ALINE PATERNOSTRO MARTINS

Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2007

ALINE PATERNOSTRO MARTINS

Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. NAIR SUMIE YOKOYA

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Martins, Aline Paternostro
M383e Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta) / Aline Paternostro Martins -- São Paulo, 2007.
118 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007
Bibliografia.

1. Algas. 2 . Fisiologia. 3. Nitrogênio. I. Título

CDU 582.26

Aos meus pais, Rosa e Eliezer,

minha irmã, Graziela, e meus avós,

José e Zelinda (*in memorian*),

com muito amor.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que possibilitaram a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Aos meus pais, Rosa e Eliezer, pelo amor e incentivo que recebi durante toda vida e que, mesmo com todas as dificuldades, sempre se esforçaram para me educar;

Ao meu avô, psicólogo e professor, José Novaes Paternostro, amante da profissão e dos estudos, o qual sempre agiu dignamente e ajudou quem precisava, grande pessoa e exemplo a ser seguido;

À minha avó, Maria Zelinda Dias Paternostro, pela admiração, carinho e cuidados concedidos a mim durante seus últimos anos de vida, contribuindo enormemente à minha formação;

À minha irmã, Graziela Paternostro Martins, pelo grande amor que tem por mim e pela felicidade com que sempre recebe cada novidade referente a minha carreira;

À minha querida orientadora, Dra. Nair Sumie Yokoya, por tudo o que me ensinou, com enorme dedicação e paciência, e pela sua grande amizade e bons conselhos;

À Fapesp pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de mestrado (processo FAPESP 04/11459-5-9);

À Dra. Fanly Fungyi Chow Ho, do Instituto de Biociências da USP, pela amizade e valiosa colaboração com as análises da enzima nitrato redutase. Obrigada pelo acompanhamento do trabalho, ajuda, sugestões e por tudo o que me ensinou;

Ao Dr. Orlando Necchi Junior, da UNESP de São José do Rio Preto, por permitir a realização das análises de fotossíntese em seu laboratório e pelo carinho com que sempre nos recebeu. E também à Maria Helena pela ajuda e atenção concedida;

À Dra Elisabete Braga, do Instituto Oceanográfico da USP, pela colaboração com as análises da água do mar. Ao Vitor, Tristan e Gláucia pela ajuda nas análises, conversas e amizade;

Aos pesquisadores e funcionários da Seção de Ficologia pelos conselhos, boas conversas e suporte técnico: Dra. Mutue, Dra. Silvia, Dra. Diclá, Dra. Célia, Dra. Luciana, Dra. Andréa, Silvia Melcher, José Domingos, Neide, Neuzete, Elizete e Manuel;

Aos alunos da Seção de Ficologia pela amizade e maravilhosa convivência ao longo desses anos: Ana Carolina, André, César, Cléber, Daniela, Diógina, Felipe, Fernanda Ramlov, Fernanda Rios, Jonatas, Júlio, Marisa, Mônica, Rafael, Raquel, Renato, Rodrigo, Suzana e Valéria;

À seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela infraestrutura cedida para as análises bioquímicas, em especial à Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho, à Mary Monteiro, e à Marina, Amanda e Vanessa;

Aos funcionários da pós-graduação do Instituto de Botânica, especialmente a Márcia Regina Ângelo (Marcinha) e ao Antônio Carlos Borges pelo carinho e bom atendimento;

A todos os funcionários do Instituto de Botânica, pelo auxílio para a execução desse trabalho, em especial ao Aliomar Oliveira Gomes (Mazinho);

A todos os professores, funcionários e alunos do laboratório de algas marinhas do Instituto de Biociências da USP, em especial ao Rosário Petti e aos amigos Leila e José, pela amizade e conselhos;

À Fernanda Ramlov pela companhia, amizade, carinho, conversas e ajudas;

À minha querida amiga e irmã de coração Ana Carolina pelo companheirismo, conversas, risadas e suporte nos momentos difíceis. Por tudo o que passamos juntas nesses últimos anos!!!

Às minhas queridas amigas Deborah, Marina e Suzana pela valiosíssima amizade e apoio constante;

Ao Filipe pela amizade, carinho e incentivo;

À Simone pelo convívio, amizade e companhia;

Aos meus grandes e queridos amigos Flávio, Verônica e Luís pela amizade, incentivo e carinho.

MUITO OBRIGADA!!!

