

Efeito da morfologia celular e fase de crescimento algal na eficiência da criopreservação de microalgas

Maiara Sousa Fernandes¹, Priscila Borges Morais², Rodrigo Carvalho do Nascimento³, Lorena Costa Garcia⁴, Guy de Capdeville⁵, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁶

Resumo

A preservação de recursos genéticos algais depositados em coleções de referência é crucial para o apoio e desenvolvimento de programas de melhoramento. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias para a conservação de microalgas por longos períodos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de criopreservação de três espécies de microalgas com arquiteturas celulares distintas, colonial cenobial (EMBRAPA|LBA35 *Desmodesmus* sp.), cocóide unicelular (EMBRAPA|LBA39 *Chlorella sorokiniana*) e colonial palmeloide (EMBRAPA|LBA40 *Chlamydomonas biconvexa*), em diferentes momentos do seu ciclo de crescimento (3º, 6º e 9º dias de crescimento). Foram testados três agentes crioprotetores: dois agentes com alta permeabilidade celular (Glicerol e Dimetilsulfóxido) e um agente não permeável (Polietilenoglicol 400). A viabilidade celular foi mensurada utilizando-se o método do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT). Os resultados demonstraram que a eficiência dos agentes crioprotetores varia em função da cepa avaliada. Além disso, a fase de crescimento de cada cepa também afeta a efetividade dos agentes crioprotetores.

Introdução

A manutenção de cepas unialgais crescendo ativamente durante longos períodos de tempo é um processo dispendioso. O congelamento desses

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, maiara.fernandes@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, Universidade Católica de Brasília, pri.bio9@gmail.com

³ Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia, mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, rodrigo.nascimento@colaborador.embrapa.br

⁴ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁵ Agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Agroenergia, guy.capdevile@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

microrganismos permite mantê-los em um estado metabolicamente inativo, possibilitando maiores intervalos entre as replicações das culturas (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A fim de minimizar a lise celular decorrente da formação de cristais de gelo intracitoplasmáticos e consequente perda da viabilidade durante o congelamento, diferentes substâncias podem ser utilizadas como crioprotetoras. Essas substâncias podem ser classificadas de acordo com a capacidade de penetração celular: crioprotetores intracelulares, como o glicerol, dimetilsulfóxido ou metanol; ou extracelulares, como o polietilenoglicol, sorbitol ou manitol. Além da substância crioprotetora utilizada, características da alga como a espécie, a estrutura celular, a fase de crescimento, o teor de água da célula e a taxa de resfriamento podem afetar a criopreservação. A viabilidade pós-descongelamento é a forma utilizada para se estimar quantitativamente a sobrevivência das células e para comparar a eficiência dos métodos de criopreservação. O cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT) é um método frequentemente usado para determinar a viabilidade celular (SANTOS, 2010). O ensaio baseia-se na atividade enzimática dos micro-organismos vivos que reduzem o sal de CTT (incolor) à formazan. Os cristais de formazan resultantes apresentam cor vermelha e a intensidade da coloração é utilizada para medir a atividade mitocondrial e consequentemente a viabilidade celular.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de três agentes crioprotetores na conservação de microalgas de diferentes cepas, em estágios distintos de ciclo de vida, com base na avaliação de viabilidade pós-congelamento das cepas.

Material e métodos

Obtenção e Cultivo das estirpes

Três espécies de microalgas selecionadas a partir da coleção de microrganismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia foram utilizadas para a realização dos experimentos: *Desmodesmus sp.* (EMBRAPA|LBA35); *Chlorella sorokiniana* (EMBRAPA|LBA39) e *Chlamydomonas biconvexa* (EMBRAPA|LBA40) (Figura 1). As cepas foram inoculadas com densidade óptica inicial de 0,01 (D.O=0,01), em erlenmeyers contendo 300 ml de meio BG11 (RIPPKA et al., 1979), e mantidas em sala de crescimento com iluminação artificial de 8.000 Lux, ciclo de iluminação 12 h claro/12 h escuro, temperatura de 26 °C, aeração de 10 L.h⁻¹, por

um período de 10 dias. O crescimento da biomassa foi monitorado diariamente pela densidade óptica das culturas a 680 nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX M3, Molecular Devices), com o intuito de acompanhar e determinar a curva-padrão de crescimento de cada cepa.

