

ALGUMAS OBSERVAÇÕES SOBRE A CINÉTICA DO FITOPLÂNCTON MARINHO. I. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO E AMÔNIA NA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E DE ASSIMILAÇÃO DESSES NUTRIENTES NA DIATOMÁCEA *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* (BOHLIN)

Gilda SCHMIDT

Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Synopsis

The growth and the uptake rate for the diatom P. tricornutum were determined in function of nitrate and ammonium concentration. Also the fluorescence "in vivo" of the diatom culture was compared to the cell number in the culture growing at different concentrations and sources of nitrogen. The growth rate was determined as chlorophyll-a synthesis, cell number and inorganic carbon assimilation in the photosynthesis. The uptake rate was determined as nitrate and ammonium consumed. Inhibition on the ¹⁴C assimilation rate was observed with nitrate addition into the incubation flasks.

Introdução

O modelo conceitual atualmente usado para estudar os problemas relativos às velocidades de crescimento, síntese de clorofila-a, fotossíntese e assimilação de nutrientes é baseado na equação de Michaelis-Menten, que descreve a cinética do fitoplâncton em relação a inúmeros parâmetros.

Essa equação foi aplicada para descrever a cinética do fitoplâncton em relação à concentração de fosfato (Button, 1978), silicato (Paasche, 1973), nitrato redutase (Packard, 1979).

Caperon (1967) e Dugdale (1967) foram os primeiros autores a publicar trabalhos aplicando a equação $\mu = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$

para populações de algas unicelulares, onde: μ é a velocidade de crescimento; V_{max} é a velocidade máxima de crescimento; S é a concentração do substrato (nutriente); e K_m é a constante de Michaelis-Menten (concentração do substrato onde a velocidade de crescimento é semi-máxima. Dugdale (*op. cit.*) denomina constante do substrato, K_s , a concentração na qual $S = \frac{V_{max}}{2}$.

Dugdale & Goering (1967) admitem o nitrogênio como limitante da produção nos oceanos no senso da lei de Liebig. O nitrogênio pode estar presente na água do mar como nitrogênio gasoso, uréia, aminoácido, nitrito, nitrato e amônia. As formas predominantes utilizáveis pelo fitoplâncton são o nitrato

e a amônia.

Phaeodactylum tricornutum (Bohlin) é uma diatomácea atípica com frústula pouco silicificada, ocorrendo em três morfotipos: oval, trirradiada e fusiforme (Borowitzka & Volcani, 1978). Sua posição taxonômica está esclarecida em um trabalho de Lewin (1958). É bastante utilizada em trabalhos de laboratório, pois cresce com facilidade em meio de cultura, apesar de não ser observada regularmente no meio marinho (Braarud, 1961).

O objetivo deste trabalho é estabelecer as concentrações mínimas, abaixo das quais nitrato e amônia seriam limitantes ao crescimento de *P. tricornutum*.

Material e métodos

O clone de *P. tricornutum* utilizado neste experimento foi isolado de Ubatuba (SP) por Teixeira (comunicação pessoal)* e ocorreu nas formas trirradiada e fusiforme, com predominância da última. A água para a preparação do meio de cultura foi coletada à superfície, na altura de ilha Vitória (Lat. 23 45'S-Long. 45 01'W), isóbata de 50 m (Fig. 1), pois a baixa concentração de nutrientes da água para o preparo do meio de cultura é um requisito necessário para o estudo da velocidade de crescimento celular. A Tabela I mostra as características da água.

A biomassa de *P. tricornutum* foi avaliada pelos seguintes métodos: clorofila-a segundo o procedimento descrito por

* Teixeira, C. - São Paulo, Inst. oceanográfico, 1980.

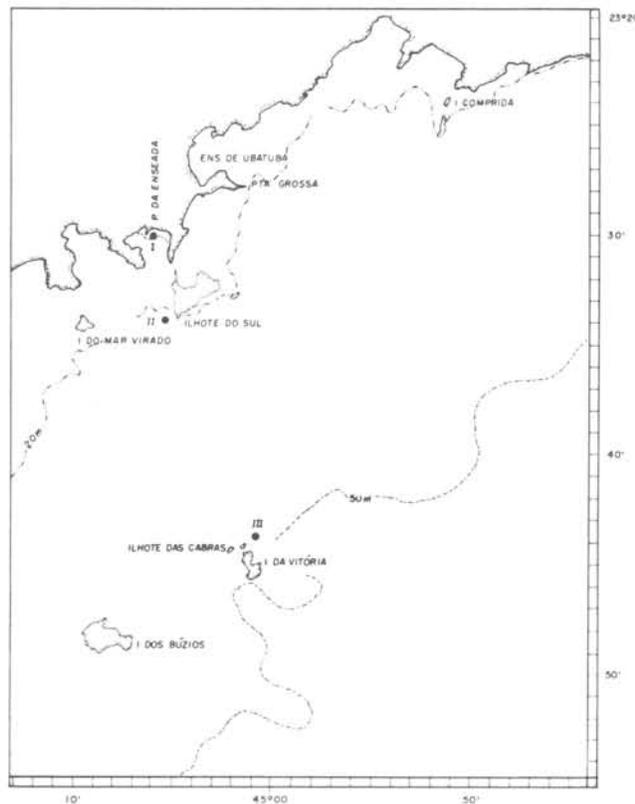


Fig. 1. Mapa da região, com a localização da estação de coleta.

Strickland & Parsons (1968), sendo filtrados 10 ml da cultura em filtro Millipore HA, 0,45 μm , 25 mm de diâmetro, com adição de 2 gotas de carbonato de magnésio a 1%; fluorescência "in vivo", de acordo com Lorenzen (1966) e Zingmark (comunicação pessoal)*, sendo utilizado um fluorômetro Turner, modelo 111, sensibilidade 30 X; a concentração das células foi medida em câmara de Fuchs-Rosenthal's, sendo, o carbono particulado, determinado pelo método de oxidação por dicromato de potássio, de acordo com a técnica descrita em Strickland & Parsons (1968). A curva-padrão foi preparada com glicose.

A variação da concentração de nitrato no meio de cultura foi avaliada pelo método de Mullin & Riley (1955). Strickland & Parsons (1960) utilizam como complementares a sulfanilamida e o alfa-naftiletilenodiana para avaliação do nitrato e, neste trabalho, estes dois reagentes apresentaram melhor resolução que aqueles empregados por Mullin & Riley (*op.cit.*). A sensibilidade do método é de $0,3/n \frac{1}{2} \mu\text{g-at/l}$, onde n é o número de amo-

* Zingmark, R. G. - Columbia, University of South Caroline, 1979.

Tabela I - Características de água utilizada no experimento

Est.	S ^o /‰	Prof.	NO ₃ ⁻	NO ₄ ⁺
		local	$\mu\text{g-at/l}$	$\mu\text{g-at/l}$
1	34,1	50 m	0,15	0,08

tras. A curva-padrão foi feita com nitrato de potássio. A variação da concentração de amônia no meio de cultura foi determinada pela técnica de Solórzano (1969) com sensibilidade de 0,07 $\mu\text{g-at/l}$. A curva-padrão foi feita com cloreto de amônio, de acordo com Strickland & Parsons (1968).

Para se avaliar a velocidade de crescimento de algas unicelulares em função da concentração de um nutriente, é aconselhável que a cultura seja submetida à inanição do nutriente a ser testado (Button, 1978; Eppley & Thomas, 1969; Carpenter & Guillard, 1971). Assim, foi preparado meio "f" (Guillard & Ryther, 1962) sem nitrogênio e com silicato em seu limite mínimo, considerando-se as características de *P. tricornutum*. As células foram lavadas e colocadas em frascos "erlenmeyers" de 300 ml, contendo 200 ml desse meio nas mesmas condições de luz e temperatura. Ao atingirem o estado estacionário (Thomas & Dodson, 1974), as células foram lavadas novamente. Essa lavagem foi feita em tubos de centrífuga com meio "f" sem nitrogênio, em 1300 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, repetindo-se a operação cinco vezes. Com a prática da lavagem, conseguem-se culturas semi-assépticas (Teixeira & Vieira, 1976). A seguir, as células foram homogeneizadas em balão de fundo chato com meio "f" sem nitrogênio. A densidade celular considerada adequada para o experimento foi de 100 células/ml, aproximadamente.

