

**CIANOFÍCEAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO DO
ESTUÁRIO DA LAGOA DOS PATOS, RS: TESTES DE
CULTIVO EM LABORATÓRIO.**

João S. YUNES
Sônia R. de MELO

ABSTRACT.

Nitrogen-fixing blue-green algae from the Lagoa dos Patos estuary, RS: laboratory experiments on culture.

Heterocystous blue-green algae grow regularly well in a nitrogen media, but not the non-heterocysts species. This work aimed to identify the ideal combination of culture media and illumination pattern with species collected in Patos Lagoon, RS. We tested the growth of heterocystous blue-greens and non-heterocystous species in a nitrogen-free (ASM-1 and VB-S) and a nitrogen media (VB). Under conditions of a shade illumination or alternated light and dark cycles, it showed a growth in the VB-S medium as it did in the VB medium, under any illumination pattern. Then, a prominent growth of blue-greens, heterocystous or not, may be achieved using nitrogen-free medium, when incubated under illumination conditions which enable the non-heterocystous

* Departamento de Química, Fundação Universidade do Rio Grande, Caixa Postal 474, 96 200 Rio Grande, Rio Grande do Sul. Este trabalho contou com auxílio a pesquisa do CNPq.

species to use their protection mechanisms against photosynthetic O₂, like the alternated cycles of 12 hs light and 12 hs dark.

Key Words: Cyanophyta, Nitrogen-fixation, Laboratory cultures.

RESUMO

Algumas cianofíceas heterocísticas desenvolvem-se em meios minerais sem nitrogênio incorporado, porém as não heterocísticas não. Realizamos este trabalho no intuito de estabelecer as combinações ideais entre os meios de cultivo e condições de iluminações com espécies coletadas na Lagoa dos Patos, RS. Testamos o crescimento de cianofíceas heterocísticas ou não em meios minerais sem N incorporado (ASM-1) e com N incorporado (VB). Obtivemos que em condições de iluminação difusa ou de ciclos alternados, o crescimento ocorre no meio VB-S como ocorre da mesma forma no meio VB sob qualquer condição de iluminação. Deste modo concluímos que pode-se obter um bom crescimento de cianofíceas fixadoras de N₂ heterocísticas ou não, utilizando-se meios de cultivo sem compostos nitrogenados. Basta apenas que estes sejam incubados em condições de luz onde as cianofíceas, principalmente as não heterocísticas, possam utilizar os seus mecanismos naturais de proteção contra o O₂ fotossintético, como as do ciclos de 12 hs de luz, 12 hs de escuro.

Palavra chave: Cyanophyta, fixação de nitrogênio, cultura de laboratório.

INTRODUÇÃO

Em um experimento inicial, coletamos cianofíceas no estuário da Lagoa dos Patos. Estas algas foram cultivadas sob iluminação constante no meio mineral ASM-1, (modificado por TOZUM et al. 1977) um meio recomendado para algas planctônicas de crescimento rápido. Neste, observou-se o desenvolvimento de quatro culturas unialgais dos gêneros *Calothrix*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Chlorogloepsis*. Todas elas heterocísticas e em cultura líquida apresentaram hábitos bentônicos, formando uma densa camada na superfície interna dos frascos e porosas dos borbulhadores.

A não sobrevivência de formas unialgais não heterocísticas

indicou-nos que a manutenção destas culturas sob luz constante neste meio mineral de pouco carbono e sem sais de Nitrogenio pode ser seletivo às formas fixadoras de N₂ semiaeróbicas como *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Lyngbya* e outras filamentosas também não heterocísticas com restrições aos níveis de O₂ dissolvidos no meio (STEWART, 1980; GALLON, 1980). Visto que, estas cianofíceas filamentosas fixam N₂ na ausência de luz (STAL & KRUMBEIN, 1985; KHAMEES et al. 1987).

Assim, realizamos no presente trabalho coletas de algas cianofíceas no mesmo local e as testamos no meio mineral Van Baalen (modificado de KRATZ & MYERS, 1955), indicado para cianofíceas unicelulares por possuírem compostos nitrogenados. Igualmente foi experimentado uma adaptação deste meio (VB-S) sem sais de Nitrogênio, além do meio anteriormente utilizado, ASM-1. Testamos também as condições de iluminação, sob luz constante, como é classicamente recomendado (STEIN, 1973), luz alternada com escuro por 12 hs cada (MILLINEAUX, 1981) e de luz difusa, visando minimizar a intensa radiação luminosa constante (PENTE-COST, 1985).