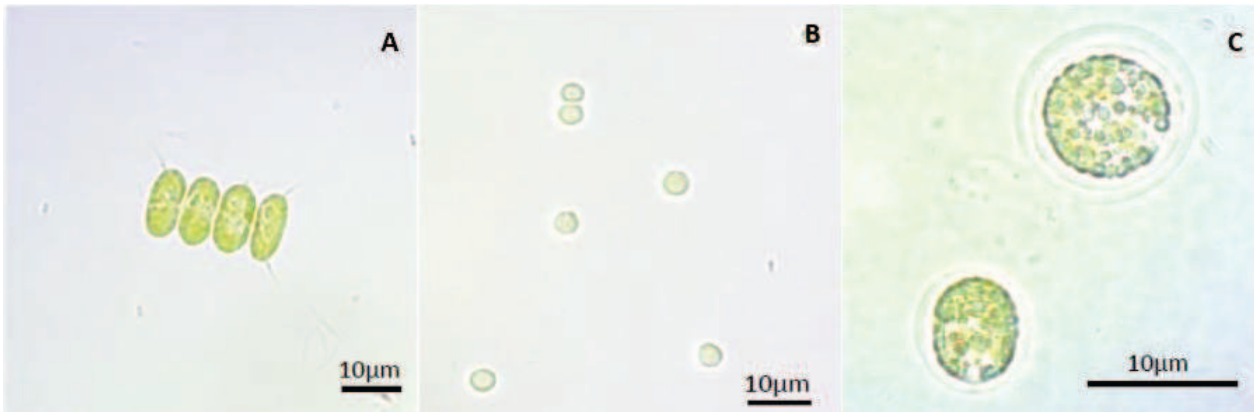


Figura 1. Fotomicrografia das cepas: A) Embrapa|LBA35 (*Desmodesmus* sp.); B) Embrapa|LBA39 (*Chlorella sorokiniana*); C) Embrapa|LBA40 (*Chlamydomonas biconvexa*).

Fonte: Catálogo da coleção de microalgas aplicadas à agroenergia e biorrefinaria da Embrapa.

Criopreservação das microalgas

As microalgas foram congeladas, na ausência de agentes crioprotetores (controle), e na presença dos agentes crioprotetores penetrantes dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, e do crioprotetor não penetrante polietilenoglicol 400 (PEG 400), todos em uma concentração final de 10% v/v. O procedimento foi realizado em três estágios do crescimento das cepas: metade da fase exponencial (3º dia), final da fase exponencial (6º dia) e fase estacionária (9º dia). Os agentes crioprotetores e a suspensão celular foram misturados (0,15 ml e 1,35 ml, respectivamente) em criotubos de polipropileno de 2 ml estéreis. O congelamento das amostras foi realizado em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, com o auxílio de um container de congelamento (Mr. Frosty™ Freezing Container) que permite uma taxa de resfriamento de aproximadamente $-1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. O descongelamento foi realizado 20 dias após o congelamento. Os criotubos foram retirados do ultrafreezer e submersos em banho-maria a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, o conteúdo dos criotubos foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o conteúdo celular ressuspensão em 1,5 ml de meio BG11.

Ensaio da viabilidade celular pós-descongelamento

A viabilidade das amostras foi determinada usando o método do CTT (SANTOS, 2010). Em tubos de ensaio, cada amostra foi homogeneizada em 3 ml do reagente CTT 0,5% (p/v), preparado em solução tampão fosfato pH 7. As misturas foram incubadas por 24 h no escuro, a 28 °C. Após esse período, foram adicionados 6 ml de etanol 95% (v/v) e os tubos foram colocados em água fervente durante 10 minutos, para tornar o formazan solúvel no meio. O material foi então centrifugado a 10.000 rpm, durante 5 minutos, para a separação dos sólidos. O sobrenadante foi reservado para as leituras de absorbância a 490 nm em espectrofotômetro (SPECTRAMAX M3, Molecular Devices).