ÍNDICE

ABSTRACT v

RESUMO vii

INTRODUÇÃO E METODOLOGIA GERAL 1

Hypnea musciformis e variantes pigmentares 1
Metabolismo do nitrogênio nas macroalgas marinhas 3
Captação do nitrato 4
Assimilação do nitrato 5
Reserva de nitrogênio 6
Fotossíntese 7
Nitrogênio X Fósforo 8
Objetivos 8
Metodologia geral de cultivo 9

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO *IN VITRO* DA NITRATO REDUTASE EM VARIANTES PIGMENTARES DE *HYPNEA MUSCIFORMIS* (WULFEN IN JACQU.) J.V. LAMOUR. (GIGARTINALES, RHODOPHYTA)

Abstract 12
Resumo 13
Introdução 14
Materiais e métodos 16
Resultados 19
Discussão 22
Referências Bibliográficas 26

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA DISPONIBILIDADE DO NITRATO E DO FÓSFORO NA ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO, NO CRESCIMENTO E NA FOTOSSÍNTESE NAS VARIANTES PIGMENTARES DE *HYPNEA MUSCIFORMIS* (WULFEN IN JACQU.) J.V. LAMOUR. (GIGARTINALES, RHODOPHYTA)

Abstract 29
Resumo 30
Introdução 32
Materiais e métodos 34
Resultados 40

CAPÍTULO 3

CAPTAÇÃO E REMOÇÃO DE NUTRIENTES E LIBERAÇÃO DO NITROGÊNIO ORGÂNICO DISSOLVIDO NA ÁGUA DO MAR ENRIQUECIDA COM NITRATO E FOSFATO PELAS VARIANTES PIGMENTARES DE *HYPNEA MUSCIFORMIS* (WULFEN IN JACQU.) J.V. LAMOUR. (GIGARTINALES, RHODOPHYTA)

Abstract 73
Resumo 74
Introdução 75
Materiais e métodos 76
Resultados 81
Discussão 102
Referências Bibliográficas 105

DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS 109

Otimização do ensaio *in vitro* da nitrato redutase 110

Efeitos da disponibilidade do nitrato e do fosfato no metabolismo do nitrogênio nas variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* 110

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

Abstract

In marine environment, nitrogen is available in the forms of ammonium, nitrate and nitrite, and is considered the main limiting nutrient for seaweed growth. In Brazil, *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour (Gigartinales, Rhodophyta) is the main raw material for carrageenan production, and the knowledge of nitrogen metabolism is very important for the success of its cultivation, as well as the phosphorus availability, which could limit the seaweed productivity. The main objective of the present study was to evaluate the effects of the availability of nitrate and phosphate on growth, photosynthesis and on nitrogen metabolism pathways (uptake, assimilation, storage and turnover) in the light-green (LG) and brown (BR) strains of *H. musciformis*.

Unialgal cultures provided algal biomass used in all experiments, and culture conditions were temperature of 23 ± 2°C, photoperiod of 14 h, irradiance of 60-90 µmol photons.$m^{-2}.s^{-1}$; medium was composed of sterilized seawater (salinity 30 psu) enriched with von Stosch's solution at half strength (VSES/2). Experiments were carried out with plants with nutrient starvation (cultured only in seawater for two weeks) and without starvation (cultured in VSES/2). Experimental conditions were the same as described for unialgal cultures, except for the medium, which was composed by seawater enriched with nitrate (zero to 100 µM) or with nitrate and phosphate (zero to 25 µM), with a N:P relation of 4:1. The activity of nitrate reductase (NR), the contents of proteins and of photosynthetic pigments (AFC - allophycocyanin, FC - phycocyanin, FE - phycoerythrin and Chl *a* - chlorophyll *a*), the photosynthetic rates (GP - gross photosynthesis and NP - net photosynthesis), respiration (RE), and growth rates (GR) were analyzed. The nitrogen and phosphorus uptake and removal, and the release of dissolved organic nitrogen (DON) by both colour strains (in starved plants) were also evaluated.

Firstly, the *in vitro* assay of nitrate reductase (NR) was optimized for both strains, and the optimal conditions were: 40 µM of NADH; 10 min of incubation of crude extracts (CE), and 100µl of CE to both strains. Optimal activity of NR occurred at 4 and 2 mM of nitrate to the LG and BR strains, respectively. The LG and BR strains showed, respectively, Michaelis-Menten constants (K_M) for NADH of 0.2068 and 0.0837 µM, and K_M for nitrate of 0.0492 and 0.0294 mM. The results indicate that the NR of BR strain has higher affinity by the substrate than the NR of LG strain of *H. musciformis*.

Experiments on the effects of nitrate availability showed that starved plants of LG strain showed positive correlations among nitrate concentrations and GR, protein contents and RE, while starved plants of BR strain showed positive correlations among nitrate concentrations and GR,

protein contents, FC, FE and LP and GP. With the addition of N:P in the seawater, positive correlation was observed among N:P concentrations and AFC, FC, Chl*a* and GP for the LG strain, and among N:P concentrations and AFC and Chl*a* for the BR strain. These results show the metabolic differences between the colour strains of *H. musciformis* on nitrogen metabolism: with addition of nitrate, VC strain storaged nitrogen mainly as protein, and MA strain as protein and pigment (FC and FE), and with addition of N:P, VC strain also storaged nitrogen as pigment (AFC, FC and Chl*a*) and MA strain as Chl*a*. Moreover, the respiration of LG strain increased with nitrate concentrations, while the photosynthesis of BR strain increases.