Nosso objetivo neste trabalho foi determinar as combinações ideais de meios de cultivo-condições de iluminação para promover o crescimento em laboratório de cianofíceas fixadoras de N₂, heterocísticas ou não.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta: As algas foram coletadas numa área da Lagoa dos Patos conhecida como Estação do Saco do Justino em dezembro de 1985 e outubro de 1986. Foram utilizadas raspagem do sedimento do fundo, raspagem das raízes de macrofitas das margens e coleta direta de algas flutuantes no local.

Cultivo: Foram preparadas 27 placas de ágar bacteriológico "Difco" a 1% nos meios líquidos de cultivo ASM-1, VB e VB-S. Destas placas, 9 foram mantidas sob a luz constante de 4 lâmpadas fluorescentes OSRAM 20W, 9 sob luz constante cobertas com duas camadas de tecido fino (Luz difusa) e 9 sob condições de iluminação alternadas (12 hs de luz, 12 hs de escuro). Todas estas mantidas em câmara climática a 25°C.

Composição dos meios minerais: Os meios minerais ASM-1(4); VB, Van Baalen, modificado (2) e VB-S (VB modificado por nosso grupo), apresentam a seguinte composição para 1 litro de água destilada deionizada.

	ASM-1	VB	VB-S
NaCl	0,116 g	—	0,72g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0744g	0,25g	0,25g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0622g	—	—
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0309g	—	0,025g
K ₂ HPO ₄	0,0174g	1,0 g	1,0 g
Na ₂ HPO ₄	0,0142g	—	—
NaHCO ₃	0,053 g	0,0800g	até o pH desejado
Ca(NO ₃).4H ₂ O	—	0,025g	—
NaNO ₃	—	1,00 g	—
Na ₂ Edta	—	0,031g	0,031g
Fe(SO ₄) ₂ .6H ₂ O	—	0,004g	0,004g
Soluções de			
Microelementos	10 ml	0,6 ml	0,6 ml
CuCl ₂ (8.10 ⁻⁴ M)	10 ul	—	—
CoCl ₂ (8.10 ⁻⁴ M)	100 ul	—	—
MoO ₃ (1.10 ⁻³ M)	100 ul	—	—
pH final	7,6	7,6	7,6

Solução de microelementos para ASM-1 (g/L): H₃BO₃, 0,2474g; FeCl₃.6H₂O, 0,0908g; MnCl₂.4H₂O, 0,1201g; ZnCl₂, 0,0436g; Na₂Edta, 0,7375g.

Solução de microelementos para VB e VB-S (g/L): ZnSO₄.7H₂O, 8,82g; MnCl₂.4H₂O, 1,44g; MoO₃, 0,71g; CuSO₄.5H₂O, 1,57g; CoCl₂.6H₂O, 0,50g.

Estes meios foram autoclavados por 20 minutos a 121°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três meios de cultura testados se caracterizam pela presença (meio VB) ou ausência de compostos nitrogenados (meios ASM-1 e VB-S).

O meio ASM-1 foi testado nestes experimentos para servir como referência pelo crescimento anteriormente obtido dos generos:

Nostoc, Anabaena, Chlorogloepsis e Calothrix, todos heterocíclicos.

Os resultados foram expressos como número de testes positivos de crescimento nas placas utilizadas. O crescimento foi menor usando o meio ASM-1 do que os meios VB e VB-S (fig. 1). O número de gêneros de cianofíceas obtidas nestes testes também foi maior nos dois últimos meios, mostrando assim que a combinação dos seus elementos químicos pode selecionar muitos dos gêneros que oportunamente se desenvolveram nestes meios. Obtivemos 9 gêneros nos cultivos em VB, 7 gêneros nos cultivos em VB-S contra apenas *Nostoc* e *Oscillatoria* nos cultivos em ASM-1.

