

## PRESERVAÇÃO DE *Chlorella* sp POR RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

[Preservation of *Chlorella* sp by cooling and freezing]

Márcia Santos Nunes GALVÃO<sup>1,5</sup>  
Celina Maria Marcondes PIMENTEL<sup>2</sup>  
Ronaldo Almeida da SILVA<sup>3</sup>  
Naoyo YAMANAKA<sup>4</sup>

### RESUMO

Culturas de *Chlorella* sp, previamente centrifugadas e não centrifugadas, foram mantidas em refrigerador e em "freezer" (sem crioprotetor), a fim de verificar a viabilidade de sua preservação por períodos de 1 a 28 meses. Constatou-se que a espécie resiste à estocagem tanto por congelamento como por resfriamento, por períodos de até 28 meses. No entanto, culturas de material resfriado e previamente centrifugado apresentaram maior crescimento populacional que as submetidas aos demais tratamentos, tendo atingido a densidade de  $10 \times 10^6$  células/ml em poucos dias, após cada período de estocagem. A fase "lag" foi mais longa quanto maior o período de estocagem, para todos os tratamentos testados, sendo que após o 9º mês de estocagem a reativação tornou-se sensivelmente mais lenta. A preservação de culturas centrifugadas, em refrigerador comum, é um método simples e de utilidade na aquicultura, pois permite a estocagem de grande número de células em pequeno volume.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Chlorella* sp, preservação, centrifugação, resfriamento, congelamento

### ABSTRACT

Cultures of *Chlorella* sp previously centrifuged and not centrifuged were kept in a refrigerator and freezer (without cryoprotector) with the purpose to test the possibility of preservation of this microalgae through periods from 1 to 28 months. It was observed that this species can be maintained by cooling as well as by freezing until 28 months. However, the cooled and previously centrifuged material grew up faster and better than the materials from the other treatments, reaching density to  $10 \times 10^6$  cells/ml in a few days after each storage period. The lag phase became longer when the storage period increased. After the 9th month of storage the recovering time was considerably longer. The preservation of centrifuged cultures in a domestic refrigerator is a simple method which may be utilized in aquaculture for it makes possible the storage of a great number of cells in a small volume.

**KEY WORDS:** *Chlorella* sp, preservation, centrifugation, cooling, freezing

## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas são extensivamente utilizadas na aquicultura, tanto para melhorar a qualidade da água quanto para alimentar organismos zooplancônicos e outros tais como, camarões e moluscos. Um dos maiores problemas, no entanto, é sua produção em quantidade suficiente para atender à demanda em sistema de criação. Vários estudos vêm sendo realizados para aperfeiçoar métodos relacio-

nados à produção massiva de várias espécies de microalgas (TROTTE, 1981; WITT et alii, 1981; SPEKTOROVA et alii, 1981/1982; SPEKTOROVA et alii, 1986a,b; CAMACHO et alii, 1990; SPEKTOROVA et alii, 1991). Essa produção, por sua vez, é bastante trabalhosa e onerosa. Muitas vezes, ela se restringe a um curto espaço de tempo, concomitante com o período do ciclo de vida dos animais que,

(1) Engenheiro Agrônomo - Seção de Maricultura - Divisão de Pesca Marítima - Instituto de Pesca - CPA/SAA  
(2) Biologista - FUNDEPAG - Seção de Maricultura - Divisão de Pesca Marítima - Instituto de Pesca - CPA/SAA  
(3) Biologista (estagiário) - Bolsista do CNPq - Seção de Maricultura - Divisão de Pesca Marítima - Instituto de Pesca - CPA/SAA  
(4) Pesquisador Científico - Seção de Maricultura - Divisão de Pesca Marítima - Instituto de Pesca - CPA/SAA  
(5) Endereço/Address: Av. Bartholomeu de Gusmão, 192 - CEP 11030-900, Santos, SP, Brasil

direta ou indiretamente, necessitam de microalgas. Além disso, há riscos de perda dessa produção de microalga ocasionados por condições ambientais adversas.

