

Ínsula	Florianópolis	Nº 19	Suplemento	289 a 298	1989
--------	---------------	-------	------------	-----------	------

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO E FOSFATO NA TAXA DE CRESCIMENTO DA DIATOMÁCEA *THALASSIOSIRA MÍNIMA* GAARDER, UTILIZANDO-SE BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO

CRISTINA SOUZA FREIRE NORDI*

RESUMO

Foram feitos experimentos com cultura sob condições controladas em laboratório, utilizando a diatomácea *Thalassiosira mínima*, submetida a diferentes concentrações de nitrato e fosfato.

O meio de cultura utilizado foi água do mar artificial com as soluções nutritivas do meio Conway e diferentes concentrações de nitrato (de 0,00 a 2000,0 μg at $\text{N-NO}_3/\text{l}$) e fosfato (0,0 a 507,3 μg at $\text{P-PO}_4/\text{l}$).

Através dos parâmetros analisados (curvas de crescimento, rendimento final e constantes de crescimento) verificou-se que o melhor desenvolvimento da espécie *Thalassiosira mínima*, foi na faixa de 50,0 a 1000,0 μg at $\text{N-NO}_3/\text{l}$ para nitrato, e de 1,3 a 64,1 μg at $\text{P-PO}_4/\text{l}$ para fosfato. Nas concentrações mais elevadas, tanto para nitrato (2000 μg at $\text{N-NO}_3/\text{l}$) ou fosfato (507,3 μg at $\text{P-PO}_4/\text{l}$), houve redução no crescimento da alga. Os resultados parecem indicar que fosfato foi mais limitante ao crescimento dessa alga, do que nitrato.

ASSUNTO: Cultura de microalgas em laboratório, experimentos sobre efeitos de concentrações de nutrientes (nitrato e fosfato).

PALAVRA-CHAVE: Nitrato, fosfato, crescimento, cultura e *Thalassiosira mínima*.

* Pós-graduanda do P.PGERN - Universidade Federal de São Carlos.
Este trabalho foi realizado com bolsa do CNPq.

ABSTRACT

The influence of nitrate and phosphate concentrations on growth of diatom *Thalassiosira minima* Gaarder, using bioassays.

The assays were realized using batch cultures of diatom *Thalassiosira minima*, with different concentrations of nitrate and phosphate.

The culture medium, was artificial seawater (35‰) with solutions of Conways medium and different concentrations of nitrate (0,0 to 2000,0 μg at $\text{N-NO}_3/1$) and phosphate (0,0 to 507,3 μg at $\text{P-PO}_4/1$).

The results showed that *Thalassiosira minima* grew better at concentrations ranging from 50,0 to 1000,0 μg at $\text{N-NO}_3/1$ for nitrate and 1,3 to 64,1 μg at $\text{P-PO}_4/1$ for phosphate. At highest concentrations from both nutrients, 2000,0 μg at $\text{N-NO}_3/1$ and 507,3 μg at $\text{P-PO}_4/1$, the growth was decreased in relation to the others.

KEY WORDS: Nitrate, phosphate, bioassay, growth and *Thalassiosira minima*.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das pesquisas a respeito da produção primária do fitoplâncton, levou a evidenciar processos e situações que não podiam ser explicados apenas por meio de métodos descritivos, baseados em dados coletados no campo. Estudos envolvendo culturas de algas em laboratório sob condições controladas, tem um importante papel na compreensão dos fenômenos ecológicos. Portanto, para uma melhor compreensão dos mecanismos que influenciam o crescimento dos organismos necessita-se da síntese dos resultados de pesquisas fisiológicas e bioquímicas em laboratório, com resultados obtidos no campo.

Bioensaios com algas, realizados com fitoplâncton natural ou em cultivo, podem indicar o fator nutricional limitante ao crescimento algal, detectar o efeito de mudanças nas concentrações de nutrientes sobre o crescimento, como também permitir o conhecimento do potencial de crescimento (biomassa máxima) de diferentes massas d'água.