O resultado dos testes em relação apenas aos diferentes graus de iluminação não mostraram uma preferência evidente (fig. 2). Em todas as condições de luz experimentadas os números de testes positivos e de gêneros encontrados foram aproximados. O que parece é que essas três modalidades de iluminação testadas, quando avaliadas isoladamente não interferem no crescimento das cianofíceas fixadoras de N₂, porém o seu efeito seria dependente da presença ou não de compostos nitrogenados entre os sais dos meios minerais (figs. 2 e 3).

Ao combinar-se os três meios de cultivo com as três modalidades de iluminação (fig. 3), encontramos que as melhores combinações estão tanto no meio VB ou VB-S nas condições de iluminação por luz difusa ou por luz alternada, 12 horas de luz, 12 horas de escuro. Assim, o efeito da iluminação sobre o crescimento de algas cianofíceas fixadoras de N₂ parece ser diretamente dependente da disponibilidade de compostos nitrogenados (no meio VB há um bom crescimento nas três condições de luz, porque neste existem sais de nitrogênio). Por outro lado, a fixação de N₂, único processo capaz de colocar compostos nitrogenados nas células de cianofíceas que cresçam em meios sem Nitrogênio, é inibida pelo O₂ devido a inativação da nitrogenase (ROBSON & POSTGATE, 1980). Assim o produto da fotossíntese, quando intensa, pode estar selecionando o crescimento de cianofíceas com capacidade de fixação de N₂ restritas aos níveis de O₂.

A evolução levou a compartimentação da fixação de N₂ em cianofíceas sob a forma de heterocistos (SCHOPF & WALTER, 1982). Para estas a luz constante não inibe a atividade da nitrogenase em meios sem compostos nitrogenados, já que o heterocisto não possui atividade do Fotossistema II e assim é incapaz de liberar O₂ (STEWART, 1980; GALLON, 1980).

Entretanto, decididamente seleciona o crescimento daquelas

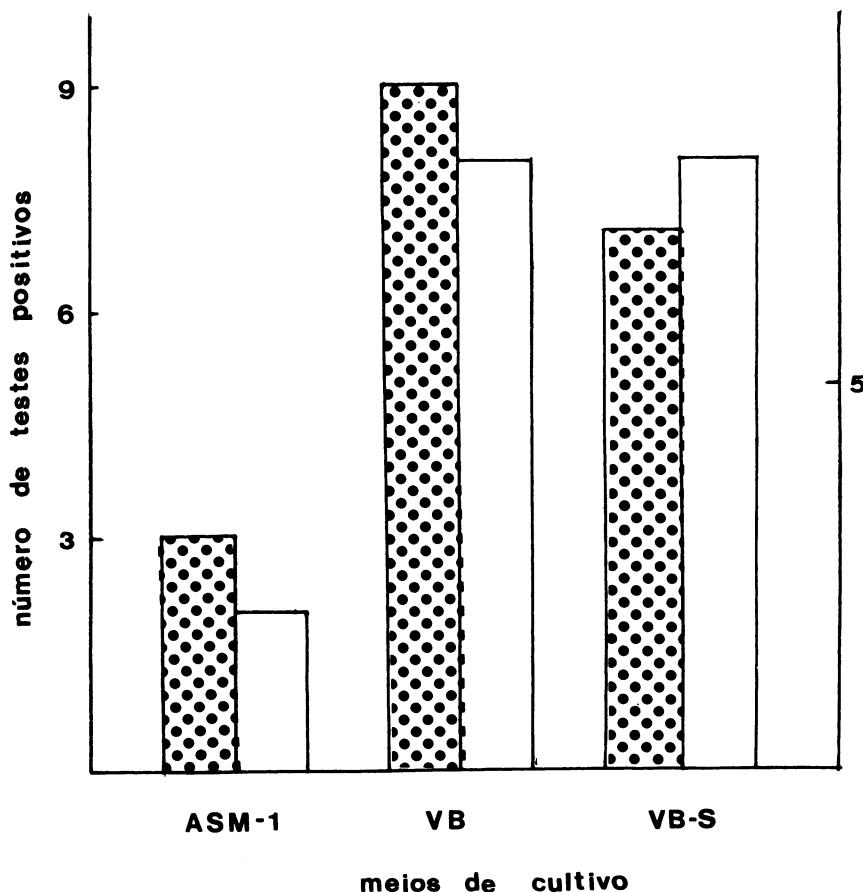


Figura 1 — Crescimento de cianofíceas nos 3 meios de cultura testados (ASM-1, VB e VB-S). Foram realizados 9 testes para cada meio de cultura, os resultados são expressos pelo número de testes positivos [●] e pelo número de gêneros encontrados [□]. Cada nove testes foram cultivados nas condições de iluminação propostas.