Assim, a preservação de culturas fitoplantônicas é de importância fundamental para se armazenar cepas que servirão para iniciar novos cultivos, bem como para conservar a biomassa fitoplantônica, concentrada ou não, que poderá ser utilizada diretamente na alimentação de organismos aquáticos (SILVA & OLIVEIRA, 1991). Desta maneira, minimizam-se os gastos com mão-de-obra e previne-se contra o risco de perda das culturas de microalgas.

Vários métodos são utilizados na preservação de microalgas e, entre eles, a criopreservação e a liofilização (HOLM-HANSEN, 1963; McGRATH & DAGGETT, 1977; TSURU, 1973; MORRIS, 1978; BEN-AMOTZ & GILBOA, 1980),

através dos quais as células mantêm-se vivas durante vários anos. No entanto, ambos requerem equipamentos apropriados e técnicas acuradas. Outro método, bastante simples, é a conservação de culturas em refrigerador e "freezer" comuns. UMEBAYASHI (1972) usou a refrigeração como um conveniente método para preservação, mantendo várias espécies de diatomáceas em condições de frio e baixa temperatura, em um refrigerador doméstico, por até 34 meses.

Este trabalho objetivou verificar a viabilidade da preservação de culturas de *Chlorella* sp, previamente centrifugadas e não centrifugadas, em refrigerador e em "freezer", por períodos de 1 a 28 meses, considerando-se o fácil cultivo e a boa aceitabilidade dessa espécie como alimento por diferentes espécies zooplantônicas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no período de novembro de 1988 a março de 1991, no laboratório da Seção de Maricultura, da Divisão de Pesca Marítima, do Instituto de Pesca, em Santos (SP).

Culturas de *Chlorella* sp, provenientes de matrizes mantidas no laboratório em erlenmeyers de 250 ml, foram transferidas para balão de 6 L contendo 5 L de água do mar autoclavada, enriquecida com meio Conway (YONESHIGUE, 1978 - comunicação pessoal). Esse balão ficou exposto à luz de duas lâmpadas fluorescentes (luz do dia) de 40 W, por períodos de 12 horas, sob forte aeração e temperatura ao redor de 25°C. Após sete dias, quando na fase exponencial de crescimento, estocou-se a cultura em condições de escuro e baixa temperatura, utilizando-se dois métodos: congelamento e resfriamento.

### 1) Preservação por congelamento:

Distribuiu-se parte da cultura em doze sacos plásticos, contendo 200 ml cada um, os

quais foram colocados diretamente em "freezer" comum, à temperatura de -5°C.

### 2) Preservação por resfriamento:

Outra parte (1,5 L) foi colocada em um balão de 2 L e estocada em refrigerador, à temperatura de 8°C.

Centrifugou-se o restante da cultura (1,1 L) a uma rotação de 3 500 rpm durante 20 min. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e o material concentrado foi retirado com o auxílio de pipeta Pasteur e distribuído em doze tubos de ensaio. A seguir, vedaram-se os tubos no bocal, com papel parafinado e papel de alumínio, para armazenagem no refrigerador. As culturas recebiam luz ocasionalmente, quando o refrigerador era aberto.

Após cada período de estocagem, que variou de 1 a 28 meses, retiraram-se amostras das culturas congeladas e refrigeradas (centrifugadas e não centrifugadas), que foram introduzidas em erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de água do mar com meio Conway. Para cada tratamento utilizaram-se dois erlenmeyers. Os frascos foram

mantidos sob luz fluorescente (duas lâmpadas de 40 W) e temperatura ao redor de 25°C.

Acompanhou-se o crescimento populacional das culturas após a inoculação, através

de contagens diárias em câmara de Neubauer. Retiraram-se duas amostras de cada frasco, num total de quatro contagens por frasco.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostram que *Chlorella* sp resiste à estocagem, tanto por congelamento como por resfriamento, durante períodos de até 28 meses.

De acordo com a FIGURA 1, o material resfriado e previamente centrifugado apresentou sempre maior crescimento populacional que os demais. As culturas congeladas mostraram o pior resultado, observando-se que algumas delas, relativas a determinados períodos de estocagem, não apresentaram crescimento ou tiveram uma fase de indução ou fase "lag" (período no qual não ocorre aumento do número de células) bastante longa.