In both colour strains, nitrate uptake increased linearly with nitrate concentrations, while phosphate uptake showed a kinetic of saturation. Percentages of nitrate removal of both strains was very high (95%) in all treatments, and it did not show saturation. With the addition of N:P, the highest percentage of phosphorus removal was in treatment with 20:5 μM (nitrate:phosphate) to LG strain, and in 20:5 and 40:10 μM (nitrate:phosphate) to the BR strain. LG and BR strains liberated high amounts of DON for the seawater at the concentrations of 80 μM and 100 μM of nitrate, respectively. The addition of phosphate in the seawater caused high release of DON in the BR strain. The results also show that LG and BR strains of *H. musciformis* are efficient in removing nitrogen and phosphorus from seawater at concentrations up to 60 μM, when a great part of removed nitrate is released to seawater as DON.

Key words: *Hypnea*, colour strain, nitrogen metabolism

Resumo

No ambiente marinho, o nitrogênio é encontrado nas formas de amônio, nitrato e nitrito e é considerado o principal nutriente limitante para o crescimento das algas marinhas bentônicas. No Brasil, *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacquin) J.V. Lamour (Gigartinales, Rhodophyta) é a principal matéria-prima para a produção de carragenana e o conhecimento do metabolismo do nitrogênio é muito importante para o sucesso de seu cultivo, assim como a disponibilidade de fósforo, que pode limitar a produtividade das algas marinhas. O principal objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato no crescimento, na fotossíntese e nas etapas do metabolismo do nitrogênio (captação, assimilação, armazenamento interno e "turnover") nas linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *H. musciformis*.

As plantas utilizadas em todos os experimentos foram originadas das culturas unialgáceas cultivadas em temperatura de 23 ± 2°C, fotoperíodo de 14h, irradiância de 60-90 μmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, e meio composto por água do mar esterilizada (30 ups) enriquecida com a solução de von Stosch na concentração de 50% (VSES/2). Os experimentos foram realizados utilizando algas com limitação interna de nutrientes (cultivadas somente em água do mar durante 2 semanas antes do início dos experimentos) e sem limitação de nutrientes (cultivadas em meio VSES/2). As condições experimentais foram as mesmas descritas para as culturas unialgáceas, exceto pelo meio composto por água do mar com adição de nitrato (zero a 100 μM), e com adição de nitrato e fosfato (zero a 25 μM), mantendo a relação N:P de 4:1. Foram analisados a atividade da enzima nitrato redutase (NR), o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (AFC – Aloficocianina, FC – Ficocianina, FE – Ficoeritrina e Cl*a* – Clorofila *a*) e de proteínas, as taxas fotossintéticas (FB – Fotossíntese bruta e FL – Fotossíntese líquida), respiratórias (RE) e de crescimento (TC). A captação e remoção de nitrogênio e fósforo e a liberação de nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) pelas linhagens de cor (em plantas com limitação interna de nutrientes) também foram avaliadas.

Primeiramente, o ensaio *in vitro* da nitrate reductase (NR) foi otimizado para ambas as linhagens e as condições ótimas foram: 40 μM de NADH; 10 min de incubação do extrato bruto (EB) e 100μl de EB para ambas as linhagens. A atividade ótima da NR ocorreu em 4 e 2 mM de nitrato para a linhagem VC e MA, respectivamente. As linhagens VC e MA apresentaram, respectivamente, constante aparente de Michaelis-Menten (K_M) para NADH de 0,2068 e 0,0837 μM, e K_M para nitrato de 0,0492 e 0,0294 mM. Os resultados indicam que a NR da linhagem MA tem maior afinidade pelo substrato do que a NR da linhagem VC de *H. musciformis*.

Os experimentos para avaliar os efeitos da disponibilidade de nitrato mostraram que, para os espécimes com limitação interna de nutrientes, houve correlação positiva entre as concentrações de nitrato e a TC, o conteúdo de proteínas e a respiração para a linhagem VC, e correlação positiva entre as concentrações de nitrato e a TC, o conteúdo de proteínas e pigmentos (FC e FE), a FL e a FB para a linhagem MA. Com a adição de N:P no meio, também houve correlação positiva entre a concentração de nitrato e fosfato e o conteúdo de AFC, FC, Cl*a* e FB para a linhagem VC e AFC e Cl*a* para a linhagem MA. Esses resultados mostram as diferenças metabólicas entre as linhagens de cor de *H. musciformis* quanto ao metabolismo do nitrogênio: com a adição de nitrato, a linhagem VC armazenou nitrogênio principalmente na forma de proteínas e a linhagem MA na forma de proteínas e de pigmentos (FC e FE); com adição de N:P, a linhagem VC também armazenou nitrogênio na forma de pigmentos (AFC, FC e Cl*a*) e a linhagem MA na forma de Cl*a*. Além disso, a respiração da linhagem VC aumentou com o incremento de nitrato no meio enquanto que a linhagem MA apresentou aumento na fotossíntese.

