B. Inst. Pesca
23(único): 1 - 11, 1996

PRESERVAÇÃO DE DUAS MICROALGAS *Nannochloropsis oculata* E *Tetraselmis tetrathele* POR RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO*

[Preservation of two microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis tetrathele* by cooling and freezing]

Márcia Santos Nunes GALVÃO [1,2]
Naoyo YAMANAKA [1]
Shitiro TANJI [1]

RESUMO

Culturas de *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis tetrathele,* previamente centrifugadas e não centrifugadas, foram mantidas em refrigerador e "freezer" (sem crioprotetor) para verificar a viabilidade de sua preservação. *N. oculata* resistiu à estocagem tanto ao congelamento quanto ao resfriamento por períodos de até 15 meses, enquanto *T. tetrathele* resistiu a esses tratamentos, respectivamente, por 5 e 7 meses. O crescimento de células anteriormente congeladas foi acentuadamente mais lento, apresentando uma fase "lag" bastante longa (12 dias após o 3º e 5º mês de estocagem, respectivamente, para *N. oculata* e *T. tetrathele).* Constatou-se ainda, que nas culturas resfriadas a qualidade das células foi mantida, visto que uma vez reinoculadas, apresentaram o mesmo padrão de crescimento populacional daquelas que não foram submetidas à estocagem. O método mais simples e eficiente, para ambas espécies, foi o resfriamento de culturas não centrifugadas, embora haja a considerar que o processo de centrifugação permite estocar grande número de células em reduzidos volumes.

PALAVRAS-CHAVE: *Nannochloropsis oculata, Tetraselmis tetrathele,* preservação, resfriamento, congelamento, centrifugação, culturas

ABSTRACT

Cultures of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis tetrathele,* previously centrifuged and not centrifuged, were kept in a refrigerator and freezer (without crioprotector) to test the preservation of these microalgae. *N. oculata* could be maintained by freezing as well by cooling until 15 months, while *T. tetrathele* was maintained by these treatments, respectively, for 5 and 7 months. The frozen cultures growth was slower than the growth of cooled ones, and showed a very long lag phase (12 days after a storage of 3 and 5 months, respectively, for *N. oculata* and *T. tetrathele).* It was observed that the cell quality of the cooled cultures was preserved, once after its reinoculation these cultures presented the same pattern of population growth as did the cultures which were not stored up anytime. The most simple and efficient method, for both species, was the cooling method for not centrifuged cultures. Nevertheless it should be considered that centrifugation process makes possible the storage of a great number of cells in a small volume.

KEY WORDS: *Nannochloropsis oculata, Tetraselmis tetrathele,* preservation, cooling, freezing, centrifugation, cultures

* Artigo Científico - aprovado para publicação em 08/12/95
(1) Pesquisador Científico - Seção de Maricultura - Divisão de Pesca Marítima - Instituto de Pesca - CPA/SAA
(2) Endereço/Address: Av. Bartholomeu de Gusmão, 192 - CEP 11030-900 - Santos - SP - Brasil

GALVÃO, M.S.N.; YAMANAKA, N.; TANJI, S. 1996 Preservação de duas microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis tetrathele* por resfriamento e congelamento. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, *23* (único): 1-11.

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores críticos para o sucesso da produção comercial de muitos organismos marinhos é a disponibilidade de alevinos (SORGELOOS et alii, 1991). Este fato está relacionado à dificuldade e ao custo operacional para assegurar grandes quantidades de organismos-alimento de boa qualidade, especialmente microalgas e rotíferos (FULKS & MAIN, 1991).

O rotífero eurihalino, *Brachionus plicatilis,* é extensamente utilizado como organismo-alimento para uma grande variedade de larvas de peixes e crustáceos (LUBZENS, 1987). Uma vez que a produção de rotíferos é dependente da produção de fitoplâncton, a escassez desta última pode ter um impacto significativo no sucesso da criação de larvas (SATO, 1991). Além disso, os rotíferos precisam ser alimentados com uma microalga de boa qualidade, já que seu valor como dieta depende de seu alimento.