Foram tomadas alíquotas para contagem do número de células inicial e quantidades de clorofila-*a*, nitrato e amônia (Tab. II). Foram autoclavados 16 frascos "erlenmeyers" de 125 ml, calibrados para 75 ml de meio. Foram preparadas soluções-padrão de nitrato de potássio e cloreto de amônio nas concentrações de 10 $\mu\text{g-at/ml}$ e 8 $\mu\text{g-at/ml}$, respectivamente, e distribuídas nos frascos, conforme mostra a Tabela III. O meio de cultura com as células foi ajustado na marca de

75 ml. Os frascos foram colocados em incubadora tipo BOD, com lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, fornecendo 5 KLUX, 22° C de temperatura. Enquanto a fluorescência "in vivo" e alíquotas para contagem do número de células foram tomadas diariamente, a clorofila-*a*, o nitrato e a amônia foram analisados no final do experimento, ao quinto dia.

Tabela II - Características do meio de cultura, no início do experimento

Células	Clorofila- <i>a</i>	Nitrato	Amônia
nº/l	µg/l	µg-at/l	µg-at/l
9×10^4	0,49	0,94	2,66

Tabela III - Quantidades de nutrientes nitrogenados nos frascos de cultura de *P. tricornutum*

	µg-at/l	0,94	2,49	4,09	5,69	7,55	9,55	12,5	24,2
NO ₃ ⁻	µg-at/l	2,66	3,93	5,02	6,91	8,4	10,11	16,6	23,8
NH ₄ ⁺	µg-at/l								

Produtividade primária

A produtividade primária de *P. tricornutum* em função da concentração de nitrato foi determinada com a mesma cultura utilizada para avaliação dos parâmetros já descritos. A técnica para avaliação de produtividade primária foi a do ¹⁴C (Steeman-Nielsen, 1952). As células foram colocadas em balão de fundo chato com meio "f" sem nitrogênio. Foram tomadas alíquotas para contagem do número de células, clorofila-*a* e carbono particulado (Thomas, 1964). O meio de cultura com as células foi distribuído em 24 frascos "pyrex", com 60 ml de capacidade, aos quais foram adicionadas quantidades crescentes de nitrato (Qasim *et al.*, 1973; Collos & Slawyk, 1979).

Para evitar uma diluição da salinidade, a solução-padrão de nitrato de potássio foi preparada em duas concentrações: uma, com 10 µg-at l⁻¹; e outra, com 20 µg-at l⁻¹. De acordo com Falkowski & Stone (1975) e Collos & Slawyk (1979), se o objetivo é analisar a fotossíntese em função da concentração de nitrato, usando-se ¹⁴C, é necessário um período de pré-incubação, ocasião em que as células são colocadas em contato com o nutriente a ser testado por um período de 3 a 10 horas. Neste estudo, as células foram distribuídas nos frascos de incubação e deixadas durante uma noite sem luz. Após iluminação durante 3 horas, o período completo -15 horas-, foi considerado o período de pré-incubação.

Passado esse período, as amostras, com a mesma concentração de nitrato, isto é, frascos, por exemplo, com 3,3

µg-at/l foram colocadas em balão de fundo chato, foi adicionada uma ampola de 10 µCi e a mistura foi homogeneizada. A seguir, a mistura foi redistribuída nos frascos de incubação. E assim foi feito, sucessivamente, com todas as séries das diversas concentrações de nitrato. A calibração da ampola foi feita pela técnica descrita por Galvão (1978). A contagem da atividade de ¹⁴C assimilado foi feita por cintilação líquida em cintilador Packard modelo 2425. A técnica para correção do "quenching" (atenuação do sinal emitido pela amostra) foi a da padronização externa, AES, descrita em Vieira (1980). A fórmula aplicada para o cálculo da produtividade primária está descrita em Teixeira (1973).

Para verificar uma possível fotoinibição da fotossíntese na cultura de *P. tricornutum*, foi feita uma curva de luz-fotossíntese até o ponto de saturação da luz. A todos os frascos, adicionou-se 0,64 µg-at/l de nitrato. A população foi deixada em contato com o nitrato nos frascos de incubação durante toda a noite. Pela manhã, a luz foi ligada durante 3 horas. Passado esse tempo, todos os frascos foram retirados da incubadora e, seu conteúdo, colocado em balão de fundo chato, sendo adicionadas 8 ampolas de 10 µCi. A mistura foi homogeneizada e os frascos de incubação foram enchidos novamente. Foram utilizados filtros neutros para atenuar a luz para 4, 17, 29 e 67%. A série foi completada com 2 frascos pretos e 2 transparentes, 100% de luz. Todos os frascos foram recolocados na incubadora. Após 5 horas de incubação, as amostras foram filtradas. A atividade de ¹⁴C foi lida no cintila-

dor Packard, modelo 2425. Foi calculado o I_k (Talling, 1957), cujo valor, 13,6 KLUX, comprovou que não houve fotoinibição.

Cálculo das velocidades

Obtidas as quantidades de biomassa (clorofila-*a*, número de células e carbono particulado e também as quantidades de carbono e nutrientes assimiladas), foram calculadas as velocidades de retenção e de consumo, em função de cada uma das concentrações de nitrato e amônia. A fórmula aplicada para o cálculo foi a de Paasche (1967).

Velocidade de crescimento avaliada como clorofila-*a* sintetizada:

$$\mu = \frac{\log \frac{C(1)}{C(0)}}{(t_1 - t_0)} \times 3,32,$$

onde

μ = velocidade de crescimento

$C(0)$ = quantidade de clorofila-*a* no início do experimento

$C(1)$ = quantidade de clorofila-*a* no final do experimento, concentração $N(1)$ de nutriente

$t(0)$ = momento inicial

$t(1)$ = momento final do experimento (em dias)

3,32 = fator para a divisão celular.

Velocidade de crescimento avaliada como aumento do número de células no meio de cultura:

$$\mu = \frac{\log \frac{C(1)}{C(0)}}{(t_1 - t_0)} \times 3,32,$$

onde

μ = velocidade de crescimento

$C(0)$ = número inicial de células

$C(1)$ = número de células no momento $t(1)$, na concentração $N(1)$ de nutriente

$t(0)$ = momento inicial

$t(1)$ = momento final do experimento (em dias)

3,32 = fator para a divisão celular.

As velocidades de assimilação foram calculadas aplicando-se a mesma fórmula.

Velocidade de crescimento avaliada como assimilação de ^{14}C :

$$\mu = \frac{\log \frac{C(1)}{C(0)}}{(t_1 - t_0)} \times 3,32,$$

onde

μ = velocidade de crescimento

$C(0)$ = carbono particulado no momento da coleta

$C(1)$ = carbono assimilado na concentração $N(1)$ de nutriente + carbono particulado no início do experimento

$t(0)$ = momento inicial

$t(1)$ = momento final do experimento (em dias)

3,32 = fator para a divisão celular.

Cálculo das constantes de Michaelis-Menten

Conhecidas as velocidades, existem quatro maneiras de se obter a K_s . Uma, pelo simples ajuste na curva das velocidades do valor dado pela própria definição da K_s , concentração de nutrientes, onde a velocidade máxima é dividida por 2,

$$K_s = \frac{V_{max.}}{2}.$$

As demais formas analíticas de obtenção da K_s são:

1 - Fazendo-se o inverso da velocidade, $\frac{1}{\mu}$, em função do inverso da concentração, $\frac{1}{S}$; é a chamada linearização de

Lineaver-Burke (Lehninger, 1976);

2 - Fazendo-se a concentração do substrato (S) dividida pela velocidade, $\frac{S}{\mu}$, em função da concentração do substrato, S . É a chamada plotagem de Woolf (Falkowski, 1975);

3 - Fazendo-se a velocidade dividida pela concentração do substrato, $\frac{\mu}{S}$, em função da velocidade, μ . É a plotagem de Eadie-Hofstee (Lehninger, 1976).

Dowd & Riggs (1965) estudaram as quatro formas de cálculos e consideraram a abordagem de Lineaver-Burke como a menos precisa, pois leva a uma estimativa de K_s e V_{max} com variância muito grande. Os outros dois métodos têm sua aplicabilidade relacionada a uma maior ou menor precisão no valor das velocidades, uma vez que as concentrações do substrato são pré-estabelecidas.