No Brasil, existem poucos trabalhos utilizando bioensaios com algas em laboratório, relativo a nutrientes. Dentre eles temos

principalmente os de TEIXEIRA & VIEIRA (1976) e SCHMIDT (1982,1983 a e b). Para o Nordeste, há um trabalho realizado NEPREMAR (dados não publicados), utilizando duas espécies de diatomáceas, relacionado com a detecção de nutrientes limitantes.

Aliado portanto, à escassez de informações sobre o assunto, realizou-se esse trabalho abordando um aspecto básico, que teve como objetivo detectar os requerimentos nutricionais da diatomácea *Thalassiosira mínima*, em relação a nitrato e fosfato, utilizando-se bioensaios em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

A diatomácea utilizada nesta pesquisa, *Thalassiosira mínima*, foi isolada da costa da Paraíba (Ponta Seixas) e vem sendo mantida em culturas unialgais não axênicas, no laboratório do NEPREMAR (Núcleo de Estudos e Pesquisas sobre assuntos do Mar - UFPb).

Os experimentos foram mantidos em estufa incubadora - DBO a $25 \pm 1^{\circ}$ C, com fotoperíodo de 12 horas e iluminação fornecida por quatro lâmpadas fluorescentes, de 50 w cada uma. O meio de cultura utilizado foi água do mar artificial a 35‰ (KESTER et alii, 1967) com as soluções nutritivas do meio CONWAY (WALNEE, 1966) e diferentes concentrações de nitrato (0; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 500,0; 1000 e 2000 g at $N-NO_3/1$) ou fosfato (0,0; 1,3; 5,1; 7,7; 12,8; 25,6; 64,1; 128,2 e 507,3 g at $P-PO_4/1$). As algas foram mantidas em jejum por 3 dias em água do mar artificial sem nutrientes para garantir que o "pool" interno de nutrientes armazenado pelas células, fosse consumido pelas mesmas. Após esse tempo, inóculos dessas culturas foram transferidos para balões experimentais, com 100 ml de meio. Os inóculos iniciais variaram de 2000 a 3500 células/ml.

Foram feitas para cada teor de nutrientes testado, curvas de crescimento utilizando-se contagens diárias das algas em microscópio invertido (amostras menos concentradas) e em lâmina de Fuchs Rosenthal (amostras mais concentradas), e a partir delas calculou-se suas razões de crescimento:

$K = (\log_{10} N - \log_{10} No/t) \times 3,322$, onde:

N = número de células/ml no final da fase exponencial

No = número de células/ml no início da fase exponencial

t = tempo em dias entre N e No.

RESULTADOS

Pela figura 1 e tabela I, verificou-se que a concentração original para nitrato do meio Conway (100 μg at $\text{N-NO}_3/1$) proporcionou um bom crescimento da alga *Thalassiosira minima*, mas este foi inclusive superado com as concentrações mais baixas de nitrato, entre 50 e 500 μg at $\text{N-NO}_3/1$. Este efeito é bem evidenciado, quando se compara os dados de constantes de crescimento (K) e rendimento final (Tabela I). A concentração mais elevada de nitrato utilizada (2000 μg at $\text{N-NO}_3/1$), provocou uma diminuição no crescimento desta diatomácea, e a ausência deste nutriente (0 μg at $\text{N-NO}_3/1$) não causou uma limitação muito grande no seu desenvolvimento.

Através da figura 2, observou-se que as curvas de crescimento, são bem semelhantes entre si para uma ampla variação de concentrações de fosfato (de 1,3 a 64,1 μg at $\text{P-PO}_4/1$). Analisando-se a tabela II, verificou-se que os maiores rendimentos finais foram obtidos nas concentrações de 12,8 a 64,1 μg at $\text{P-PO}_4/1$, superando inclusive os resultados obtidos para a concentração original do meio utilizado (128,2 μg at $\text{P-PO}_4/1$). Também obteve-se uma diminuição do crescimento com a maior concentração de fosfato (507,3 μg at $\text{P-PO}_4/1$) e a ausência deste nutriente, provocou uma inibição no crescimento desta alga.