Nannochloropsis oculata (Droop) Hibberd, 1981 (Classe Eustigmatophyceae, Família Monopsidaceae) é uma das mais importantes microalgas utilizada mundialmente para o enriquecimento de rotíferos, devido a seu alto valor nutricional, principalmente em HUFA n-3 (ácidos graxos altamente insaturados), essenciais para o desenvolvimento de larvas de peixes marinhos (WATANABE; KITAJIMA ; FUJITA, 1983), e também vitamina B12 (OKAUCHI, 1991). *Tetraselmis tetrathele* (G. S. West) Butcher, 1959 (Classe Prasinophyceae, Família Chlorodendraceae) é usada, geralmente, como alimento para larvas de peneídeos e rotíferos *Brachionus plicatilis* (OKAUCHI, 1988; 1991).

A qualidade da microalga, no entanto, pode mudar com o estado da cultura e com as condições em que ela é mantida. Vários fatores podem afetar a composição química da alga, entre eles a temperatura (TESHIMA et alii, 1983), a idade da cultura, fase de crescimento, intensidade de luz, limitação de nutrientes e densidade de células (FUKUSHO, 1989; FULKS & MAIN, 1991).

A produção em massa de microalgas está sujeita ao declínio ocasional ("crashes") provocado por condições adversas, tais como contaminantes ou insuficiência de luz (OKAUCHI, 1991); e, além de ocupar um grande espaço das instalações de um criadouro ("hatchery"), o cultivo contínuo é bastante laborioso para os criadores.

Assim, a preservação destes alimentos durante o período que eles não são necessários é desejável (UMEBAYASHI, 1972) e pode reduzir drasticamente os custos em um sistema de produção (OKAUCHI, 1991).

De acordo com o Grupo de Discussão de Rotíferos (FULKS & MAIN, 1991), a solução para diminuição dos custos de produção de rotíferos é a descoberta de uma fonte não dispendiosa de alimento de alta qualidade tais como algas concentradas ou fermento enriquecido. No Japão, suspensões concentradas de *Chlorella* de água doce, *N. oculata e Monodopsis subterraneus* foram comercialmente desenvolvidas como alimento de *Brachionus plicatilis* (OKAUCHI, 1991). Linhagens de *Chlorella* têm sido produzidas em condições assépticas no escuro, reduzindo, dessa maneira, os custos de produção.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a viabilidade da estocagem de *N. oculata* e *T. tetrathele* durante períodos variando de um a quinze meses, utilizando dois métodos: resfriamento e congelamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido de maio de 1991 a agosto de 1992, no Laboratório de Maricultura da Divisão de Pesca Marítima, Instituto de Pesca (SP).

Nannochloropsis oculata e *Tetraselmis tetrathele* foram cultivadas em água do mar (30‰) enriquecida com meio Conway (YONESHIGUE, 1978 - comunicação pessoal) e solução vitamínica, em erlenmeyers de 250 ml e balões de vidro de fundo chato de 6 litros. A água do mar utilizada foi filtrada e esterilizada em autoclave a 1 kg/cm^2 e 121°C por 40 min. A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas (luz do dia) de 40 W, com fotoperíodo de 12 horas. Nos frascos de 6 litros, as culturas foram expostas à forte aeração suprida por um soprador radial e mantidas à temperatura ambiente (20 - 25° C). Os inóculos originais dessas espécies foram cedidos pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo.

Sete dias após a inoculação nos balões de 6 litros, as culturas foram estocadas em condições de escuro e baixa temperatura por dois métodos: congelamento e resfriamento.

1) Preservação por congelamento:

Uma parte das culturas foi distribuída em recipientes plásticos (200 ml) cobertos com parafilme e papel de alumínio e mantidos num "freezer" a -5° C. Nenhum crioprotetor foi utilizado.

2) Preservação por resfriamento:

Uma outra parte das culturas foi colocada em balões de fundo chato de 2 litros e estocadas em refrigerador a 8° C. O restante foi centrifugado a 4000 rpm por 15 min para *N. oculata* e 3000 rpm por 10 min para *T. tetrathele* em centrífuga Tomy Seiko. O sobrenadante foi descartado e o material concentrado foi retirado com uma pipeta Pasteur e distribuído em tubos de ensaio. A boca dos tubos foi coberta com parafilme e papel de alumínio antes dos tubos serem colocados no refrigerador.