Neste trabalho, foram aplicadas as abordagens $S \times \frac{S}{\mu}$ e $\mu \times \frac{\mu}{S}$. Em alguns experimentos, apenas a abordagem $S \times \frac{S}{\mu}$ permitiu uma correlação ao nível de μ 95% de confiança.

Resultados e discussão

O número de células no frasco-controle da bateria com nitrato variou de 3.720 a 8.246/ml e de 6.976 a 79.375/ml, com adição de 24,2 $\mu\text{g-at/l}$ de nitrato, do 1º até o 4º dia do experimento. Na bateria com amônia, o número de células no frasco-controle variou de 3.939 a 7.905/ml e de 7.657 a 54.500/ml, com adição de 23,86 $\mu\text{g-at/l}$ de amônia (Fig. 2). A clorofila-*a* total sintetizada no frasco-controle da bateria de nitrato foi de 5,72 $\mu\text{g/l}$ e de 5,77 $\mu\text{g/l}$ na bateria de amônia. Com 24,3 $\mu\text{g-at/l}$ de nitrato, a clorofila-*a* sintetizada foi de 24,0 $\mu\text{g/l}$ e, com adição de 23,8 $\mu\text{g-at/l}$ de amônia, a clorofila-*a* sintetizada foi de 14,81 $\mu\text{g/l}$ (Fig. 3). O consumo de nutrientes em função da quantidade de nutrientes adicionados é mostrado na Figura 4. No frasco-controle da bateria de nitrato, com quantidade inicial em meio de 0,94 $\mu\text{g-at N-NO}_3/\text{l}$, foi detectada a quantidade de 0,54 $\mu\text{g-at N-NO}_3/\text{l}$ no final do experimento e, com adição de 24,30 $\mu\text{g-at N-NO}_3/\text{l}$, a quantidade final foi de 0,98 $\mu\text{g-at N-NO}_3/\text{l}$. No frasco-controle da bateria de amônia havia 2,66 $\mu\text{g-at N-NH}_4/\text{l}$ e, no final do experimento, 1,77 $\mu\text{g-at/l}$. Com a adição de 23,80 $\mu\text{g-at/l}$ de amônia, a quantidade detectada foi de 3,05 $\mu\text{g-at/l}$. As Figuras 5-6 mostram a relação entre número de células e unidades de fluorescência, nos dois meios de cultura, durante todo o período experimental. Os índices de correlação entre esses dois parâmetros são apresentados na Tabela IV. Os resultados obtidos em unidades de fluorescência e número de

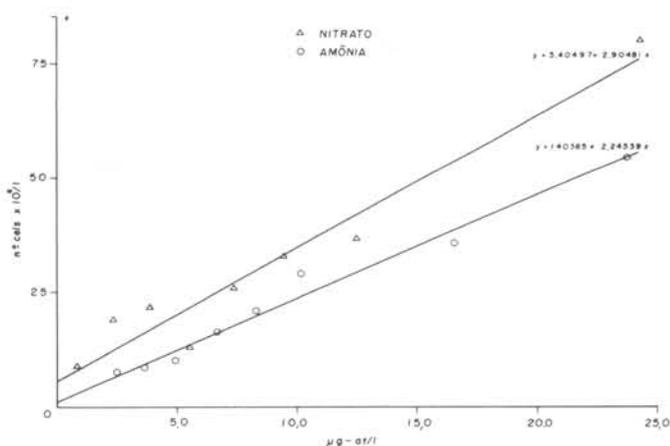


Fig. 2. Variação do número de células nos meios de cultura, em função de nitrato e amônia como fontes nitrogenadas.

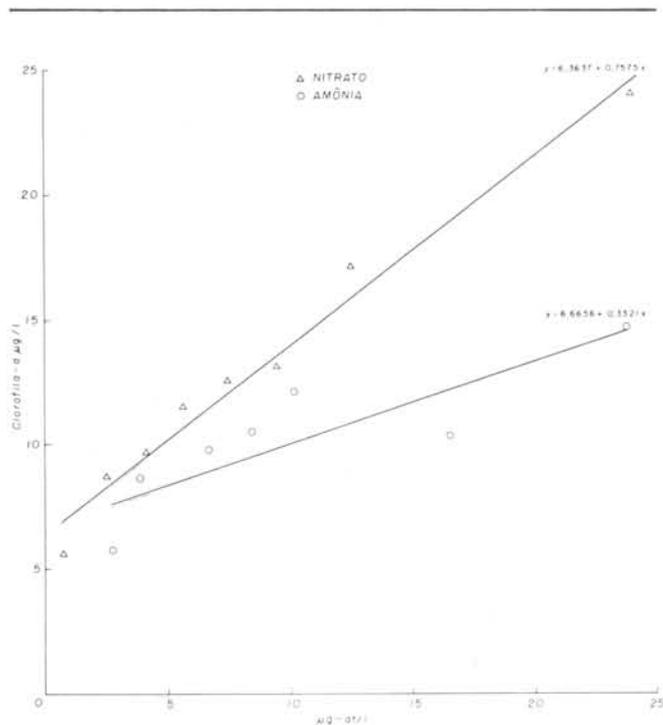


Fig. 3. Variação da clorofila-*a* sintetizada em função da concentração de nitrato e amônia.

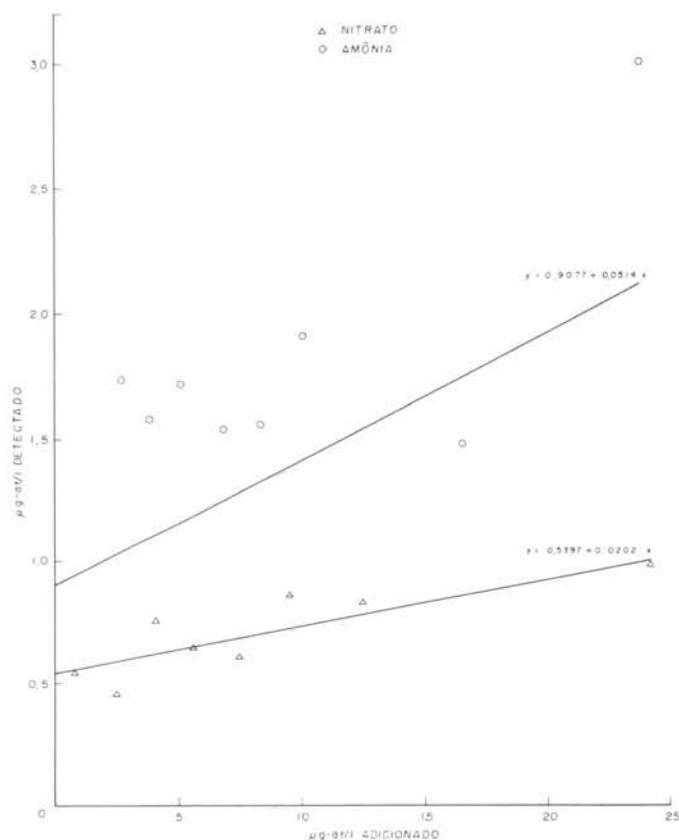


Fig. 4. Variação da concentração de nitrato e amônia em função do consumo por *P. tricornutum*.

células no meio de cultura com nitrato, no 3º dia do experimento, podem ser comparados àqueles obtidos por Fitzgerald (1975) (Tab. V). Esse autor utilizou um fluorômetro cuja sensibilidade é de 1 unidade de fluorescência por 45 µg de clorofila-a/l, enquanto, neste estudo, cada unidade de fluorescência corresponde a 1,1 µg de clorofila-a/l. Assim, para uma concentração aproximada de clorofila-a/célula, e diferença acentuada no número de células (Tab. V), a fluorescência "in vivo" das culturas é praticamente a mesma. Não houve correlação entre a quantidade de carbono i-

Tabela IV - Índices de correlação entre o número de células e fluorescência em meio com nitrato e amônia, durante o tempo de duração da experiência com *P. tricornutum*

Índices de Correlação				
	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
NO ₃ ⁻	0,75	0,77	1,00	0,89
NH ₄ ⁺	0,33	0,53	0,91	0,70