Pelas TABELAS 1 e 2 observa-se que as culturas resfriadas e previamente centrifugadas, após cada período de estocagem, atingiram em poucos dias altas densidades populacionais (cerca de  $10 \times 10^6$  células/ml). Verifica-se que, por exemplo, para sete meses de estocagem, em apenas seis dias de cultivo, *Chlorella* sp alcançou uma densidade de  $14,6 \times 10^6$  células/ml, concentração essa satisfatória para utilização prática em aquicultura. Para os demais tratamentos, o crescimento foi mais lento a partir do 3º mês de estocagem, demorando vários dias para atingir essa mesma concentração, como no caso das culturas congeladas.

A TABELA 3 mostra que quanto maior o período de estocagem, mais longa a fase "lag" para os três tratamentos testados. As culturas resfriadas e previamente centrifugadas e estocadas até o 9º mês reativaram-se imediatamente ou apresentaram uma fase "lag" bastante curta.

O pior desempenho das culturas congeladas está relacionado, provavelmente, aos da-

nos irreparáveis que ocorreram nas células devido ao aumento da pressão osmótica extracelular provocado pelo congelamento, resultando, segundo McGANN & WALTERSON (1987) e MORRIS; COULSON; CLARKE (1988), no efluxo de água da célula para o meio e na formação de gelo intracelular. Nesses casos, o uso de crioprotetores é indicado para evitar ou minimizar as injúrias causadas às células, principalmente quando estas são expostas a temperaturas abaixo de 0°C.

Neste experimento, não se utilizou qualquer tipo de crioprotetor. Mesmo assim, *Chlorella* sp mostrou certa tolerância quando submetida à temperatura de -5°C, uma vez que houve reativação da cultura após alguns períodos de estocagem, embora tenha apresentado fase "lag" mais longa e menor crescimento que as culturas mantidas em refrigerador. Muitas células apresentavam-se também em bom estado de conservação morfológica.

No que se refere às culturas centrifugadas e não centrifugadas, é possível que o melhor desempenho das primeiras seja devido à sua maior pureza. O processo de centrifugação é utilizado, principalmente, com essa finalidade. VIEIRA (1975) utilizou esse método, trocando o sobrenadante por meio de cultura novo e variando a velocidade a cada centrifugação, com o objetivo de eliminar a maior quantidade possível de bactérias em suspensão ou agregadas às células. No presente trabalho, com a eliminação do sobrenadante, embora não tenha sido feita a lavagem da cultura, muitas bactérias devem ter sido removidas, aumentando a sua pureza. Outra hipótese é a de que o processo selecionaria as células mais resistentes, eliminando as mais velhas e as