Após cada período de estocagem, que variou de 1 a 15 meses para *N. oculata* e de 1 a 7 meses para *T. tetrathele*, amostras das culturas preservadas foram inoculadas em erlenmeyers (250 ml) contendo 100 ml de água do mar enriquecida. A densidade celular inicial foi ajustada para aproximadamente 200 x 10^4 células/ml para *N. oculata* e 20 x 10^4 células para *T. tetrathele* (FIGURA 1).

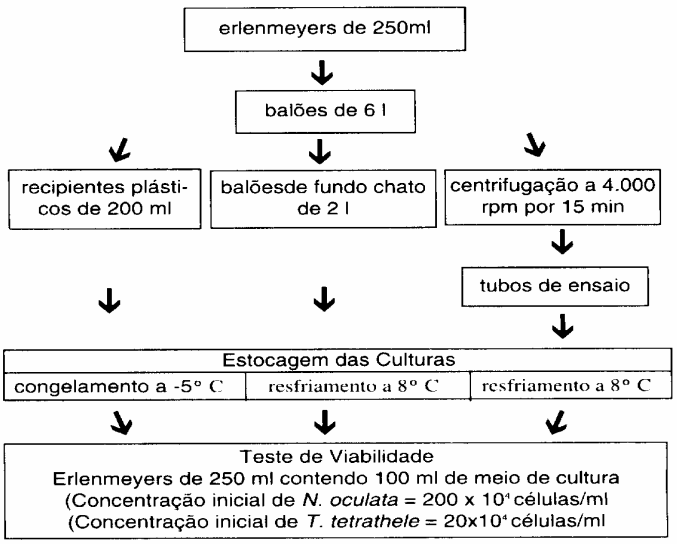

FIGURA 1 - Esquema do experimento

Os frascos foram colocados em câmara de aclimatação (REVCO) com temperatura (20°C) e fotoperíodo (12 horas) controlados. A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas (luz do dia) de 15 W dispostas horizontalmente e a 20 cm acima dos frascos. As culturas foram agitadas duas vezes ao dia para manter as células em suspensão.

Um tratamento controle foi usado como comparação. Culturas reinoculadas semanalmente e mantidas em câmara de aclimatação nas mesmas condições descritas acima foram usadas como controle.

Assim, os tratamentos testados podem ser resumidos como: 1.) controle; 2) resfriamento; 3) concentração (por centrifugação) e resfriamento; 4) congelamento. Foram usadas três réplicas para verificar o efeito dos tratamentos a cada período de estocagem.

O número de células foi contado a cada dois dias para *N. oculata* e diariamente para *T. tetrathele* com câmara hemocitométrica de Neubauer, durante um período de 30 e 20 dias, respectivamente. Foram tiradas duas amostras de cada frasco, num total de 6 amostras por tratamento. Os dados foram plotados em gráficos e as curvas resultantes foram analisadas.

3. RESULTADOS

As curvas de crescimento populacional encontram-se nas FIGURAS 2 e 3 para *N. oculata* e *T. tetrathele,* respectivamente.

Verifica-se que para *N. oculata* as curvas de crescimento populacional das culturas submetidas aos tratamentos 2 e 3 foram semelhantes às do controle (tratamento 1) em todos os períodos de estocagem (1 a 15 meses), indicando que esses 2 tratamentos não foram afetados por essa variável. Já as curvas representativas do tratamento 4 (culturas submetidas ao congelamento) mostraram um atraso no crescimento após cada período de estocagem.

Com relação a *T. tetrathele* o crescimento populacional apresentado após o 1º mês de estocagem foi semelhante para todos os tratamentos. Somente a partir do 3º mês é que se observa um atraso no crescimento nas culturas submetidas aos tratamento 3 e 4, sendo este mais acentuado no tratamento 3.