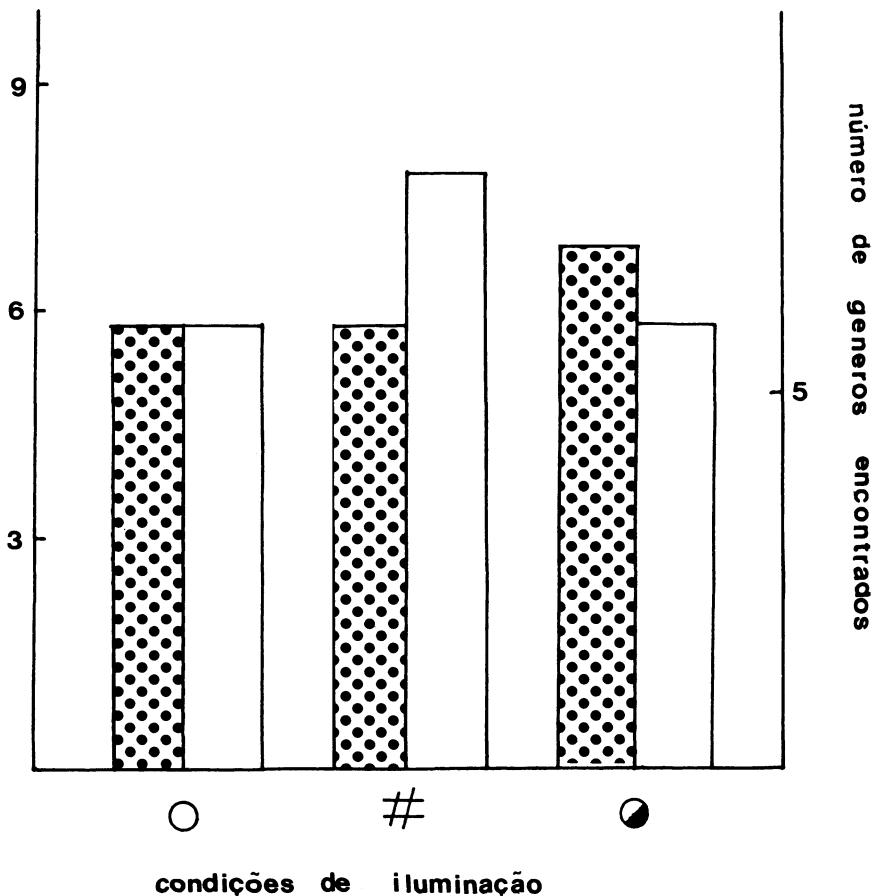


Figura 2 — Crescimento de cianofíceas sob diferentes condições de iluminação ○ (luz total por 24h), # (luz total coberta por tecido duplo) e ● (12h luz, 12h escuro). Foram realizados 9 testes para cada condição de iluminação e os resultados foram expressos pelo número de testes de crescimento positivos [●] e pelo número de gêneros encontrados [□]. Cada nove testes foram cultivados nos meios propostos na figura 1.