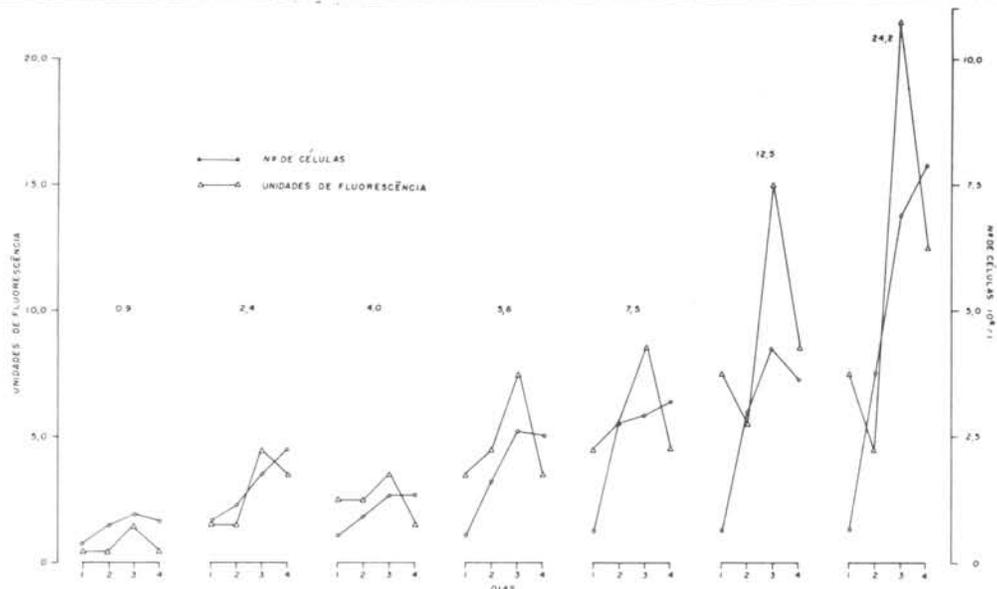


Fig. 5. Unidades de fluorescência e número de células na cultura de *P. tricornutum* em meio com diferentes concentrações de nitrato, durante 4 dias.

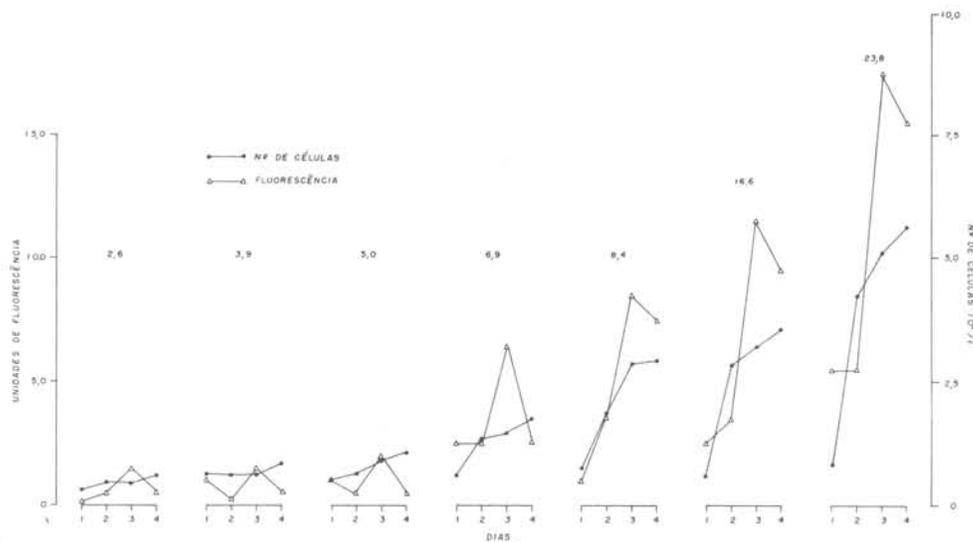


Fig. 6. Unidades de fluorescência e número de células na cultura de *P. tricornutum* em meio com diferentes concentrações de amônia, durante 4 dias.

Tabela V - Unidades de fluorescência, número de células e peso seco de *P. tricornutum* sp.

Unidades de Fluorescência	Nº células/ml x 10 ³	Peso Seco	Clor.-a/cél. µg x 10 ⁻⁴	Autor
20	2.000	40 mg	4,5	Fitzgerald (1975)
21,5	69	3 mg	3,0	este trabalho

norgânico assimilado e a concentração de nitrato na cultura, $r_s = 0,12$. Para 0,55 µg-at/l de nitrato, foram assimilados 1,89 µg/h/l de carbono inorgânico, enquanto que, para 17,00 µg-at/l, a assimilação foi de 1,72 µg-at/h/l (Tab. VI).

Tabela VI - Relação entre o carbono inorgânico assimilado e a concentração de nitrato na cultura de *P. tricornutum*

Nitrato (µg-at/l)	Carbono inorgânico assimilado (µg/h/l)
0,39	1,40
0,55	1,89
0,71	1,96
1,03	1,96
1,67	2,09
3,71	2,01
8,69	1,82
17,00	1,72

A técnica do ¹⁴C permite avaliar o carbono inorgânico assimilado pelo fitoplâncton, em um determinado período (Teixeira, 1973).

As constantes de velocidade de crescimento e de assimilação obtidas neste trabalho estão na Tabela VII. Para o nitrato, o valor da K_s variou de 0,15 a 0,44 µM e a V_{max} de crescimento apresentou uma variação de 1,20 a 2,21 duplicações/dia. A velocidade máxima de assimilação de nitrato foi de 1,07 duplicações/dia.

Na análise das curvas de crescimento de *P. tricornutum* em função da concentração da amônia, o valor da K_s variou de 0,97 µM a 1,42 µM. A velocidade máxima de crescimento variou de 1,09 a 2,32 duplicações/dia. O valor da K_s para assimilação foi de 11,41 µM e a velocidade máxima de assimilação foi de 1,09 duplicações/dia. As hipérbolas obtidas com as velocidades de crescimento avaliadas como clorofila-a sintetizada, número de células, fotossíntese e nutriente assimilado em função da concentração dos dois nutrientes em estudo, são apresentadas nas Figuras 7-13. A

Tabela VII - K_s e V_{max} de crescimento e de assimilação para *P. tricornutum* crescendo em nitrato ou amônia

K _s µM	V _{max} dupl./dia	Nutrientes	Forma de avaliação
0,37	2,21	NO ₃ ⁻	nº de células
1,42	2,32	NH ₄ ⁺	nº de células
0,44	1,12	NO ₃ ⁻	clorofila-a
0,97	1,09	NH ₄ ⁺	clorofila-a
0,15	1,20	NO ₃ ⁻	carbono inorgânico assimilado
2,3	1,07	NO ₃ ⁻	assimilação de NO ₃ ⁻
11,41	1,09	NH ₄ ⁺	assimilação de NH ₄ ⁺

Figura 14 mostra a velocidade de crescimento, em função da intensidade luminosa e o valor do I_k . $I_k = 13,6$ KLUX, mostrando a adaptação da população de *P. tricorntutum* à baixa intensidade luminosa.

A diferença entre as quantidades iniciais de nitrato e amônia na água do mar e no meio "f" (Tabs I-II) poderá ser atribuída à contaminação dos sais utilizados para a preparação do meio "f". O aumento do número de células é diretamente proporcional às quantidades de fonte de nitrogênio adicionadas, conforme se vê na Figura 2, sendo maior nas cul-

turas com nitrato. Provasoli & Carlucci (1974) afirmam que os clones de algas unicelulares modificam suas condições de adaptação após vários anos em meio de cultura. Talvez seja uma explicação para o aparentemente melhor aproveitamento do nitrato como fonte de nitrogênio pela cultura de *P. tricorntutum* utilizada neste experimento, já que a cultura vinha sendo mantida em meio com $1,765 \mu\text{M}$ de nitrato há mais de 1 ano. Antia *et al.* (1975) mostraram que *P. tricorntutum* cresceu melhor em meio de cultura com nitrato que no meio com amônia, apesar do período de adaptação a que foi submetida.