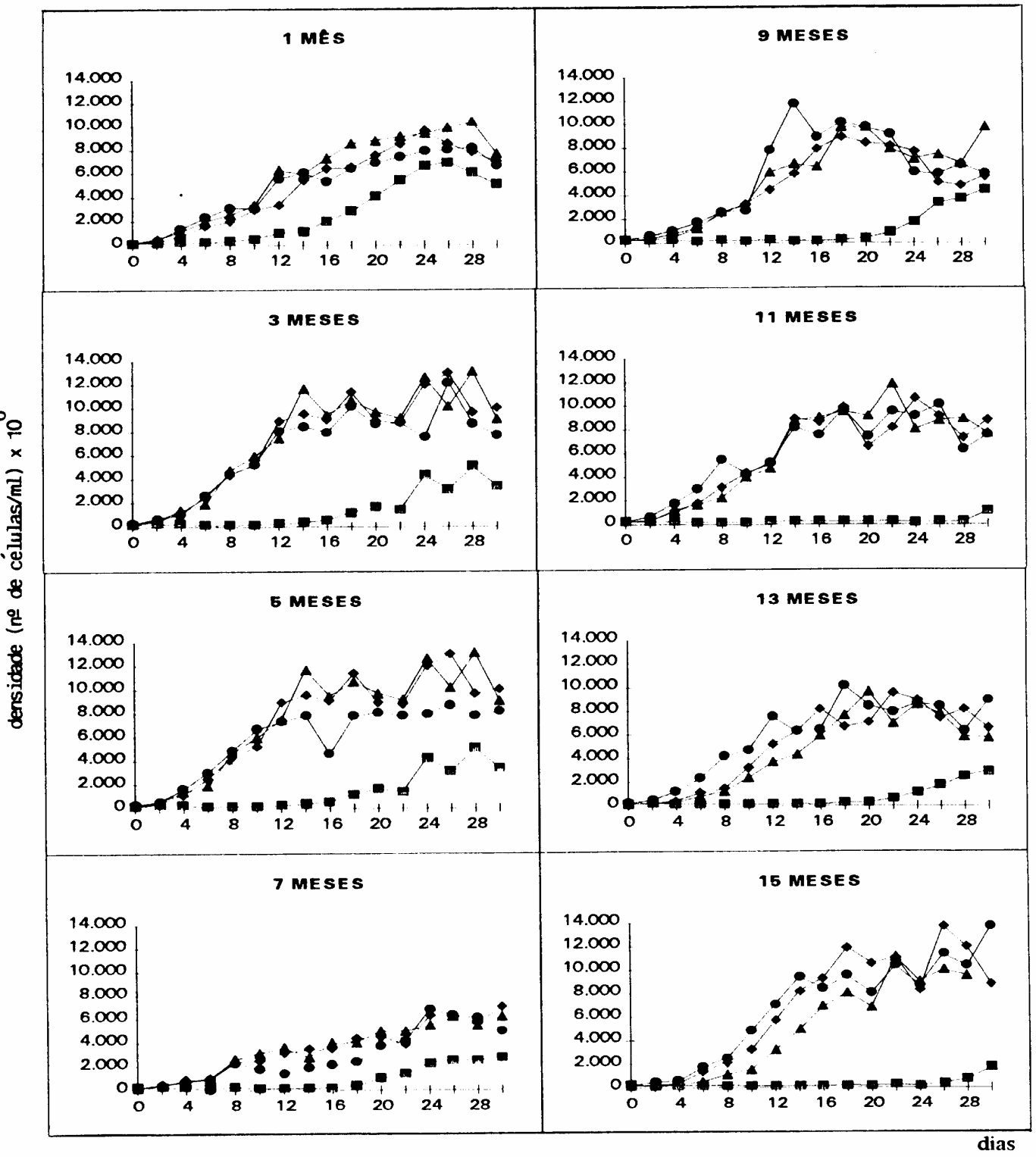

FIGURA 2 - Curvas de crescimento populacional de culturas de *N. oculata* submetidas aos tratamentos: 1) controle (•); 2) resfriamento (◆); 3) concentração e resfriamento (▲); e, 4) congelamento (■); após períodos de estocagem de: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 meses