DISCUSSÃO

Pouca atenção tem sido dada à relação entre a produção de biomassa e o enriquecimento com nutrientes, principalmente quanto à sua perda resultante da tomada em excesso e consequentemente excreção ou utilização de concentrações não balanceadas.

Neste trabalho verificou-se que com concentrações menores do que as originais do meio utilizado (Conway), obteve-se maior crescimento e maior rendimento das células de *Thalassiosira minima* em relação a nitrato e fosfato. A escassez de pesquisas nesta área somada ao fato de que os requerimentos nutricionais variam com as espécies, dificultam as análises comparativas. MAESTRINI & GONZALEZ - RODRIGUEZ (1983), realizaram um estudo similar a este utilizando seis espécies de algas; e obtiveram produção máxima para concentrações 1,5 vezes menores que a do meio Conway, exceto para uma delas (*Rhodomonas lenz*). CHU (1943) trabalhando com seis espécies, incluindo clorofíceas e diatomáceas, demonstrou que a biomassa de todas, ex-

ceto uma, foi máxima entre 497 e 757 ug at N-NO₃/l. BERLAND et alii (1973 b) fizeram experimentos com a diatomácea *Skeletonema costatum* para medir o potencial de crescimento da água do mar. Obtiveram crescimento máximo para nitrato e fosfato correspondentes a 1/4 da do meio ASP₂.

Constatou-se também com os experimentos realizados, que as concentrações máximas utilizadas para nitrato e fosfato, provocaram uma queda no crescimento da diatomácea *Thalassiosira minima*. BERLAND et alii (op.cit) também observaram que as concentrações do meio ASP₂, correspondem aos limites superiores que não devem ser ultrapassados. WITT et alii (1981) afirmaram que altas concentrações por eles utilizadas, 12 ug N/l e 2,4 ug P/l, em estudos com a clorofícea *Nannochloris* sp., não levaram a inibição do crescimento. Contudo, tais concentrações não são de fato tão elevadas, desde que correspondem a 857,0 ug at N-NO₃/l e 80,0 ug at P-PO₄/l.

Pelos resultados, parece que fosfato foi mais limitante ao crescimento da alga em estudo, do que nitrato. Por outro lado também, talvez o tempo de jejum não tenha sido suficiente para que a microalga esgotasse toda sua reserva intracelular de nitrato, daí não ter havido uma redução muito grande no seu crescimento com relação a este nutriente. Esta questão de tempo de jejum ("starvation") é bem discutido no trabalho de BERLAND et alii (1973 a).

Estudos realizados com esse tipo de experimento são sempre oportunos, pois mostram as exigências fisiológicas do organismo a ser utilizado em bioensaios. Possibilita também definir as concentrações ótimas dos diferentes enriquecimentos, inclusive para aplicação em águas naturais. Como este trabalho é praticamente um dos primeiros com esta espécie de diatomácea, *Thalassiosira minima*, necessita-se ainda de mais pesquisas envolvendo outros nutrientes e diferentes combinações entre eles, para se chegar a conclusões mais abrangentes.

CONCLUSÕES

O melhor desenvolvimento para a alga *Thalassiosira minima*, tanto para nitrato como fosfato, foi obtido com concentrações menores que as do meio Conway, havendo portanto, elevação na produção de células com menor gasto de nutrientes.

As concentrações mais elevadas do que a do meio de cultura, provocaram redução no crescimento dessa espécie, tanto para nitrato como para fosfato.

Comparando-se as curvas de crescimento na ausência de nitrato e fosfato, verificou-se que fosfato foi mais limitante ao crescimento de *Thalassiosira minima*, do que nitrato.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio logístico do NEPREMAR (Núcleo de Estudos e Pesquisa dos Recursos do Mar - Universidade Federal da Paraíba).