A clorofila-*a* sintetizada nos dois meios também indicou uma aparente preferência pelo nitrato, traduzida por maior quantidade do pigmento no meio de cultura (Fig. 3). Essas diferenças no rendi-

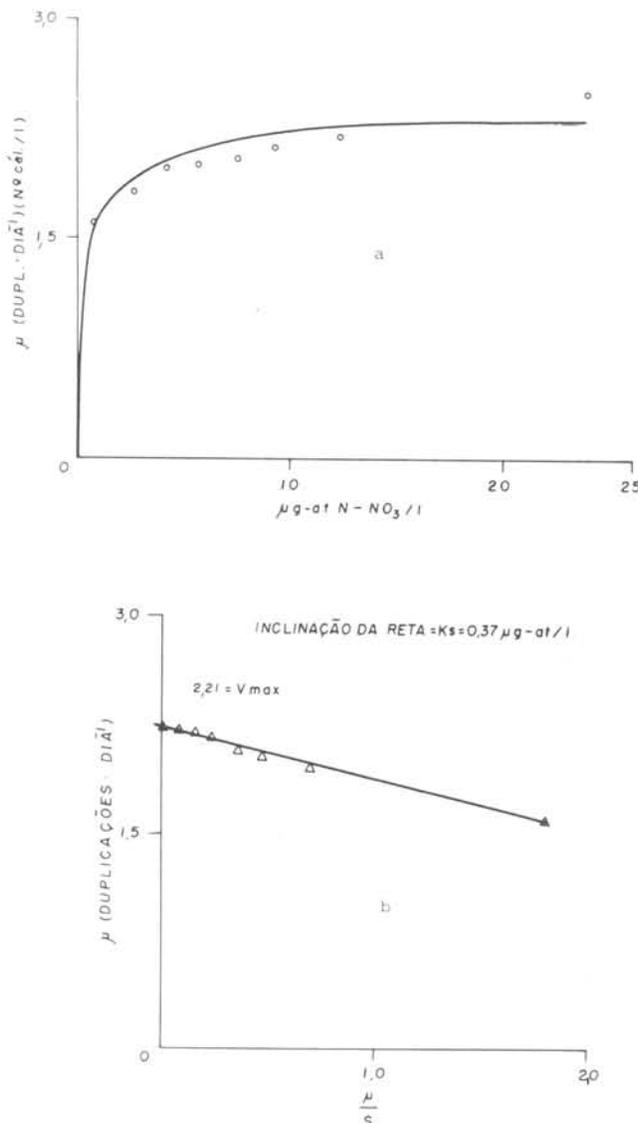


Fig. 7. a) Velocidade de crescimento de *P. tricorntutum*, em função da concentração de nitrato, medida como aumento no número de células; b) Linearização da curva, plotagem de $\mu/S \times \mu$, para obtenção direta da K_s e V_{max} .

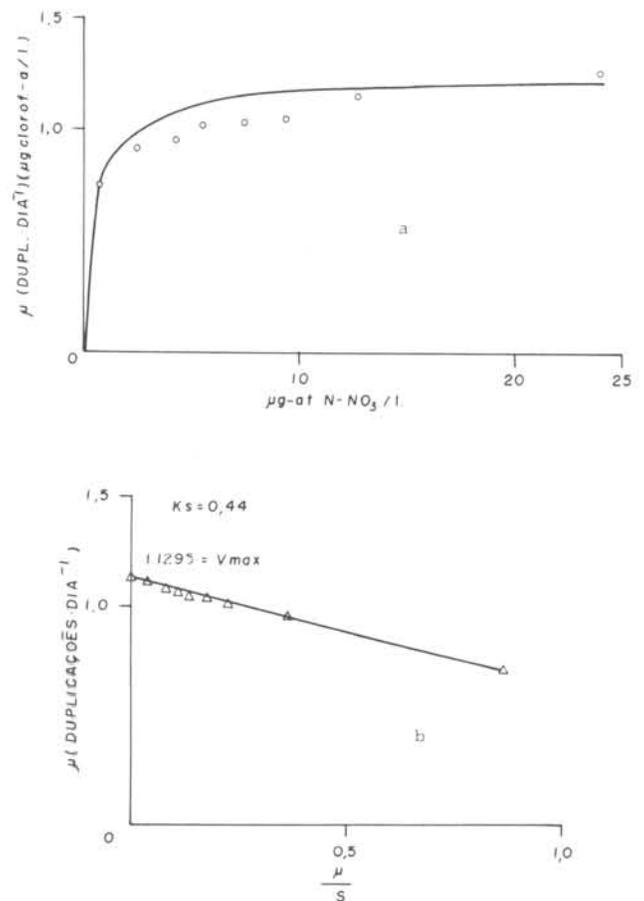


Fig. 8. a) Velocidade de crescimento de *P. tricorntutum*, medida como síntese de clorofila-*a*, em função da concentração de nitrato; b) Linearização da curva, plotagem de $\mu/S \times \mu$, para obtenção direta da K_s e V_{max} .

mento dos dois meios de cultura são estatisticamente significativas. Uma outra comprovação da preferência de *P. tricornutum* utilizada neste experimento pelo nitrato, poderá ser observada na Figura 4. O consumo de nitrato foi maior que o consumo de amônia. A correlação entre número de células e fluorescência "in vivo" é melhor na cultura crescendo com nitrato que na cultura crescendo com amônia (Tab. IV).

Esse resultado poderá ser, provavelmente, atribuído à afinidade de *P. tricornutum* pelo nitrato com fonte de nitrogênio. Sakshaug & Holm-Hansen (1977) relacionam o estado nutricional das cé-

lulas com a fluorescência "in vivo". As células fluorescem mais, em estado de inanição de nitrogênio. Comparando-se os resultados obtidos, com os valores do trabalho de Fitzgerald (1975), observa-se um valor de unidades de fluorescência relativamente bem maior para este trabalho, no meio de cultura com nitrato, ao 39 dia do experimento (Tab. V). O excesso de fluorescência poderá ser atribuído ao estado de nutrição das células. As constantes K_s e V_{max} obtidas neste trabalho, podem ser comparadas àquelas obtidas por diversos autores (Tabs VII - VIII). Se a origem do organismo é oceânica,

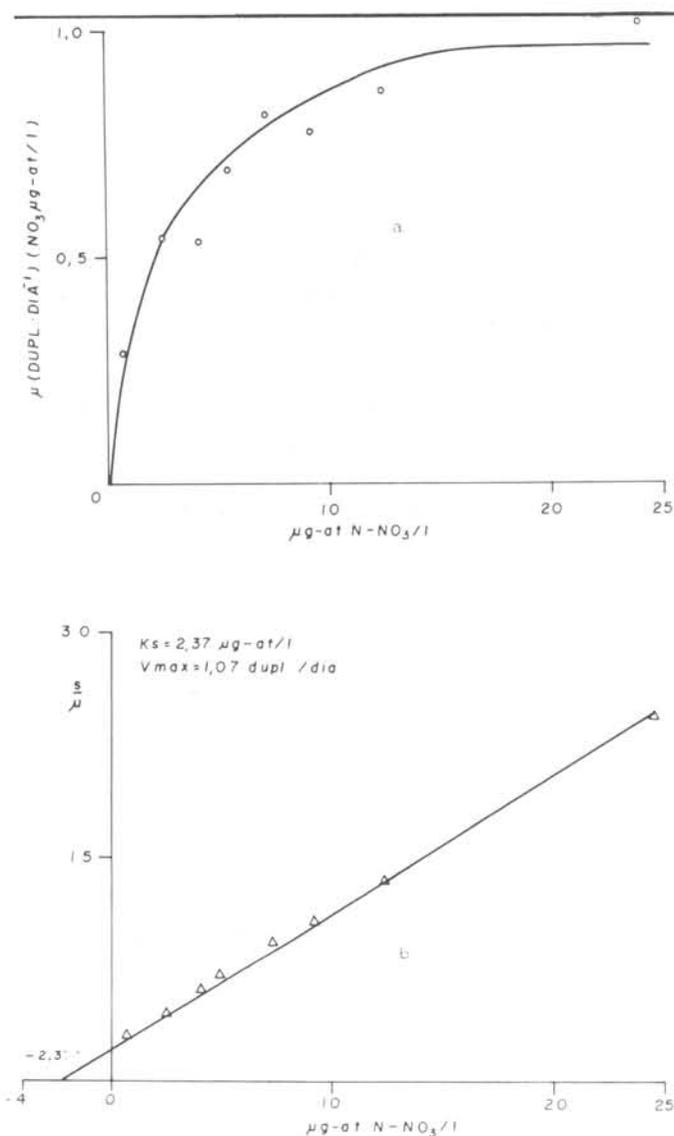


Fig. 9. a) Velocidade de assimilação de nitrato da cultura de *P. tricornutum*, em função da concentração de nitrato; b) Linearização da curva, plotagem de $S/\mu \times S$, para obtenção direta da K_s e V_{max} .