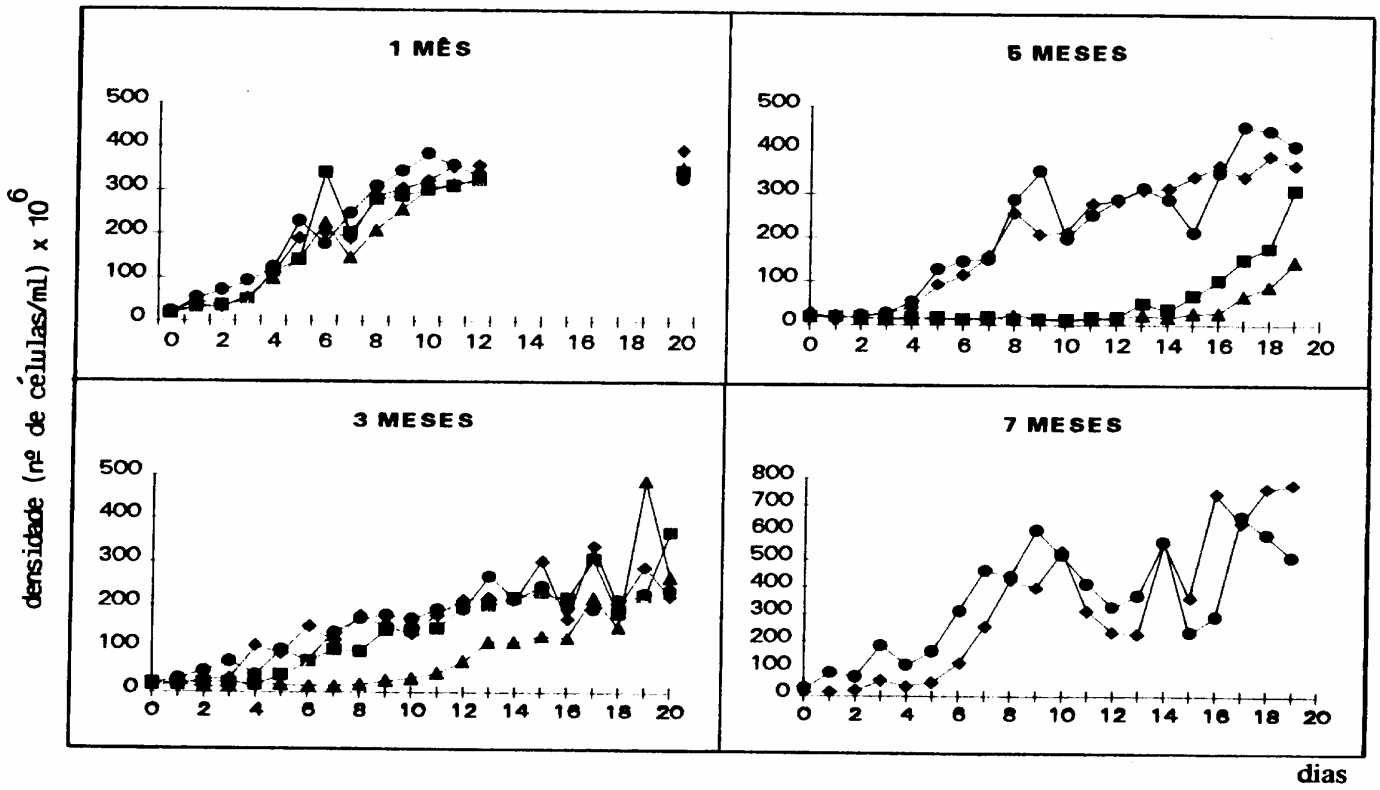

FIGURA 3- Curvas de crescimento populacional de culturas de *T. tetrathele* submetidas aos tratamentos: 1) controle (•); 2) resfriamento (◆); 3) concentração e resfriamento (▲); e, 4) congelamento (■); após períodos de estocagem de: 1, 3, 5 e 7 meses

É possível conferir esse fato pelos dados de duração (dias) da fase de indução ou fase "lag" (período no qual não ocorre aumento do número de células). Tanto para *N. oculata* (TABELA 1) como para *T. tetrathele* (TABELA 2), essa fase foi muito longa para os tratamentos 4 e, 3 e 4, respectivamente, tornando-se mais longa quanto maior o período de estocagem. Observa-se que no tratamento 4 em *N. oculata*, com 1 mês de estocagem, o número de células aumentou 6 dias após a inoculação e com 15 meses de estocagem isso ocorreu apenas a partir do 24° dia, enquanto nos demais tratamentos o aumento se dava de 1 a 2 dias após a inoculação. Já para *T. tetrathele* a fase de indução, após 3 meses de estocagem, foi de 9 e 4 dias, aumentando para 16 e 12 dias após 5 meses, para os tratamentos 3 e 4, respectivamente.