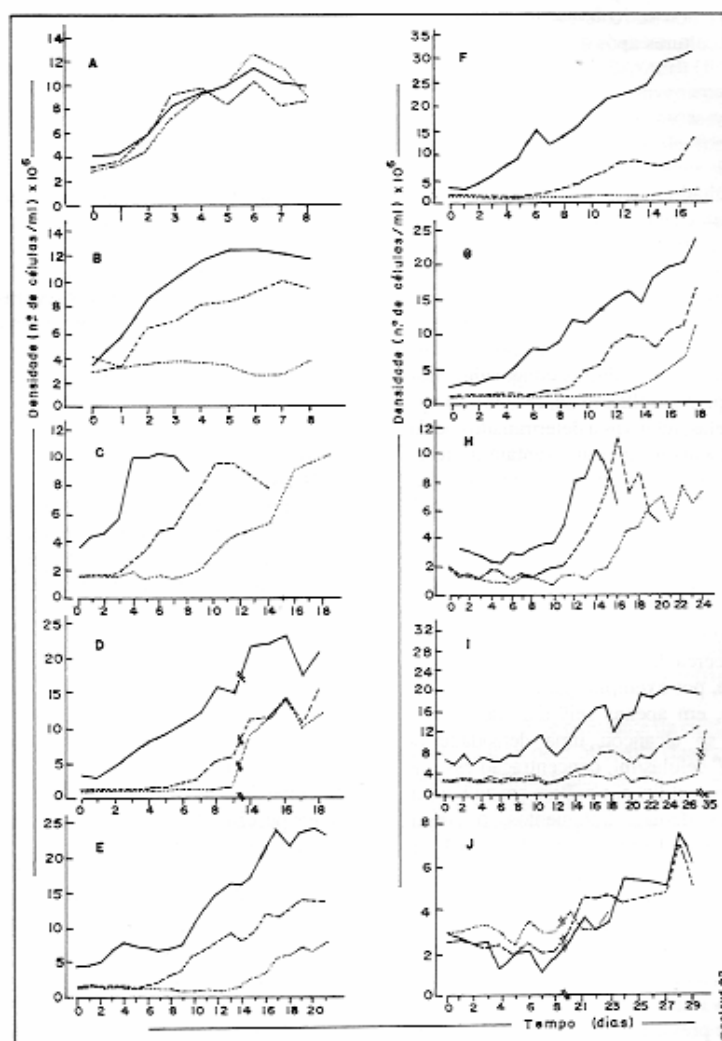


FIGURA 1 - Crescimento populacional de *Chlorella* sp após vários períodos de estocagem: A) 1; B) 2; C) 3; D) 4; E) 6; F) 7; G) 9; H) 12; I) 16; e J) 28 meses, e nos diferentes tratamentos: resfriado e previamente centrifugado (—), resfriado e não centrifugado (---) e congelado (....)

TABELA 1

Número de dias para *Chlorella* sp alcançar a concentração de  $10 \times 10^6$  células/ml, após cada período de estocagem

| Métodos de preservação | Meses de estocagem |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------------------------|--------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                        | 1                  | 2 | 3  | 4  | 6  | 7  | 9  | 12 | 16 | 19 | 28 |
| Resfriamento           |                    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| - centrifugado         | 3                  | 4 | 6  | 10 | 5  | 8  | 14 | 9  | -  | -  | -  |
| - não centrifugado     | 6                  | 7 | 11 | 14 | 16 | 17 | 16 | 16 | 24 | -  | -  |
| Congelamento           | 5                  | - | 18 | 15 | -  | -  | 18 | -  | 35 | -  | -  |

O traço corresponde a concentração abaixo de  $10 \times 10^6$  células/ml.

TABELA 2

Concentração ( $\times 10^6$  células/ml) alcançada em 6 dias de cultivo após cada período de estocagem

| Métodos de preservação | Meses de estocagem |      |      |      |     |      |     |    |    |    |    |
|------------------------|--------------------|------|------|------|-----|------|-----|----|----|----|----|
|                        | 1                  | 2    | 3    | 4    | 6   | 7    | 9   | 12 | 16 | 19 | 28 |
| Resfriamento           |                    |      |      |      |     |      |     |    |    |    |    |
| - centrifugado         | 11,3               | 12,4 | 10,2 | 10,9 | 7,0 | 14,6 | 7,7 | -  | -  | -  | -  |
| - não centrifugado     | 10,2               | 9,1  | 4,8  | 2,4  | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  |
| Congelamento           | 12,5               | -    | -    | -    | -   | -    | -   | -  | -  | -  | -  |

O traço corresponde a ausência de crescimento em 6 dias de cultivo.

TABELA 3

Número de dias decorridos para se observar aumento do número de células (fase de indução ou fase "lag"), em culturas reativadas, após cada período de estocagem

| Métodos de preservação | Meses de estocagem |   |   |   |    |   |    |    |    |    |    |
|------------------------|--------------------|---|---|---|----|---|----|----|----|----|----|
|                        | 1                  | 2 | 3 | 4 | 6  | 7 | 9  | 12 | 16 | 19 | 28 |
| Resfriamento           |                    |   |   |   |    |   |    |    |    |    |    |
| - centrifugado         | 0                  | 0 | 0 | 1 | 0  | 1 | 2  | 8  | 6  | -  | 8  |
| - não centrifugado     | 0                  | 0 | 3 | 5 | 6  | 5 | 7  | 10 | 12 | -  | 17 |
| Congelamento           | 0                  | - | 8 | 9 | 12 | - | 12 | 13 | -  | -  | -  |