Análises estatísticas

Em todos os tratamentos, foi realizada a análise de variância (Anova) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o programa Assstat 7.7.

Resultados e discussão

Crescimento celular

As curvas de crescimento obtidas para as três cepas mostraram comportamentos semelhantes (Figura 2). Não foi observada fase de indução ao crescimento, caracterizada por um crescimento lento em virtude da adaptação da cultura às condições do meio. O crescimento teve início já em fase exponencial (fase log) e estendeu-se até o 6º dia de cultivo para as três cepas. Almeida et al. (2015), ao estudarem o crescimento de cepas de *Chlorella vulgaris*, e *Desmodesmus sp* em meio de cultivo BG-11, observaram a fase exponencial para essas espécies entre o 2º e 5º dia de cultivo. A fase de desaceleração ocorreu do 6º ao 8º dia, e a fase estacionária foi registrada no 9º dia de cultivo para todas as cepas. O maior rendimento máximo em biomassa foi observado para a Embrapa|LBA39. As cepas Embrapa|LBA35 e Embrapa|LBA40 apresentaram menores densidades ao final do experimento. Essas diferenças podem estar associadas à eficiência de captura de luz e às taxas de crescimento específica das espécies.

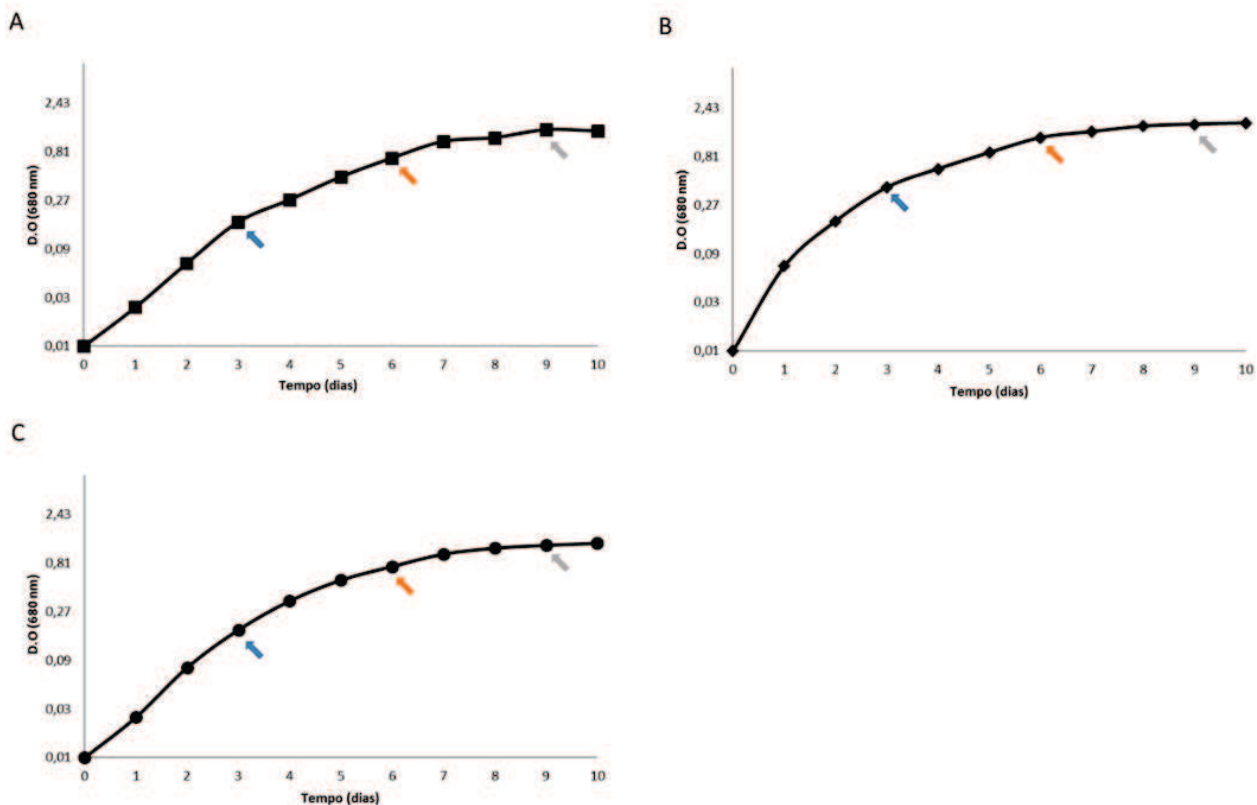


Figura 2. Curva de crescimento baseada em densidade ótica da cepa: A) Embrapa|LBA35 (*Desmodesmus sp.*); B) Embrapa|LBA39 (*Chlorella sorokiniana*); C) Embrapa|LBA40 (*Chlamydomonas biconvexa*), cultivadas em meio BG-11 por um período de 10 dias com iluminação artificial de 16.000 Lux, ciclo de iluminação 12 h claro/12 h escuro, temperatura de 30 °C, aeração de 10 L.h⁻¹. As setas destacam os dias de colheita das células para congelamento.