Meus agradecimentos a todas as pessoas do laboratório de microalgas do NEPREMAR que me auxiliaram na realização desta pesquisa e em especial ao Dr. Roberto Sassi pelo apoio e incentivo.

BIBLIOGRAFIA

- BERLAND, B. R.; BONIN, D. J.; MAESTRINI, S. Y. & POINTER (1973 a)
Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues - II - Limitation nutritionnelle et viabilité de l'inoculum. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 58 (3): 203 - 220.
-
- (1973 b)
Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de testes biologiques effectués avec des cultures d'algues. III- Réponses de la diatomée *Skeletonema costatum* à différents concentrations d'elements nutritifs. *Int. Revue ges. Hidrobiol.* 58 (3): 401 - 416.
- CHU, S. P. (1943) Influence of mineral composition of medium on the growth of plankton algae. Part II - The Influence of concentration of inorganic nitrogen and phosphate phosphorus . *J. Ecol.* 31: 109 - 148.
- KESTER, D. R.; DUEDAL, I. W.; CONNORS, D. W. & PYTROECZ, R. M. (1967). Preparation of artificial seawater. *Limnol. Oceanogr.* 12: 176 - 178.
- MAESTRINI, Y. & GONZALES - RODRIGUEZ, Z. (1983). Relative yields of marine algae growth in heavily nutrient - enriched seawater. *La Mer*, 21: 145 - 150.
- SCHIMIDT, G. (1982). Algumas observações sobre a cinética do fitoplancton marinho. I - Influência da concentração de nitrato e amônia, na velocidade de crescimento e assimilação desses nutrientes na diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin).

Bolm. Inst. Oceanogr.; S.P., 31 (2): 13 - 27.

_____, (1983 a). Some observations on marine phytoplankton Kinetics. 2 - The effect of nitrate and ammonium concentrations on the growth and uptake rates of the natural population of Ubatuba Region, S.P. (23°S., 045°W). *Bolm. Inst. Oceanogr.*, S.P.; 32(1): 83 - 90.

_____, (1983 b). Note on the effect of high nitrate concentration and light intensity on the growth and uptake rates of *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) culture. *Bolm. Inst. Oceanogr.*, S.P., 32(1): 91 - 98.

TEIXEIRA, C. & VIEIRA, A. A. H. (1976). Nutrient experiment using *Phaeodactylum tricornutum* as an assay organism. *Bolm. Inst. Oceanogr.*, S.P., 25: 29 - 42.

WALNEE, P. R. (1966). Experiment in large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *J. Fishery Invest. Lond. Serv.*, 25 (4): 1 - 35

WITT, V.; KOSKE, P. H.; KULMAN, D.; LENZ, J. & NELLEN, D. (1981) . Production of *Nannochloris* sp. (Chlorophyceae) in large scale outdoor tanks and its use as a food organism in marine Aquaculture, 23: 171 - 181.

TABELA I - Constantes de crescimento (k) e rendimento final (células/ml) nas diferentes concentrações de nitrogênio (NO₃), testadas no bioensaio com a diatomácea *Thalassiosira mínima*.

Concentração ug at N-NO ₃ /l	k (divisão/dia)	Rendimento final (células/ml x 10 ³)
0,0	1,25	31,93
1,0	1,32	43,61
5,0	1,49	47,74
10,0	1,41	57,58
50,0	1,54	132,19
100,0	1,45	106,75
500,0	1,52	153,38
1000,0	1,41	140,42
2000,0	1,28	79,29

TABELA II - Constantes de crescimento (k) e rendimento final (células/ml) nas diferentes concentrações de fósforo (PO₄) testadas no bioensaio com a diatomácea *Thalassiosira mínima*.