Após o 7º mês de estocagem para *N. oculata*, houve um problema com a câmara de aclimatação e os frascos tiveram que ser transferidos para outra câmara (FANEM), sob as mesmas condições de temperatura e de fotoperíodo, mas cujas lâmpadas estão fixas na porta em posição vertical, ao contrário da primeira, onde as lâmpadas estão dispostas horizontalmente sob cada prateleira. Verifica-se através da FIGURA 2, que o crescimento foi acentuadamente menor neste mês para todos os tratamentos, o que está, provavelmente, relacionado a essa mudança de ambiente.

TABELA 1
Duração da fase "lag" em culturas de *N. oculata*, após cada período de estocagem

	Períodos de Estocagem (meses)							
Tratamentos	1	3	5	7	9	11	13	15
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	2
3	0	0	0	0	0	0	0	2
4	4	12	12	16	18	28	20	24

TABELA 2
Duração da fase "lag" em culturas de *T. tetrathele*, após cada período de estocagem

	Períodos de Estocagem (meses)			
Tratamentos	1	3	5	7
1	0	1	2	0
2	0	2	3	2
3	0	9	16	-
4	0	4	12	-

4. DISCUSSÃO

A centrifugação e a preservação de culturas é desejável, pois permite a estocagem de um grande número de células num pequeno volume, podendo este ser utilizado diretamente na alimentação de organismos aquáticos ou para reiniciar novos cultivos (GALVÃO et alii, 1993). As microalgas centrifugadas podem, ainda, serem adicionadas aos tanques a uma densidade pré-determinada.

TESHIMA et alii (1983) verificaram que os maiores níveis de 20:5n3 (ácido eicosapentaenóico) foram encontrados em culturas mantidas a 14,0, 21,0 e 24,7 °C e que a biossíntese desse ácido graxo, possivelmente, não ocorreria em temperaturas acima de 28°C. Em climas tropicais, onde a temperatura atinge, no verão, de 28 a 30° C, as culturas de *N. oculata*, à temperatura ambiente, não seriam indicadas devido à perda de seu valor nutritivo. Por isso, é nessas regiões que a preservação torna-se mais imperiosa, podendo os cultivos serem implementados no inverno quando a temperatura fica ao redor de 18 a 23° C e é um período em que, geralmente, há pouca atividade de larvicultura.

Os resultados mostram que *N. oculata* pode ser preservada sob resfriamento e congelamento por períodos de até 15 meses. No entanto, os melhores resultados foram obtidos quando as culturas foram apenas resfriadas. *T. tetrathele* pode ser preservada sob resfriamento por períodos de até 7 meses e sob congelamento por até 3 meses, não apresentando crescimento após reinoculação quando submetida a períodos de estocagem superiores a esses.

O atraso no crescimento apresentado pelas culturas congeladas pode estar relacionado a um grande número de células inviáveis e/ou a células sem condições de se divi-

direm imediatamente (FOGG, 1965). No entanto, este último método pode contribuir para a seleção de células, obtendo-se, dessa maneira, uma cultura mais resistente que aquelas cultivadas continuamente.

A estocagem em refrigerador não afetou a qualidade das culturas, uma vez que o crescimento populacionál apresentado por elas, quando inoculadas em meio de cultura após cada período de estocagem, foi semelhante àquelas que eram repicadas semanalmente e não foram submetidas à estocagem (controle).

Por outro lado, o processo de centrifugação deve ser testado para cada espécie, pois pode ser danoso para algumas. Segundo SPEKTOROVA et alii (1986), as células de *Chlorella* marinha são resistentes à ação mecânica de bombas e outros mecanismos usados para misturar a microalga, devido à sua espessa membrana celulósica. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, o mesmo poderá ser dito em relação a *N. oculata* e *Chlorella* sp (pesquisada anteriormente por GALVÃO et alii (1993), porém em relação à *T. tetrathele* a centrifugação foi danosa, causando retardamento no crescimento populacional, devendo-se, portanto, pesquisar outros métodos de concentrar culturas dessa espécie.

Há a considerar, ainda, que no presente trabalho não foram utilizados crioprotetores e nem substâncias químicas conservantes. A Coast Oyster Co. (Quilcene, USA) conseguiu preservar o concentrado de microalgas por um ano somente através de tratamento químico, o que torna, possivelmente, o método apresentado neste trabalho menos oneroso, evitando-se inclusive algum efeito colateral nocivo devido a conservantes.