Viabilidade após congelamento

Na Figura 3, são apresentados os resultados de sobrevivência após o processo de criopreservação. Pode-se observar que as respostas foram diferentes dependendo da espécie, do agente crioprotetor e da fase de crescimento em que as células foram colhidas para serem submetidas ao congelamento.

Para a cepa Embrapa|LBA35, os melhores resultados foram obtidos com o congelamento efetuado durante a fase estacionária (9º dia) na presença dos agentes glicerol e PEG 400.

A cepa Embrapa|LBA39 apresentou maior viabilidade pós-congelamento quando as células foram submetidas ao processo de criopreservação durante a fase exponencial de crescimento (3º dia), e o melhor resultado de criopreservação foi obtido com o DMSO. Esse resultado corrobora o observado por Gwo et al. (2005) e de Guerhazi et al. (2010), os quais também comprovaram a eficácia do DMSO para a criopreservação de espécies de *Chlorella*.

De forma semelhante à cepa Embrapa|LBA 35, glicerol e PEG 400 foram os agentes que promoveram os melhores resultados de sobrevivência celular para a Embrapa|LBA40, na fase estacionária (9º dia). O DMSO foi menos efetivo como crioprotetor para essa espécie, não diferindo estatisticamente do controle (sem agente). Para cepas da espécie *Chlamydomonas reinhardtii*, Crutchfield et al. (1999) reportaram que o DMSO é um agente ineficaz de criopreservação.