Em ambas as linhagens, a captação de nitrato aumentou linearmente com o incremento nas concentrações de nitrato, enquanto que a captação de fosfato apresentou uma cinética de saturação. As porcentagens de remoção de nitrato de ambas as linhagens foram muito altas (95%) em todos os tratamentos testados, não atingindo a saturação. Com a adição de N:P na água do mar, a maior porcentagem de remoção de fosfato ocorreu no tratamento com 20:5 μM (nitrato:fosfato) para a linhagem VC, e em 20:5 e 40:10 μM (nitrato:fosfato) para a linhagem MA. As linhagens VC e MA liberaram maiores quantidades de NOD para o meio nas concentrações de 80 μM e 100 μM de nitrato, respectivamente. A adição de fosfato na água do mar ocasionou maior liberação de NOD pela linhagem MA. Estes resultados mostram que as linhagens VC e MA de *H. musciformis* são eficientes na remoção do nitrogênio e do fósforo da água do mar em concentrações de até 60 μM, uma vez que, a partir dessa concentração, grande parte do nitrato removido é liberado à água do mar como NOD.

Palavras chave: *Hypnea*, linhagens de cor, metabolismo do nitrogênio

Hypnea musciformis e variantes pigmentares

O gênero *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) inclui cerca de 50 espécies que estão distribuídas em regiões de águas quentes (Masuda *et al.* 1997). Para o Brasil, são citadas seis espécies: *H. cenomyce* J. Agardh; *H. cornuta* J. V. Lamour.; *H. musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour.; *H. nigrescens* Greville ex J. Agardh; *H. spinella* (C. Agardh) Kuetzing; e *H. valentiae* (Turner) Montagne (Schenkman 1986, Nunes 2005).

Hypnea musciformis apresenta uma ampla distribuição geográfica ao longo do litoral brasileiro e ocorre desde o litoral do Rio Grande do Sul até o litoral do Maranhão (Nunes 2005), podendo ser encontrada em regiões do infralitoral e mesolitoral, sobre rochas ou como epífita, principalmente sobre *Sargassum* spp. (Schenkman 1989, Reis *et al*. 2003). Por ocorrer na região do mesolitoral, *H. musciformis* está sujeita a variações ambientais e apresenta ampla tolerância à temperatura (18 a 30ºC) e salinidade (20 a 50 ups) (Yokoya & Oliveira 1992 a,b).

No Brasil, *Hypnea musciformis* é um importante recurso marinho por ser a maior fonte de k-carragenana (Oliveira 1998), um polissacarídeo sulfatado utilizado na indústria alimentícia, como agente espessante, estabilizante e gelificante, e na indústria farmacêutica, como agente espessante e estabilizante. Além disso, a carragenana apresenta atividades antivirais, inibindo, por exemplo, o vírus HSV e o vírus HIV (Neushul 1990). Estudos têm mostrado que *H. musciformis* produz lectinas, que são importantes substâncias utilizadas como agentes pró e anti-inflamatórios e no diagnóstico e terapia em cancerologia (Nagano *et al.* 2002).

Em 1999, o Brasil importou cerca de 1.000 toneladas de carragenana e produziu uma tonelada por mês (Furtado 1999). Em 2004, o consumo de carragenana passou para 100 toneladas por mês e a produção para 10 toneladas por mês, a partir de bancos naturais de *H. musciformis* da região nordeste do país (Furtado 2004). A preocupação com a diminuição da matéria algácea no ambiente levou a realização de estudos com populações naturais de *H. musciformis*, que

constataram que há uma ampla variação na biomassa e no teor de carragenanas ao longo do ano, algumas vezes relacionada à sazonalidade (Schenkman 1989, Faccini & Berchez 2000, Ramos *et al.* 2006). Uma vez que a produção de carragenanas a partir de populações naturais é muito variável e com a finalidade de diminuir a sua exploração, foram realizados estudos para determinar a viabilidade da maricultura de *H. musciformis* (Berchez & Oliveira 1989; Berchez *et al*. 1993).