A viabilidade da substituição de microalgas vivas por secas (ALGAL 361) tem sido pesquisada, demonstrando-se que rotíferos alimentados com microalgas secas produziram maior número de indivíduos que aqueles alimentados com microalgas vivas. No entanto, o valor nutritivo dos rotíferos produzidos com essas microalgas ainda não foi determinado (LIM, 1991). Considerando a labilidade e a volatilização de vitaminas, provavelmente, as microalgas secas são de valor nutricional inferior às obtidas neste trabalho, cujas células se mantêm vivas por mais de um ano.

O método aqui descrito é bastante simples e eficiente. Entretanto, estudos devem ser realizados para verificar a viabilidade econômica de se obter material centrifugado em grande quantidade para comercialização e desenvolver outros métodos de concentrar microalgas sem causar danos à qualidade e integridade celular.

A técnica descrita neste trabalho e em GALVÃO et alii (1993) já está sendo utilizada na Seção de Maricultura do Instituto de Pesca, em Santos (FIGURAS 4 e 5), o que tem possibilitado o fornecimento constante de microalgas num esquema de produção de organismos-alimento para uma larvicultura de peixes; além disso, ela tem permitido a manutenção de matrizes de rotíferos e de cladóceros e também dar atendimento à demanda dessas matrizes por parte de várias instituições de ensino e pesquisa.

FIGURA 4 - Várias espécies de microalgas concentradas e preservadas, contidas em frascos de plástico e mantidas em refrigerador, pertencentes ao acervo de microalgas da Seção de Maricultura, IP

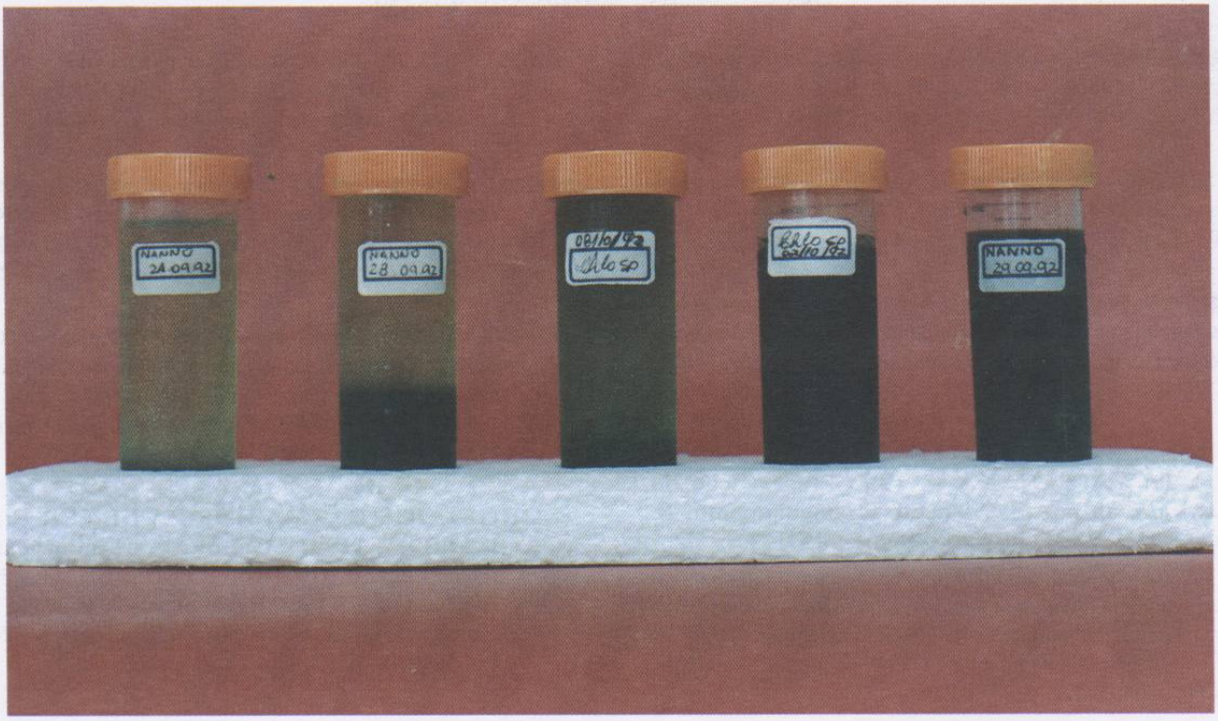

FIGURA 5 - Microalgas concentradas e mantidas em refrigerador, para uso na pesquisa em larvicultura de peixes