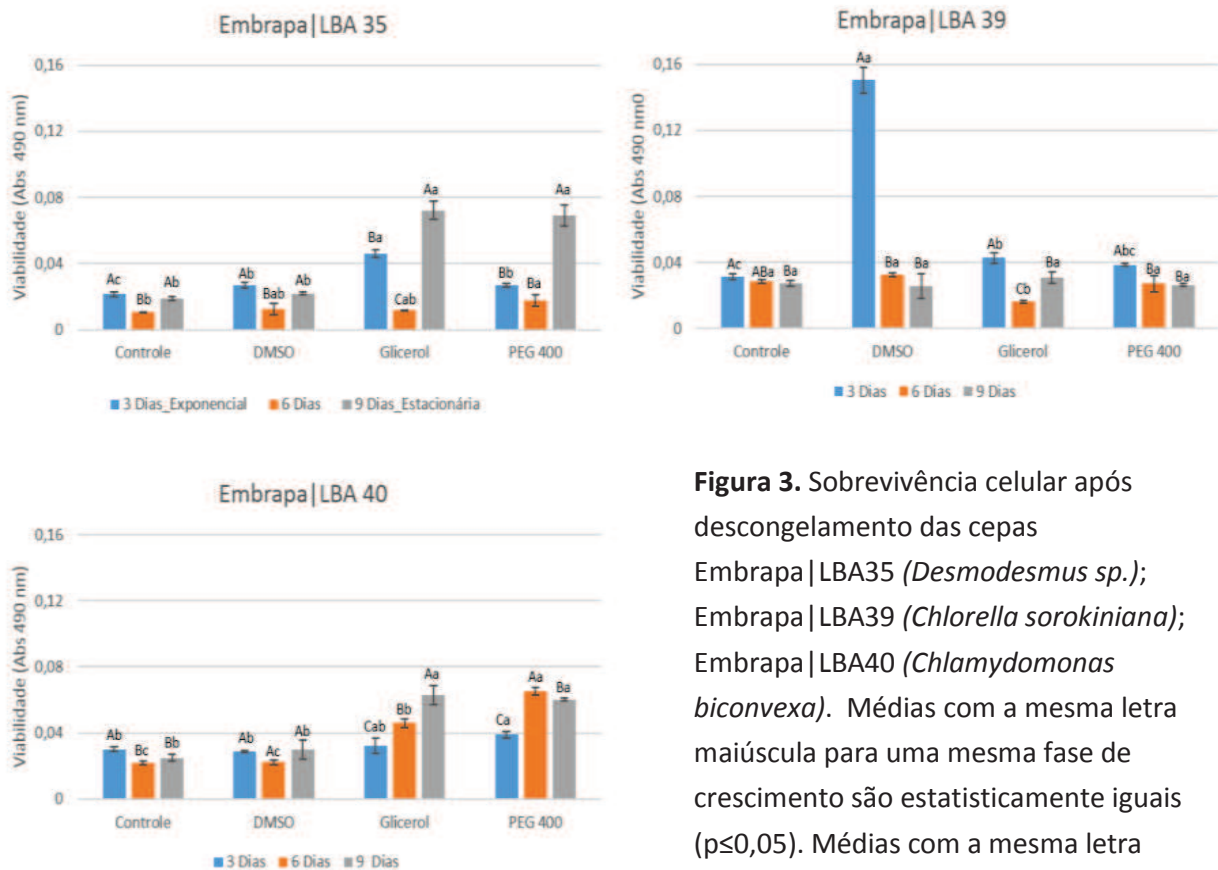


Figura 3. Sobrevivência celular após descongelamento das cepas Embrapa|LBA35 (*Desmodesmus sp.*); Embrapa|LBA39 (*Chlorella sorokiniana*); Embrapa|LBA40 (*Chlamydomonas biconvexa*). Médias com a mesma letra maiúscula para uma mesma fase de crescimento são estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$). Médias com a mesma letra minúscula para o mesmo agente crioprotetor são estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$).

Conclusão

As respostas de viabilidade pós-congelamento mostraram que os agentes crioprotetores podem melhorar a tolerância das cepas ao congelamento. A eficácia da criopreservação para cada espécie pode variar em função da fase de crescimento em que as células se encontram e do agente utilizado no processo.

Referências

- ALMEIDA, V. F. de.; RIOS, L. F.; FILHO, R. M.; MACIEL, M. R. W. Estudo do crescimento autotrófico de três cepas de microalgas visando a produção de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11., 2015, Campinas. [Anais...]. Campinas: Unicamp, 2015.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais - Produção de Biomassa e Coprodutos. Londrina: IAPAR, 2014. v. 2.
- CRUTCHFIELD, A. L. M.; DILLER, K. R.; BRAND, J. J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, New York, v. 34, n. 1, p. 43-52, 1999.
- GUERMAZI, W.; SELLAMI-KAMMOUN, A.; ELLOUMI, J.; DRIRA, Z.; ALEYA, L.; MARANGONI, R.; AYAD, I. H.; MAALEJ, S. Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me₂SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 175 - 181, 2010.
- GWO, J. C.; CHIU, J. Y.; CHOU, C. C.; CHENG, H. Y. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). **Cryobiology**, San Diego, v. 50, n. 3, p. 338–343, 2005.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Berks, v. 111, p. 1-61, 1979.
- SANTOS, D. N. dos. **Caracterização de massas pró-embriogênicas em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2010. 119 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.