O traço corresponde a ausência de crescimento.

mais fracas, as quais, quando inoculadas em meio de cultura, não mais se reproduziam. De fato, observou-se uma resposta mais rápida nas culturas centrifugadas, que entraram rapidamente na fase exponencial, apresentando uma fase "lag" bastante curta ou inexistente.

Segundo FOGG (1965), uma fase "lag" durante a multiplicação de células pode ser considerada: a) aparente, quando um grande número de células inoculadas não são viáveis; b)

real, quando a maioria das células inoculadas são viáveis, mas sem condições de se dividirem imediatamente. Assim, uma fase "lag" mais longa em função do tempo de estocagem, como ocorreu nas culturas congeladas, pode estar relacionada a essas duas situações. UMEBAYASHI (1972) observou atraso na recuperação de culturas de diatomáceas, quando preservadas no escuro e a baixas temperaturas por mais de um mês, e relacionou esse fato à baixa

sobrevivência e a uma diminuição do metabolismo das células. O mesmo autor trabalhou com cinco espécies de diatomáceas à temperatura ao redor de 5°C. Verificou que *Skeletonema costatum*, *Cyclotella nana* e *Chaetoceros calcitrans* sobreviveram por nove meses nessas condições, *Phaeodactylum tricornutum*, por 25 meses, e *Nitzschia closterium*, por 34 meses.

VIEIRA (1975) verificou que a diatomácea *P. tricornutum* e o fitoflagelado *Chlamydomonas* sp recuperaram sua capacidade de crescimento mesmo após terem sido mantidos em condições de escuro e baixa temperatura por mais de trinta dias. No entanto, outras espécies

de diatomáceas estudadas não se mostraram viáveis quando colocadas em condições normais de cultivo.

Por outro lado, verificou-se no presente experimento que *Chlorella* sp pode ser preservada, através dos métodos já descritos, por até 28 meses.

A possibilidade de se manterem culturas resfriadas e previamente centrifugadas permite, ainda, a estocagem de grande número de células em pequeno volume, podendo estas serem utilizadas diretamente na alimentação de organismos aquáticos ou para reiniciar novos cultivos, sendo, portanto, de grande aplicação prática na aquicultura.

#### 4. CONCLUSÕES

1. É possível estocar *Chlorella* sp por períodos de até 28 meses através de resfriamento e congelamento.

2. A preservação de culturas centrifugadas, em refrigerador comum, mostrou ser o método mais simples e eficiente.

#### AGRADECIMENTOS

À FUNDEPAG, pelo apoio financeiro. Aos estagiários, Carlos Henrique Della Mea Domingues, Elaine Abud, Alexandre Rodrigues

da Silva, e à auxiliar de laboratório, Ilda Maria, pela colaboração prestada.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEN-AMOTZ, A. & GILBOA, A. 1980 Cryopreservation of marine unicellular algae. II. Induction of freezing tolerance. *Marine Ecology*, 2: 221-4.
- CAMACHO, F.; MOLINA, E.; MARTÍNEZ, Ma. E.; SÁNCHEZ, S.; GARCÍA, F. 1990 Continuous culture of the marine microalga *Tetraselmis* sp - productivity analysis. *Aquaculture*, 90:75-84.
- FOGG, G. E. 1965 *Algal cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press, Madison, Milwaukee, London, 126 p.
- HOLM-HANSEN, O. 1963 Viability of blue-green and green algae after freezing. *Phys. Plant.*, 16:330-40.
- McGANN, L. & WALTERSON, M. L. 1987 Cryopreservation by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone. *Cryobiology*, 24: 11-6.
- McGRATH, M. S. & DAGGETT, P. M. 1977 Cryopreservation of flagellarmutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Can. J. Bot.*, 55(13): 1794-96.