5. CONCLUSÕES

1) *Nannochloropsis oculata* pode ser preservada sob congelamento e resfriamento por períodos de até 15 meses; *Tetraselmis tetrathele* resistiu melhor ao resfriamento que ao congelamento, respectivamente, por períodos de 7 e 5 meses.

2) O método mais simples e eficiente, para ambas espécies, foi o resfriamento, podendo-se considerar que o processo de centrifugação permite a estocagem de grande número de células em reduzidos volumes, o que seria vantajoso no caso de *N. oculata* que não sofreu danos quando submetida à centrifugação.

3) Diante da comprovação da viabilidade de estocagem de *N. oculata* e *T. tetrathele* por resfriamento ou congelamento, será possível substituir os métodos usuais de manutenção de matrizes dessas espécies pelos métodos descritos neste trabalho, diminuindo custos de mão-de-obra e material.

AGRADECIMENTOS

Aos estagiários, Carlos Henrique Della Mea Domingues e Rosângela Alves da Cruz, pela colaboração prestada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FOGG,G.E. 1965 *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Madison, Milwankee, and London, The University of Wisconsin Press, 126p.

FUKUSHO,K. 1989 Fry production for marine ranching of red seabream. *Int.J.Aq.Fish.Technol., 1*: 109-117.

FULKS,W & MAIN,K. 1991 *Rotifers and microalgae culture systems*. Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute of Hawaii, USA, p.89-103.

GALVÃO,M.S.N.; PIMENTEL, C.M.M. ;SILVA, R.A.da; YAMANAKA,N. 1993 Preservação de *Chlorella* sp por resfriamento e congelamento. *B. Inst.Pesca*, São Paulo, *20* (único): 115-121.

LIM, L.C. 1991 An overview of live feeds production systems in Singapore. In: PROCEEDINGS OF A U.S.-ASIA WORKSHOP. The Oceanic Institute of Hawaii, USA, p. 204-220.

LUBZENS,E. 1987 Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia, 147*: 245-255.

OKAUCHI,M. 1988 Studies on the mass culture of *Tetraselmis tetrathele* (West,G.S.) Butcher as a food organism. *Bull.Natl.Res.Inst.Aqu., 14*: 1-123.

OKAUCHI,M. 1991 The status of phytoplankton production as food organisms in Japan. In: PROCEEDINGS OF A U.S.-ASIA WORKSHOP. The Oceanic Institute of Hawaii, USA, p. 247-256.

SATO,V. 1991 Development of a phytoplankton production system as support base for finfish larval rearing research. In: PROCEEDINGS OF A U.S.-ASIA WORKSHOP. The Oceanic Institute of Hawaii, USA, p. 257-273.

SORGELOOS,P.; LAVENS,P.; LÉGER,P.; TACKAERT,W. 1991 State of the art in larviculture of fish and shellfish. In: SYMPOSIUM ON FISH AND CRUSTACEAN LARVICULTURE - European Aquaculture Society - Special Publication nº15, Belgium, p.3-5.

SPEKTOROVA,L.V.; NOSOVA,L.P.; GORONKOVA,O.I.; ALBITSKAYA,O.N.; FILIPPOVSKLI,Yu.N. 1986 High-density culture of marine

microalgae - promising items for mariculture. II. Determination of optimal light regime for *Chlorella* sp f. marina under high density culture conditions. *Aquaculture, 55*: 221-229.

TESHIMA,S.I.; YAMASAKI,S.; KANAZAWA,A.; HIRATA,H. 1983 Effects of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49*(5): 805.

UMEBAYASHI,O. 1972 Preservation of some cultured diatoms. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 69*: 55-61.

WATANABE,T.; KITAJIMA,C.; FUJITA,S. 1983 Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a Review. *Aquaculture, 34*: 115-143.