Shu, Z., Liang, R., Chen, Z.-Y., Huang, R.-L., Lu, Y. & Alimujiang, A. 2025. Physiological and metabolic fluctuations of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under water scarcity. *Frontiers in Microbiology*, 16: 1555989. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1555989.
- Hattich, G., Jokinen, S., Sildever, S., Gareis, M., Heikkinen, J., Junghardt, N., Segovia, M., Machado, M. & Sjöqvist, C. 2024. Temperature optima of a natural diatom population increases as global warming proceeds. *Nature Climate Change*, 14: 518–525. DOI: 10.1038/s41558-024-01981-9.
- Hong, T., Huang, N., Mo, J., Chen, Y., Li, T. & Du, H. 2023. Transcriptomic and physiological responses of a model diatom (*Phaeodactylum tricornutum*) to heat shock and heat selection. *Ecological Indicators*, 153: 110420. DOI: 10.1016/j.ecolind.2023.110420.
- Kapoor, 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. DOI: 10.1038/s41598-019-38588-6.
- Liu, C., Li, L., Yang, S., Wang, M., Zhang, H. & Li, S. 2024. Multi-omic insights into the cellular response of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) strains under grazing pressure. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1308085. DOI: 10.3389/fpls.2023.1308085.
- Ma, J., Zhou, B., Chen, F. & Pan, K. 2021. How marine diatoms cope with metal challenge: Insights from the morphotype-dependent metal tolerance in *Phaeodactylum tricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208: 111715. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111715.
- 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. DOI: 10.3390/cells12040562.
- Ramasamy, T., Tevatia, R., Ali, S., Muhle, A., Knight-Connoni, V. & Chakraborty, N. 2025. Proteomic approach for evaluating cryoprotectant formulations for enhanced post-cryopreservation recovery of yeast. *Scientific Reports*, 15: 15474. DOI: 10.1038/s41598-025-00534-0.
- Russo, M.T., Rogato, A., Jaubert, M., Karas, B.J. & Falcatore, A. 2023. *Phaeodactylum tricornutum*: an established model species for diatom molecular research and an emerging chassis for algal synthetic biology. *Journal of Phycology*, 59: 1114–1122. DOI: 10.1111/jpy.13400.
- Scarbrough, C. & Wirschell, M. 2016. Comparative analysis of cryopreservation methods in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cryobiology*, 73: 291–295. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2016.07.011.
- Sérès, Y., Serbutoviez-Verville, C., Bonnarde, R., Schilling, M., Simon, M., Salvaing, J., Jouhet, J., Maréchal, E. & Amato, A. 2025. Decoupling of plastid and endomembrane homeoviscous response to low temperature and darkness in *Phaeodactylum tricornutum*. *BMC Plant Biology*, 25: 1436. DOI: 10.1186/s12870-025-07406-9.
- Su, Y., Xu, M., Brynjólfsson, S. & Fu, W. 2023. Physiological and molecular insights into adaptive evolution of the marine model diatom *Phaeodactylum tricornutum* under low-pH stress. *Journal of Cleaner Production*, 412: 137297. DOI: 10.1016/j.jclepro.2023.137297.
- Vozovik, K., Chernobai, N., Kadnikova, N. & Shevchenko, N. 2023. Effect of Cryoprotective Solutions on Metabolic Activity of *Chlorococcum dissectum* and *Dunaliella salina* Cell Cultures. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 33: 014–024. DOI: 10.15407/cryo33.01.014.
- Wang, S. & Hu, Z. 2025. The marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* as a versatile bioproduction chassis: Current progress, challenges and perspectives. *Plant Communications*. DOI: 10.1016/j.xplc.2025.101519.
- Weng, L. & Beauchesne, P.R. 2020. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. *Cryobiology*, 94: 9–17. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.03.012.
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R.P., Mendoza, A., Alexander, M. & Lakey, J.R. 2021. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation*, 30: 0963689721999617. DOI: 10.1177/0963689721999617.
- Zhao, W., Liu, J., Song, H., Chen, B., Ji, H., Yang, X. & Li, G. 2025. Responses of Different Temperature-Acclimated Diatom Species, Smaller *Thalassiosira pseudonana* and Larger *Thalassiosira rotula*, to Increased Ambient Temperature. *Microorganisms*, 13: 1652. DOI: 10.3390/microorganisms13071652.