Um aspecto importante a ser considerado é o estudo utilizando variantes pigmentares, uma vez que diferentes linhagens de uma mesma espécie podem apresentar diferenças em relação à tolerância aos fatores ambientais, à produção de biomassa e ao teor e qualidade da carragenana. Os efeitos de fatores ambientais, como temperatura, irradiância e profundidade na produção de biomassa, foram avaliados em variantes pigmentares de espécies dos gêneros *Eucheuma* e *Kappaphycus* por Gerung & Ohno (1997). Os resultados evidenciaram diferenças entre as linhagens de *Kappaphycus*, sendo que o crescimento da linhagem verde foi maior do que o da marrom na temperatura de 25ºC e na profundidade de 1 m. Entretanto, a linhagem marrom apresentou maior biomassa do que a verde na irradiância de 145 µmol fótons m^{-2} s^{-1} e na profundidade de 0 m.

A utilização de variantes pigmentares também é uma importante ferramenta para a compreensão da fisiologia e biologia das macroalgas, sendo que estudos com mutantes de cor de *Gracilaria* têm sido úteis para o conhecimento da composição e estrutura dos ficobilissomos (Kursar *et al*. 1983). No Brasil, a caracterização de variantes pigmentares em espécies de *Gracilaria* tem contemplado aspectos como composição pigmentar, crescimento, genética, freqüência em populações naturais e ultra-estrutura do cloroplasto (Plastino 2004).

Hypnea musciformis apresenta uma grande plasticidade fenotípica pigmentar, sendo que na natureza podem ser encontradas plantas de coloração roxa, vermelha e marrom, com diferentes tonalidades. No litoral do estado do Espírito Santo, foi encontrada uma variante pigmentar desta espécie, que é denominada, no presente trabalho como linhagem verde-clara. Esta linhagem verde-clara pode ter se originado por mutação espontânea ocorrida no espécime de talo marrom. A principal diferença entre as linhagens marrom e verde-clara de *Hypnea musciformis* refere-se às

concentrações de ficobiliproteínas: a linhagem verde-clara é deficiente em ficoeritrina, apresentando concentrações mais altas de ficocianina e aloficocianina quando comparada à linhagem marrom (Yokoya *et al*. 2003). As duas linhagens também apresentam diferentes comportamentos fisiológicos quanto à temperatura, salinidade e respostas aos fitorreguladores (Yokoya *et al*. 2003). Pouco se sabe sobre as características fisiológicas nutricionais dessas linhagens, e o estudo do metabolismo do nitrogênio é fundamental para caracterizar as diferenças entre as linhagens deficiente em ficoeritrina e a linhagem sem essa deficiência, uma vez que a ficoeritrina é um importante produto de reserva de nitrogênio para as rodófitas.

Metabolismo do nitrogênio nas macroalgas marinhas

O nitrogênio é considerado o principal nutriente limitante para o crescimento das algas marinhas bentônicas. Desta forma, o sucesso do cultivo de macroalgas requer o conhecimento das relações entre o nitrogênio e as algas (Hanisak 1990).

No ambiente marinho, o nitrogênio ocorre nas formas de nitrato (NO_3^-, em concentrações que variam de 0 a 40 μmol N kg^{-1}), nitrito (NO_2^-, 0 a 1 μmol N kg^{-1}), amônio (NH_4^+, 0 a 1 μmol N kg^{-1}), dinitrogênio (N_2, 1 μmol N kg^{-1}) e nitrogênio orgânico dissolvido (Tyrrel 1999). Dentre essas formas, a mais abundante é o nitrato e a única que não está disponível para as macroalgas é o dinitrogênio (Tyrrel 1999). O metabolismo do nitrogênio envolve quatro etapas: a captação do nutriente do meio, sua assimilação, seu armazenamento interno e seu "turnover" (Lobban & Harrison 1994).

A captação do nitrato é mediada por uma ATPase localizada na membrana plasmática (Figura 1.1). No citoplasma, o nitrato pode ser armazenado no vacúolo ou reduzido à nitrito por uma reação catalisada pela enzima Nitrato Redutase, que usa o NADH como doador de elétrons. O nitrito é, então, transportado para o cloroplasto, onde é reduzido a amônio pela enzima Nitrito Redutase, que usa uma ferredoxina reduzida como doadora de elétron. O amônio será incorporado ao glutamato, numa reação dependente de ATP, catalisada pela Glutamina Sintetase, formando uma

glutamina. O grupo amino da glutamina será transferido a um alfacetoglutarato, formando dois glutamatos. Esta reação é catalisada pela Glutamato Sintase. O grupo amino do glutamato será transferido a um alfacetoácido, produzindo um novo aminoácido e um novo alfacetoglutarato. Essa reação é catalisada por uma aminotransferase. Os aminoácidos, por sua vez, serão incorporados a proteínas (DeBoer 1981, Lea 1993, Lobban & Harrison 1994).