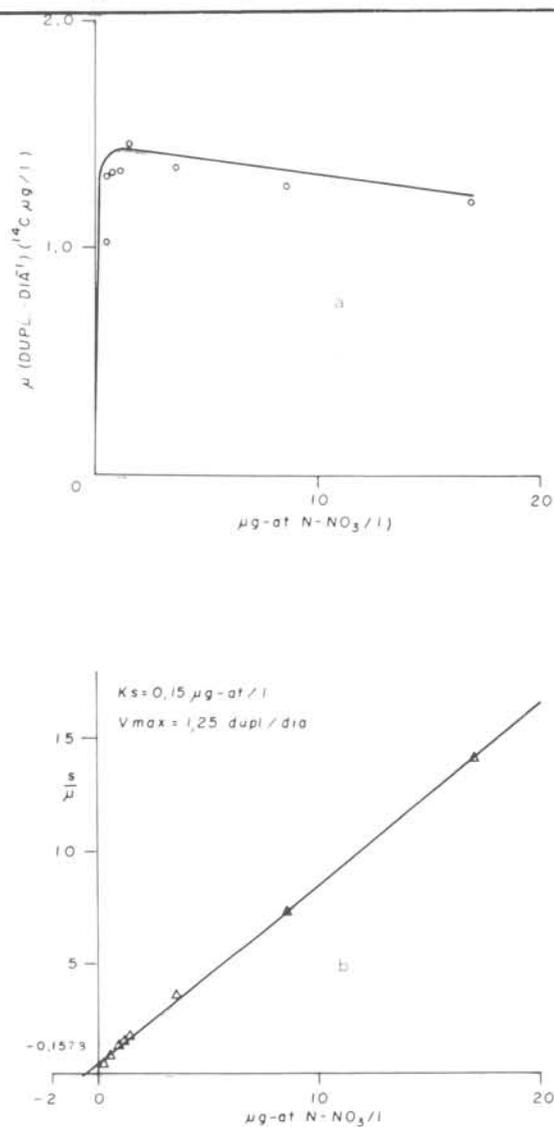


Fig. 10. a) Velocidade de crescimento da cultura de *P. tricornutum*, medida como fotossíntese, em função da concentração de nitrato; b) Linearização da curva, plotagem de $S/\mu \times S$, para obtenção direta da K_s e V_{max} .

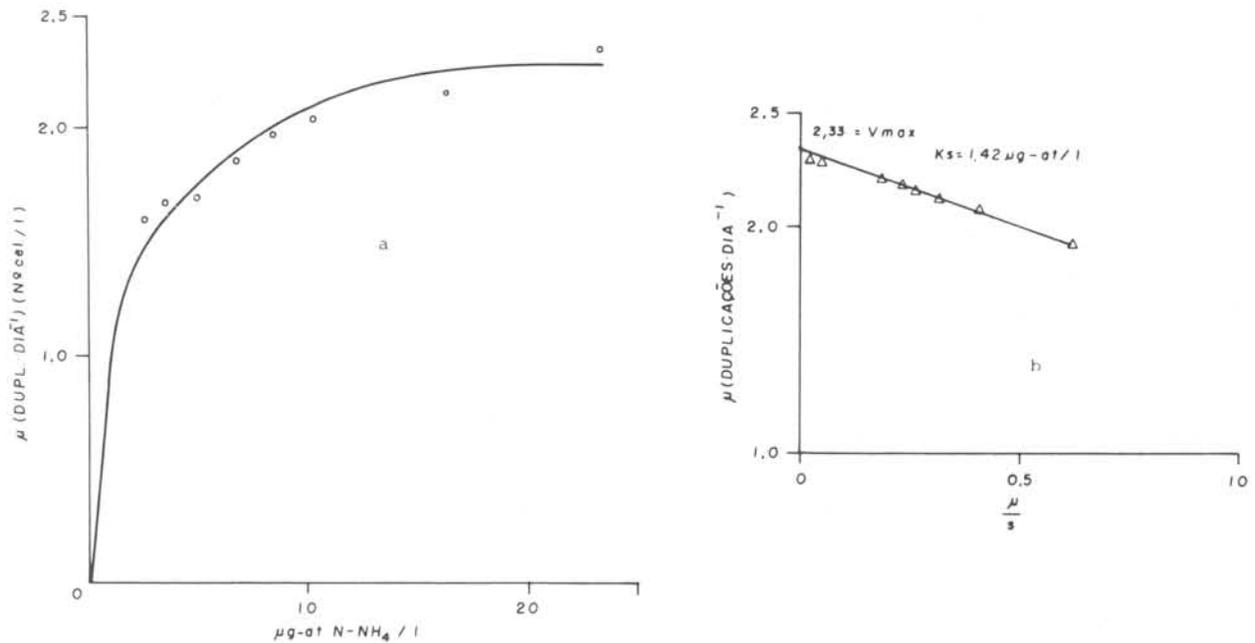


Fig. 11. a) Velocidade de crescimento de *P. tricornutum*, em função da concentração de amônia, medida como aumento do número de células; b) Linearização da curva, plotagem de $\mu/S \times \mu$, para obtenção direta da K_s e V_{max} .

Tabela VIII - Constantes de crescimento e de assimilação para várias espécies crescendo em meio com nitrato e amônia

K_s μM	V_{max} , dupl./dia	Alga	Nutriente	Autor
0,75	0,375	<i>Chaetoceros gracilis</i>	NO_3	Eppley et al. (1969)
0,40	0,465	<i>Chaetoceros gracilis</i>	NH_4	Eppley et al. (1969)
0,3		<i>Chaetoceros gracilis</i>	NO_3	Eppley et al. (1969)
0,5		<i>Chaetoceros gracilis</i>	NH_4	Eppley et al. (1969)
0,5		<i>Skeletonema costatum</i>	NO_3	Eppley et al. (1969)
3,5		<i>Skeletonema costatum</i>	NH_4	Eppley et al. (1969)
1,7		<i>Rhizosolenia stolter</i>	NO_3	Eppley et al. (1969)
0,5		<i>Rhizosolenia stolter</i>	NH_4	Eppley et al. (1969)
0,6		<i>Ditylum brighwellii</i>	NO_3	Eppley et al. (1969)
1,1		<i>Ditylum brighwellii</i>	NH_4	Eppley et al. (1969)
0,28	1,93	<i>Dunaliella</i> sp.	NO_3	Thomas & Dodson (1974)
0,98	1,85	<i>Dunaliella</i> sp.	NO_3	Thomas & Dodson (1974)
1,02	0,48	<i>Gymnodinium splehs</i>	NO_3	Thomas & Dodson (1974)
6,55	0,83	<i>Gymnodinium splehs</i>	NO_3	MacIsaac & Dugdale (1969)
2,64		<i>P. tricornutum</i>	NO_3	Ketchum (1939)
1,84		<i>Cyclotella nana</i> clone 3H	NO_3	Carpenter & Guillard (1971)
0,62		<i>Fragilaria pinnata</i> clone 13-3	NO_3	Carpenter & Guillard (1971)
6,87		<i>Bellerophia</i> sp. clone Say-7	NO_3	Carpenter & Guillard (1971)

nerítica ou litorânea, os valores para essas constantes variam (Eppley *et al.*, 1969). Essas duas constantes variam com o tamanho das células, sendo maior para células relativamente grandes. As células originárias de áreas oligotróficas têm constantes baixas. Espécies com crescimento rápido têm constantes mais baixas, quando comparadas com espécies de crescimento mais lento. Carpenter & Guillard (1971) relatam diferenças dessas constantes entre raças de uma mesma espécie isoladas de locais diversos. De acordo com Eppley & Thomas (1969) e Skoglung & Jensen (1976), a constante K_s para velocidade de assimilação de nutrientes é geralmente maior que a constante K_s para velocidade de crescimento. Neste trabalho,

as constantes obtidas para velocidades de assimilação de nitrato e de amônia foram maiores que as constantes para velocidade de crescimento obtidas como aumento do número de células, síntese de clorofila-*a* e fotossíntese (Tab. VI). A constante de saturação média, K_s , para velocidade de assimilação de amônia apresentou um valor particularmente alto. Esse resultado está de acordo com o esperado, após a comprovação da preferência pelo nitrato demonstrada pela cultura de *P. tricorutum*. Pela própria definição da constante $\mu = \frac{S}{K_s + S}$, quanto maior o valor da K_s em relação à concentração do substrato (nutriente), menor a afinidade da cultura pelo nutriente, caracterizada por menor velocidade de assimilação. Para velocidade