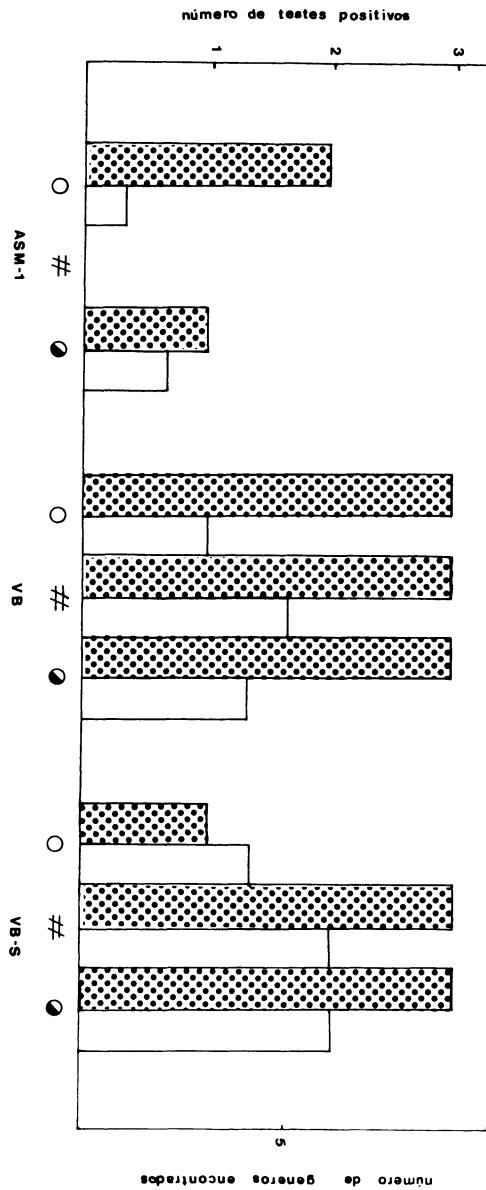


Figura 3 — Crescimento de cianófitas em relação aos meios de cultivo AMS-1, VB e VB-S sob as condições de iluminação de ○, # e ●. Foram realizados 3 testes para cada combinação dos parâmetros meio de cultivo-iluminação. Os resultados foram expressos pelo número de testes positivos de crescimento [●] e pelo número de gêneros encontrados [○].

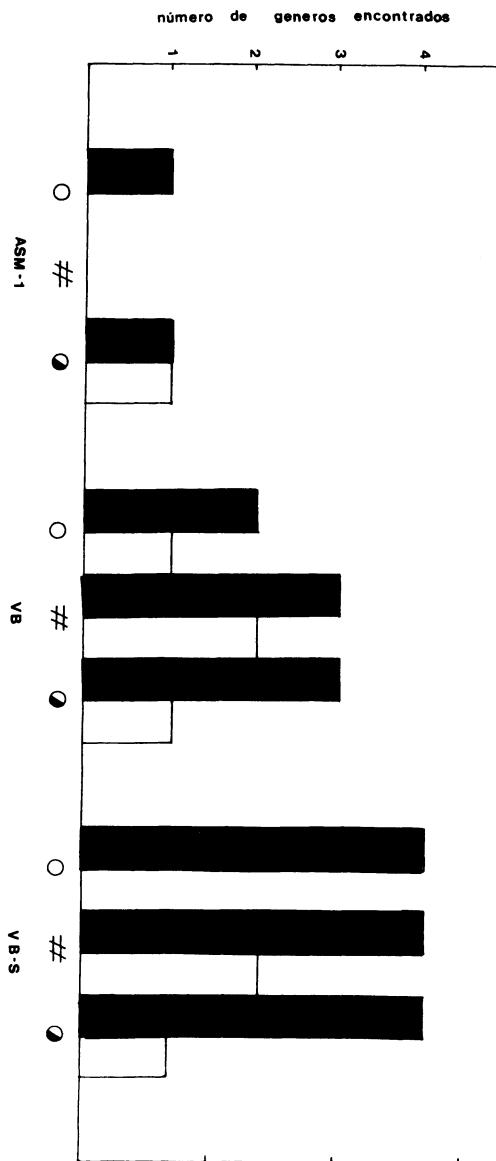


Figura 4 — Crescimento de cianofíceas em relação aos meios de cultivo ASM-1, VB, VB-S sob as condições de iluminação de O, # e *. Foram realizados 3 testes para cada combinação de meio de cultura-iluminação. Os resultados foram expressos pelo número de gêneros heterocíclicos ■ e não-heterocíclicos □.

não heterocísticas (fig. 4, meio VB-S). Por outro lado, este crescimento foi proeminente da mesma forma em números de testes positivos e de gêneros para o meio VB-S nas condições de iluminação difusa e de luz alternada com escuro (fig. 4). Assim conseguimos desenvolver o crescimento de cianofíceas não-heterocísticas de uma espécie de *Microcoleus* e duas espécies de *Oscillatoria* em culturas sólidas obedecendo a mesma seleção a atividade da nitrogenase como já demonstrado em culturas líquidas para *Oscillatoria* sp. (STAL & KRUMBEIN, 1985), *Oscillatoria* sp UCSBB, (KHAMEES et al. 1987) e *Microcoleus chthonoplastes* Thur. (PEARSON et al. 1981).