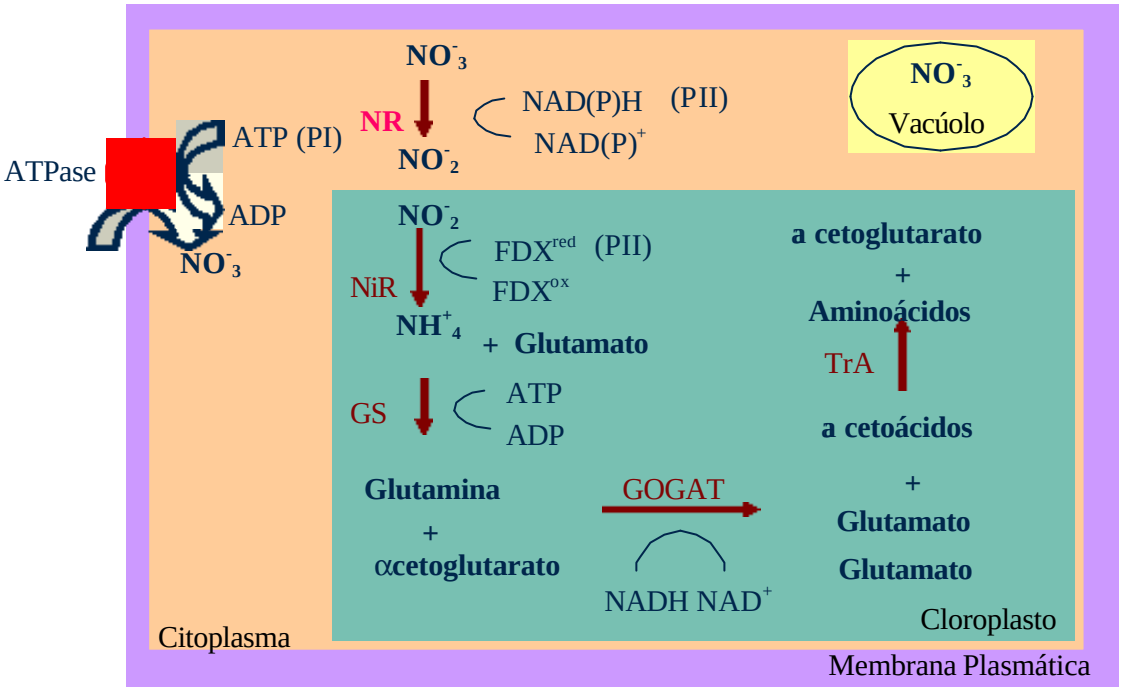

Figura 1.1. Esquema geral do metabolismo do nitrogênio, mostrando os processos bioquímicos que ocorrem nas diferentes estruturas celulares. NR = Nitrato Redutase; NiR= Nitrito redutase; GS= Glutamina Sintetase; GOGAT = Glutamato Sintase; TrA=Transaminase. (Modificado de DeBoer 1981).

Captação do nitrato

Para a maioria das macroalgas marinhas, a captação do nitrato exibe uma cinética de saturação, a qual pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten. Exemplos de algas que apresentam uma cinética de saturação são: *Scytothamnus australis* Hooker *et* Harvey (Phillips & Hurd 2004) e *Xiphophora gladiata* (Labillardière) Montagne ex Harvey (Phillips & Hurd 2004), que pertencem às Phaeophyta; *Apophlaea lyallii* Hooker *et* Harvey (Phillips & Hurd 2004), *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, Irvine *et* Farnham (Smit 2002), *G. foliifera* (Forsskål)

Børgesen (D'Elia & DeBoer 1978), *Laurencia brongniartii* J. Agardh (Nishihara *et al.* 2005), *Neoagardhiella baileyi* (Harvey ex Kützing) Wynne *et* Taylor (D'Elia & DeBoer 1978) e *Stictosiphonia arbuscula* (Harvey) King *et* Puttock (Phillips & Hurd 2004), que pertencem às Rhodophyta.

Porém, em algumas espécies, como *Chaetomorpha linum* (O. F. Müll.) Kützing (Lavery & McComb 1991), *Laminaria groenlandica* Rosenvinge (Harrison *et al.* 1986) e *Gracilaria pacifica* I.A. Abbott (Thomas *et al.* 1987) ocorre um incremento linear na taxa de captação do nitrato.

A captação do nitrato pode ser influenciada por diversos fatores ambientais, como a luz, que pode atuar na fotossíntese, fornecendo a energia necessária para o transporte ativo e os esqueletos de carbono para a incorporação dos íons, e pode estimular o crescimento e aumentar a síntese protéica. Todos esses processos causarão um aumento na captação do nitrato (DeBoer 1981). Outros fatores como temperatura, irradiância, salinidade e a presença de amônio no meio também podem influenciar a captação de nitrogênio nas macroalgas marinhas (D'Elia & DeBoer 1978; Chiang & Lin 1989; Nishihara *et al.* 2005).