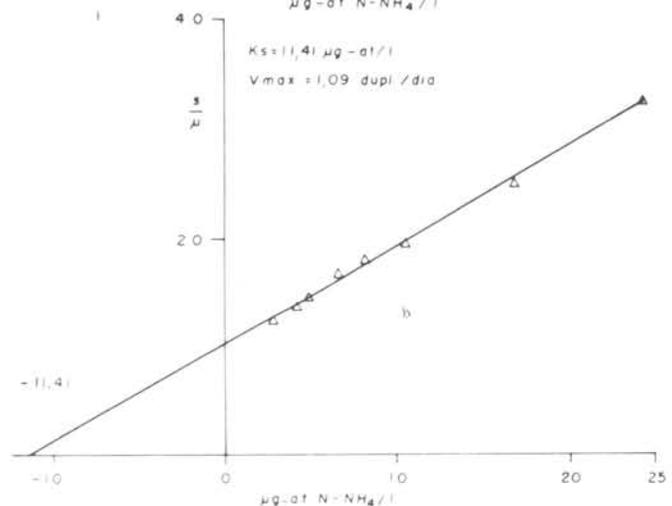
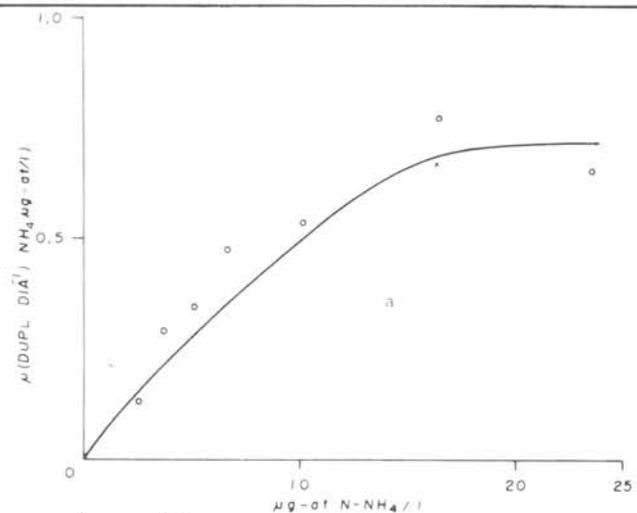
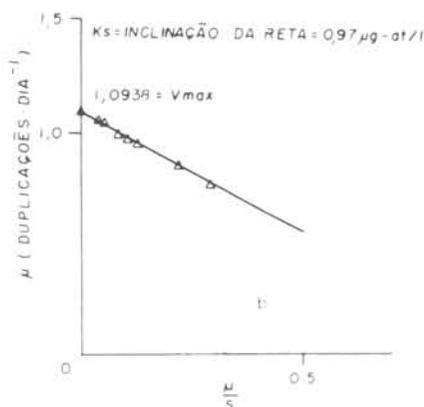
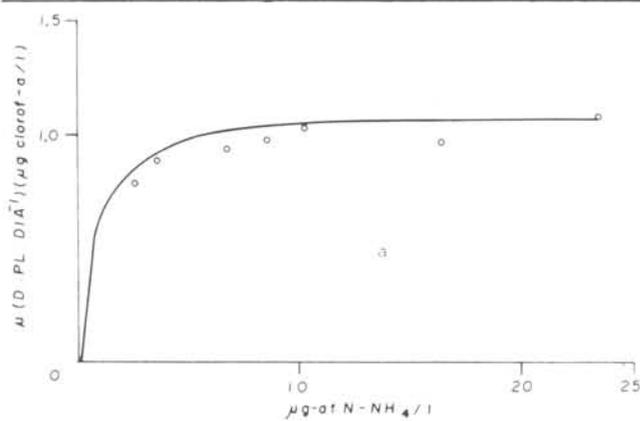


Fig. 12. a) Velocidade de crescimento de *P. tricorutum*, medida como síntese de clorofila-*a*, em função da concentração de amônia; b) Linearização da curva, plotagem de $\mu/S \times \mu$, para obtenção de K_s e V_{max} .

Fig. 13. a) Velocidade de assimilação de amônia da cultura de *P. tricorutum*, em função da concentração de amônia; b) Linearização da curva, plotagem de $S/\mu \times \mu$, para obtenção direta da K_s e V_{max} .

de crescimento, a definição é a mesma. A concentração de nitrato causou efeito inibitório sobre a velocidade de assimilação do carbono inorgânico (Fig. 10). Collos & Slawyk (1979), trabalhando com *P. tricornutum*, notaram esse efeito e o relacionaram ao estado nutricional das células. Falkowski & Stone (1975), trabalhando com população natural, também observaram esse efeito e atribuíram-no a uma provável competição entre o mecanismo de assimilação de NO_3^- e o mecanismo de assimilação do ^{14}C , pela adenosina trifosfato, ATP. Neste trabalho, as células estavam em inanição de nitrogênio no início do experimento. Assim, a inibição poderia ter sido causada pelo estado nutricional das células. Mas não fica excluída a possibilidade da competição pelo ATP. A confirmação dessas hipóteses será feita em trabalho experimental, já em andamento. Com a finalidade de demonstrar que a intensidade luminosa utilizada para a produtividade primária não ocasionou fotoinibição, foi feita uma curva de luz-fotosíntese. A curva não apresentou o patamar característico de populações submetidas à saturação luminosa (Teixeira, 1979) (Fig. 14).

O valor ecológico das constantes K_s e V_{max} tem sido ressaltado por vários autores (Thomas & Dodson, 1974; Harris, 1978; Droop, 1974). Thomas & Dodson (1974) concluíram que as células fitoplanctônicas de águas oligotróficas tropicais sofrem dupla depressão: uma,

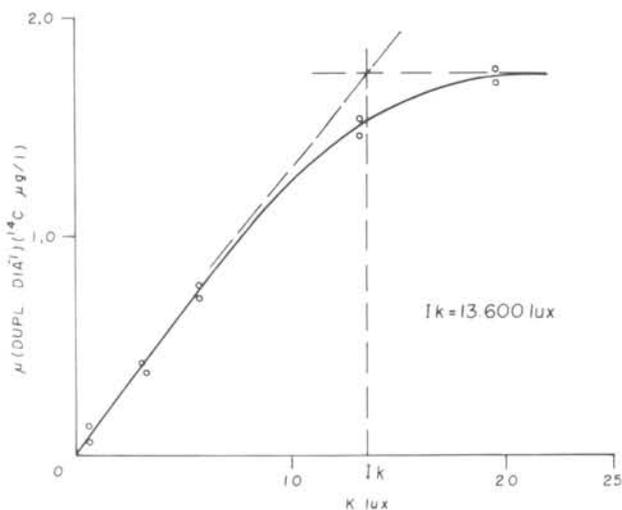


Fig. 14. Velocidade de crescimento da cultura de *P. tricornutum*, em função da intensidade luminosa, medida como fotossíntese.

com a temperatura média das águas tropicais exigindo um maior consumo de nutrientes, pelo aumento do metabolismo; outra, pelo fato de que os nutrientes são escassos nos ambientes marinhos oligotróficos. A ocorrência dessa dupla depressão foi constatada através da variação dos valores de K_s e V_{max} . Harris (1978) afirma que existem várias evidências de que o fitoplâncton ajusta sua velocidade de crescimento às condições de flutuação ambiental, de forma a torná-la tão constante quanto possível. Outra hipótese citada por Harris (*op. cit.*), seria a de uma maximização da velocidade de crescimento como objetivo último da população fitoplanctônica. Essa maximização seria alcançada através da regulação do metabolismo celular dentro de uma mesma espécie e a seleção de espécies diferentes, com tamanhos e velocidades de crescimento diferentes. Droop (1974) salienta o valor dessas constantes para modelo matemático de crescimento do fitoplâncton em culturas de laboratório, mas assinala que ele será muito ampliado quando for determinado para populações naturais.

As K_s e V_{max} de outras espécies do fitoplâncton marinho devem ser investigadas, procurando a confirmação das observações de outros autores quanto às diferenças nos valores dessas constantes. A importância ecológica dessas constantes não deve ser subestimada, uma vez que podem auxiliar na compreensão da distribuição e sucessão do fitoplâncton. Esse estudo também é importante para a economia do fitoplâncton, pois, através da variação dessas constantes, podemos avaliar as reais necessidades nutricionais do fitoplâncton em função do aumento da temperatura (Thomas & Dodson, 1974).