Concentração ug at P-PO ₄ /l	k (divisões/dia)	Rendimento final (células/ml x 10 ³)
0,0	1,38	22,48
1,3	1,80	256,88
5,1	1,80	171,25
7,7	1,76	202,27
12,8	1,70	345,00
25,6	1,78	309,29
64,1	1,84	356,50
128,2	1,78	187,19
507,3	1,78	75,53

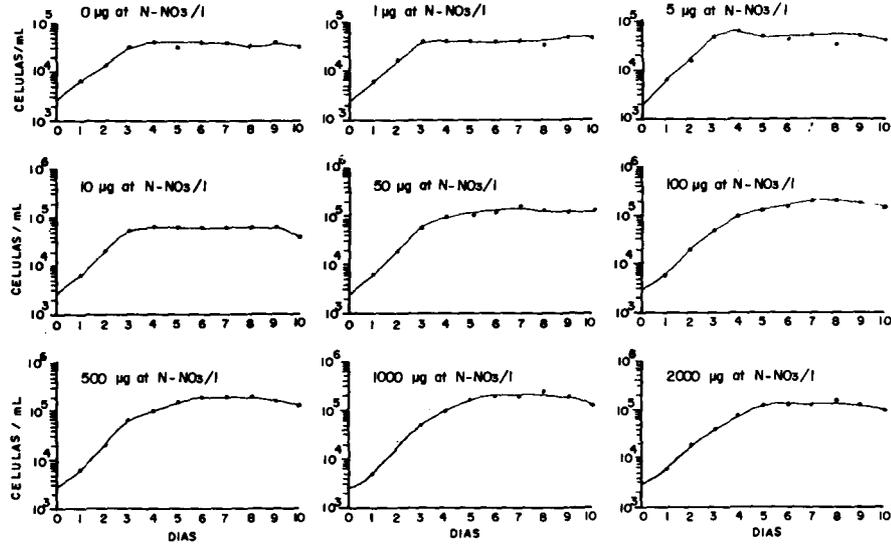


FIGURA 1 - Curvas de crescimento da diatomácea *Thalassiosira minima*, submetida a diferentes concentrações de nitrato (NO₃)

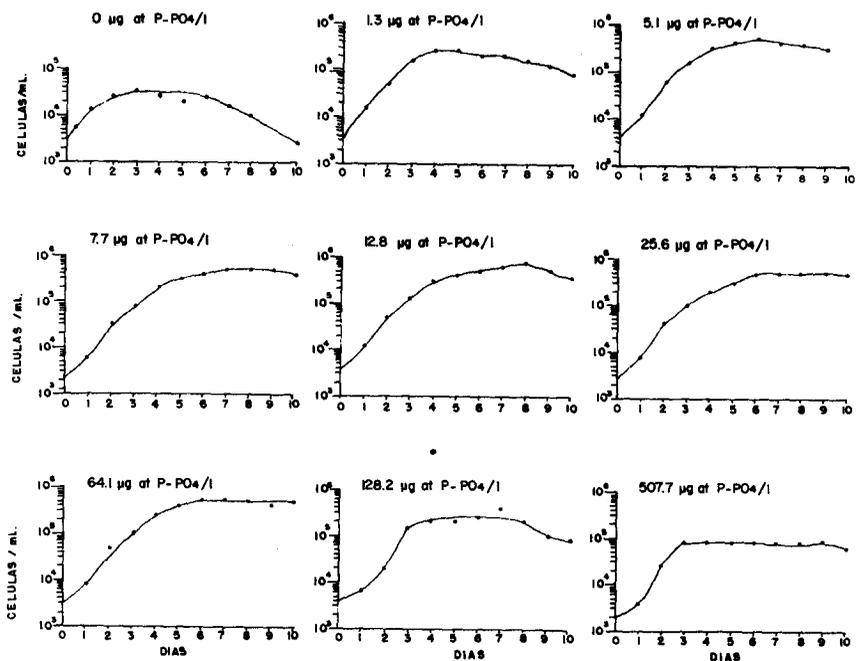


FIGURA 2 - Curvas de crescimento da diatomácea *Thalassiosira minima*, submetida a diferentes concentrações de fosfato (PO_4).