Assimilação do nitrato

A assimilação do nitrato é feita através da sua redução a nitrito que, por sua vez, é reduzido a amônio. As enzimas catalisadoras destas reações são, respectivamente, a nitrato redutase (NR) e a nitrito redutase. Considera-se que a NR, por ser a primeira enzima da via de redução do nitrogênio, controla a taxa de assimilação do nitrato. São reconhecidas três formas da NR em eucariotos, das quais duas ocorrem nas algas e plantas vasculares (EC 1.6.6.1, específica para NADH e EC 1.6.6.2, que é biespecífica para NADH e NADPH) (Berges 1997).

A NR é uma enzima multimérica, sendo que cada monômero contém três grupos prostéticos, um grupo Redox-FAD, um grupo Heme e um grupo Molibdênio-molibdopterina. Esses grupos prostéticos transferem, cataliticamente, dois elétrons do NADH ao nitrato, reduzindo-o a nitrito (Taiz & Zeiger 2004).

A regulação da nitrato redutase (NR) é feita pela síntese e degradação da proteína, sendo que a síntese é induzida pela presença de nitrato e a degradação pela ausência de nitrato ou pela presença de outra forma de nitrogênio mais reduzida, como nitrito e amônio. A NR também pode ser regulada por mecanismos pós-traducionais, como pela fosforilação e desfosforilação. A enzima é fosforilada por uma proteína quinase que liga o fósforo ao sitio ativo de regulação, composto pelos aminoácidos serina, treonina e tirosina. Durante a fase escura de um ciclo luz:escuro, a NR encontra-se inativa e fosforilada (Chow 2002).

A atividade desta enzima pode ser influenciada por fatores ambientais como a disponibilidade de nitrato e de dióxido de carbono no meio circundante. Para *Laminaria saccharina* (L.) Lamouroux (Phaeophyta), a atividade da nitrato redutase foi máxima em tratamentos contendo entre 10 e 30 µM de nitrato (Wheeler & Weidner 1983). Mercado *et al.* (1999) observaram um aumento na atividade da NR de *Porphyra leucosticta* (Thuret) Le Jolis quando submetida a tratamentos com elevada concentração de carbono inorgânico.

Reserva de nitrogênio

Algumas espécies estão adaptadas à limitação de nitrogênio, pois possuem a capacidade de estocá-lo durante períodos de alta disponibilidade do nutriente (Fujita 1985). Os aminoácidos (especialmente alanina) e as proteínas parecem formar o maior "pool" de estoque de nitrogênio em *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Bird *et al.* 1982) e *G. foliifera* (Forsskal) Boergesen (Rosemberg & Ramos 1982). Nas algas, o nitrogênio também pode ser armazenado na forma de pigmentos e proteínas associadas, tais como as ficobiliproteínas nas rodófitas. Dentro das ficobiliproteínas, a ficoeritrina tem sido considerada como principal reserva de nitrogênio, uma vez que este composto é degradado na ausência desse nutriente (Bird *et al.* 1982).

Fotossíntese

A fotossíntese tem papel fundamental no metabolismo do nitrogênio, uma vez que as atividades da nitrato redutase (NR, principal enzima de assimilação do nitrato) e da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC, enzima relacionada à formação dos ácidos orgânicos, que irão incorporar o nitrogênio formando os aminoácidos) são rapidamente alteradas em respostas a sinais derivados de mudanças na fotossíntese (Figura 1.2) (MacKintosh 1998). Quando a fotossíntese está ativa, alguns sinais são transmitidos do cloroplasto para o citossol, onde a NR e a PEPC são ativadas em poucos minutos.

Na NR, as proteínas quinases (PKs) transferem o fosfato do Mg-ATP ou Mg-GTP para o sítio serina, treonina e tirosina da proteína, ocasionando mudanças na sua forma e função. As proteínas fosfatases (PPs) hidrolisam as ligações fosfo-éster e a proteína retorna a sua conformação original. Diferente da NR, que é ativada por desfosforilação, a PEPC é ativada por fosforilação (MacKintosh 1998).