Os resultados apresentados para o cultivo de cianofíceas em luz difusa (fig. 4), também proporcionaram crescimento de espécies não-heterocísticas. Entretanto, a dificuldade de reproduzir as taxas ideais de irradiação luminosa com este artifício empregado, torna esta modalidade de iluminação não recomendável em culturas líquidas em grande volume de meios de cultivo, e favorece a utilização da iluminação alternada, 12 horas de luz e 12 horas de escuro em meios sem sais de nitrogênio, como o VB-S.

CONCLUSÃO

Os presentes experimentos indicaram que é possível obter-se crescimento de cianofíceas fixadoras de N₂, heterocísticas ou não, quantitativamente e em variedade de gêneros, utilizando-se meios de cultivo sem compostos nitrogenados; como VB-S.

Estes cultivos devem apenas ser cuidadosamente incubados em condições de luz onde as cianofíceas, principalmente as não heterocísticas, possam utilizar seus mecanismos naturais de proteção contra o O₂ fotossintético. Neste caso sugere-se os ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, que são, antes de tudo, as suas condições naturais.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido realizado sem o Auxílio à Pesquisa, destinado pelo CNPq.

REFERÊNCIAS

GALLON, J.R. 1980. Nitrogen Fixation By Photoautotrophos. In

- "Nitrogen Fixation". Stewart, W.D.P. & Gallon, J.R. eds, 18, 197-238. Blackwell; Osford, Londres.
- KHAMEES, H.S.; GALLON, J.R. & CHAPLIN, A.E. 1987. The Pattern Of Acetylene Reduction By Cyanobacteria Grown Under Alternating Light And Darkness. *Br. phycol. J* 22:55-60
- KRATZ, W.A. & MYERS, J. 1955. Nutrition and growth of several Blue-Green Algae. *Ann. J. Bot.* 42:282-7.
- MILLINEAUX, P.M.; GALLON, J.R. & CHAPLIN, A.E. 1981. Acetylene Reduction (nitrogen-fixation) By Cyanobacteria Grown Under Alternating Light-Dark Cycles. *FEMS Microbiol. Let.* 10:245-7.
- PEARSON, H.W.; MALIN, G. & HOWSLEY, R. 1981. Physiological Studies On in vivo Nitrogenase Activity By Axenic Cultures Of The Blue-Green Algae *Microcoleus chthonoplastes*. *Br. phycol. J.* 16:139.
- PENTECOST, A. 1985. Relationship Between Light, Temperature and Photosynthesis in a temperate *Microcoleus* (*Cyanobacterium*) mat. *Microbios* 43:141-8.
- ROBSON, R.L. & POSTGATE, J.R. 1980. Oxygen and Hydrogen in Biological Nitrogen Fixation. *Ann. Rev. Microbiol.*, 34:183-207.
- SCHOPF, J.W. & WALTER, M.R. 1982. Origin And Early Evolution Of Cyanobacteria: the geological evidence. In "The Biology Of Cyanobacteria". Carr, N.G. & Witton, B.A., eds. 582p. Blackwell, Oxford, Londres.
- STAL, L.J. & KRUMBEIN, W.E. 1985. Nitrogenase Activity In The Non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. grown under alternating light-dark cycles. *Arch. Microbiol.* 143:67-71
- STEIN, J.R. 1973. HandBook Of Phycological Methods. 445p. Cambridge University Press, Inglaterra.
- STEWART, W.D.P. 1980. Some Aspects Of Structure And Functionality, Pontal do Sul, PR, 2(supl.):159-70, dezembro 1987

tion in N₂-fixing Cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:497-536.

TÖZUM, S.D.R.; UL-HAQUE, M.I.; CHAPLIN, A.E. & GALLON, J.R. 1977. The Effect of Fluoroacetate on Acetylene Reduction By *Gloeocapsa*. *Biochem. Soc. Trans.* 5:1482-84.