Neste estudo, pode-se concluir que a cultura de *P. tricornutum* utilizada apresentou melhor afinidade pelo nitrato como fonte de nitrogênio.

Resumo

Foram determinadas as velocidades de crescimento e de assimilação da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*, em função da concentração de nitrato e amônia.

A fluorescência "in vivo" da cultura foi comparada com o número de células nas culturas crescendo em diferentes concen-

trações de nitrato e amônia. A velocidade de crescimento foi determinada como clorofila-*a* sintetizada, número de células no meio de cultura e assimilação de carbono durante a fotossíntese. A velocidade de assimilação de nutrientes foi determinada como nitrato e amônia consumidos.

Foi observada inibição na velocidade de assimilação do carbono inorgânico, com a adição de nitrato ao meio de cultura.

Agradecimentos

Agradeço à Organização dos Estados Americanos, OEA, pelo auxílio concedido para a aquisição do carbono radioativo utilizado neste trabalho.

Referências bibliográficas

- ANTIA, N. J.; BERLAND, B. R.; BONIN, D. J. & MAESTRINI, S. Y. 1975. Comparative evaluation of certain organic and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 55:519-553.
- BOROWITZKA, M. A. & VOLCANI, B. E. 1978. The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of its morphotypes. *J. Phycol.*, 14:10-21.
- BRAARUD, T. 1961. Cultivation of marine organisms as a mean of understanding environmental influences on populations. In: Sears, M., ed. - *Oceanography*. Washington, D. C., Am. Ass. Adv. Sci., p. 271-298.
- BUTTON, D. K. 1978. On the theory of control of microbial growth kinetics by limiting nutrient concentrations. *Deep Sea Res.*, 25:1163-1177.
- CAPERON, J. 1967. Population growth in micro-organisms limited by food supply. *Ecology*, 48(5):715-721.
- CARPENTER, E. J. & GUILLARD, R. R. L. 1971. Intraspecific differences in nitrate half-saturation constants for three species of marine phytoplankton. *Ecology*, 52(1):183-185.
- COLLOS, Y. & SLAWYK, G. 1979. ¹³C and ¹⁵N uptake by marine phytoplankton. I. Influence of nitrogen source and concentration in laboratory cultures of diatoms. *J. Phycol.*, 15:186-190.
- DOWD, J. E. & RIGGS, D. S. 1965. A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetics constants from various linear transformation. *J. biol. Chem.*, 240(2):863-969.
- DROOP, M. R. 1974. The nutrient status of algal cells in continuous culture. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 54:825-855.
- DUGDALE, R. C. 1967. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.*, 12:685-695.
- & GOERING, J. J. 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.*, 12:196-206.
- EPPLEY, R. W.; ROGERS, J. N. & MCCARTHY, J. J. 1969. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 14:912-919.
- & THOMAS, W. H. 1969. Comparison of half-saturation constants for growth and nitrate uptake of marine phytoplankton. *J. Phycol.*, 5(4):375-379.
- FALKOWSKI, P. G. 1975. Nitrate uptake in marine phytoplankton: (nitrate, chloride) activated adenosin triphosphate from *Skeletonema costatum*. *J. Phycol.*, 11:323-326.
- & STONE, D. P. 1975. Nitrate uptake in marine phytoplankton: energy sources and the interaction with carbon fixation. *Mar. Biol.*, 32:77-84.
- FITZGERALD, G. P. 1975. Factors affecting the algal assay procedure. Completion Report nº 20460. U.S. Environmental Protection Agency, 31p.
- GALVÃO, S. M. F. G. 1978. Produção primária da Baía de Santos, Estado de São Paulo. Aspectos sobre a eficiência fotossintética num ambiente poluído. Dissertação de mestrado.

- Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 53p.
- GUILLARD, R. R. L. & RYHER, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). Can. J. Microbiol., 8:229-239.
- HARRIS, G. P. 1978. Photosynthesis, productivity and growth. The physiological ecology of phytoplankton. Arch. Hydrobiol. Beth., Ergeb. Limnol., 10(I-IV):1-171.
- KETCHUM, B. H. 1939. The absorption of phosphate and nitrate by illuminated cultures of *Nitzschia closterium*. Amer. J. Bot., 26:399-410.
- LEHNINGER, A. L. 1976. Bioquímica. São Paulo, Edgard Blüchner, vol. 1.
- LEWIN, J. C. 1958. The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. J. gen. Microbiol., 18:427-432.
- LORENZEN, C. J. 1966. A method for continuous measurements of "in vivo" chlorophyll concentration. Deep Sea Res., 13:223-227.
- MacISAAC, J. J. & DUGDALE, R. C. 1969. The kinetics of nitrate and ammonia by natural populations of marine phytoplankton. Deep Sea Res., 16:45-57.
- MULLIN, J. B. & RILEY, J. P. 1955. A spectrophotometric method evaluation of nitrate in natural waters, particular reference to sea-water. Analytica chim. Acta, 12:464-480.
- PAASCHE, E. 1967. Marine plankton algae grown with light-dark cycles. I. *Coccolithus huxleyi*. Physiologia Pl., 20:946-956.
- 1973. Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. I. *Thalassiosira pseudonana* grown in a chemostat with silicate as limiting nutrient. Mar. Biol., 19:117-126.
- PACKARD, T. T. 1979. Half-saturation constants for nitrate reductase and nitrate translocation in marine phytoplankton. Deep Sea Res., 26:321-325.
- PROVASOLI, L. & CARLUCCI, A. F. 1974. Vitamins and growth regulators. In: Stewart, W. D. P., ed. - Algal physiology and biochemistry. London, Blackwell, p. 741-787.
- QASIM, S. Z.; BHATTATHIRI, P. M. A. & DEVASSY, V. P. 1973. Growth nutrient and kinetics requirements of two tropical marine phytoplankters. Mar. Biol., 21:299-304.
- SAKSHAUG, E. & HOLM-HANSEN, O. 1977. Chemical composition of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve and *Pavlova (Monochysis) lutheri* (Droop) Green as a function of nitrate, phosphate, and iron - limited growth. J. exp. mar. Biol. Ecol., 29:1-34.
- SKOGLUND, L. & JENSEN, A. 1976. Studies on N-limited growth of diatoms in dialysis culture. J. exp. mar. Biol. Ecol., 21:169-178.
- SOLÓRZANO, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochloride method. Limnol. Oceanogr., 14:799-801.
- STEEMANN-NIELSEN, E. 1952. The use of radio-active carbon for measuring organic production in the sea. J. Cons. perm. int. Explor. Mer, 18:117-140.
- STRICKLAND, J. D. H. & PARSONS, T. R. 1960. A manual of sea-water analysis. Bull. Fish. Res. Bd Can., (125):1-185.
- 1968. A practical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Bd Can., (167):1-311.
- TALLING, J. F. 1957. Photosynthetic characteristics of some freshwater plankton diatoms in relation to underwater radiation. New Phytol., 56(1):30-50.
- TEIXEIRA, C. 1973. Introdução aos métodos para medir a produção do fitoplâncton marinho. Bolm Inst. oceanogr., S Paulo, 22:59-92.

- TEIXEIRA, C. 1979. Produção primária e algumas considerações ecológicas da região de Ubatuba (Lat. 23°30'S - Long. 45°06'W), Brasil. Bolm Inst. oceanogr., S Paulo, 28(2):23-28.
- & VIEIRA, A. A. H. 1976. Nutrient experiments using *Phaeodactylum tricornutum* as an assay organism. Bolm Inst. oceanogr., S Paulo, 25(1):29-42.
- THOMAS, H. W. 1964. An experimental evaluation of the ^{14}C method for measuring phytoplankton production, using cultures of *Dunaliella primolecta* Butcher. J. Fish. Res. Bd Can., 26:1133-1145.
- THOMAS, H. W. & DODSON, A. N. 1974. Effect of interactions between temperature and nitrate supply on the cell division rates of two marine phytoflagellates. Mar. Biol., 24:213-217.
- VIEIRA, A. A. H. 1980. Excreção de matéria orgânica dissolvida por populações fitoplanctônicas marinhas. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 160p.
- (Manuscrito recebido em 10/Mar./1981;
aceito em 06/Abr./1982)