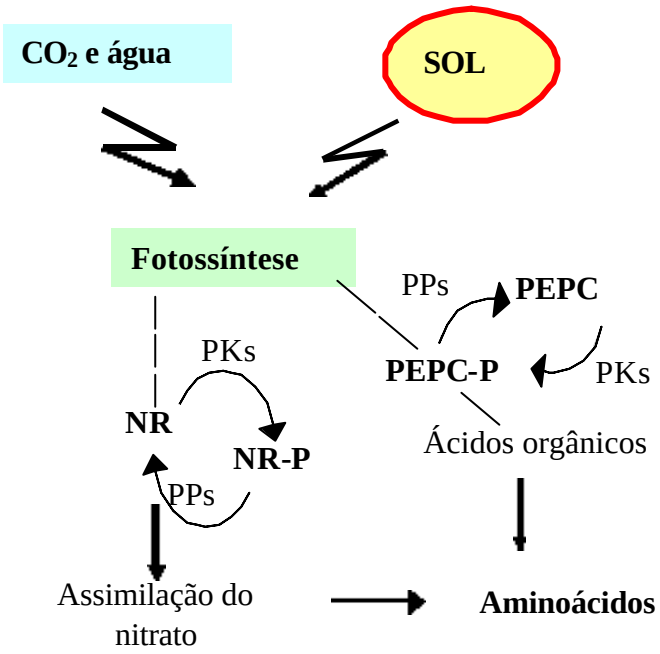

Figura 1.2. Regulação pós-traducional de enzimas presentes no citossol, em resposta a sinais derivados de mudanças na fotossíntese. A nitrato redutase (NR) é ativada por desfosforilação e a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) é ativada por fosforilação, em resposta a atividade fotossintética (Adaptado de MacKintosh 1998).

As vias metabólicas da fotossíntese e do nitrogênio estão integralmente acopladas. Tratamentos que inibem a fixação do carbono fotossintético, como redução de CO_2 e inibidores da fotossíntese, limitam a disponibilidade de esqueletos de carbono, diminuindo a assimilação de nitrogênio em aminoácidos (Turpin 1991).

Nitrogênio X Fósforo

Sob o ponto de vista biológico, o nitrogênio, e não o fósforo, controla a produtividade primária nos oceanos (Tyrrel 1999). Chopin *et al.* (1995) observaram que a disponibilidade de fósforo não teve efeito significativo na fotossíntese e no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes de *Chondrus crispus* Stackhouse. Entretanto, a determinação de combinações adequadas de N e P nos enriquecimentos da água do mar pode ser extremamente importante para a aqüicultura (Chopin & Wagey 1999). A razão N:P também é relevante, uma vez que teve efeito significativo na taxa de crescimento de *Gracilaria cornea* J. Agardh (Navarro-Angulo & Robledo 1999) e *G. conferta* (Schousboe ex Montagne) Montagne (Friedlander & Levy 1995).

Objetivos

Objetivos gerais

Os objetivos gerais do presente estudo foram: 1. contribuir para o conhecimento do metabolismo do nitrogênio em rodófitas, e 2. caracterizar as diferenças fisiológicas entre uma linhagem deficiente em ficoeritrina (verde-clara) e uma linhagem sem essa deficiência (marrom) de *Hypnea musciformis*, uma vez que a ficoeritrina é um importante produto de reserva de nitrogênio para as rodófitas.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo foram avaliar os efeitos da disponibilidade de nitrato nas quatro etapas do metabolismo do nitrogênio e em processos relacionados, como o crescimento, a fotossíntese e a respiração, em duas linhagens de *Hypnea musciformis*. Também

foram analisados os efeitos da adição de fosfato no meio, junto com o nitrato, mantendo-se a relação N:P de 4:1. Dessa forma, foram avaliados os efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato nos seguintes processos:

- Captação do nutriente do meio: avaliando-se a capacidade de remoção de nitrogênio e fosfato das linhagens de cor de *H. musciformis;*
- Assimilação do nitrogênio: avaliada pela atividade da enzima Nitrato Redutase (NR). Primeiramente, foram realizados ensaios *in vitro* para caracterizar a NR das duas linhagens de cor, e posteriormente, foram avaliados os efeitos da disponibilidade de N e P na atividade enzimática;
- Armazenamento interno de nitrogênio: foi avaliado pela quantificação do conteúdo de proteínas solúveis totais e de pigmentos (clorofila *a*, ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina);
- "Turnover": foi avaliado pela quantificação de nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) liberado para a água do mar pelas linhagens de cor de *H. musciformis*.

Também foram avaliados os efeitos do estado nutricional das algas no metabolismo do nitrogênio.

Metodologia geral de cultivo

A seguir, serão apresentados os métodos gerais de cultivo das algas utilizadas nos experimentos descritos nos capítulos posteriores. Os experimentos específicos, bem como alterações nas condições de cultivo, serão descritos no item Materiais e Métodos de cada capítulo.

Linhagens estudadas

O estudo foi realizado com as linhagens marrom (MA) e verde-clara (VC) da espécie *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Figura 1.3). Um espécime tetrasporofítico de coloração marrom com somente um ramo lateral verde foi coletado pela Dra. Noemy Yamaguishi-Tomita, em 1994, na Ponta da Baleia, Espírito Santo. As linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) originaram-se a partir do isolamento e da propagação *in vitro* do ramo verde e dos ramos

marrons, respectivamente. Exemplares das linhagens de *H. musciformis* foram depositados no herbário SP, sob os números SP365645 (VC) e SP365646 (MA).

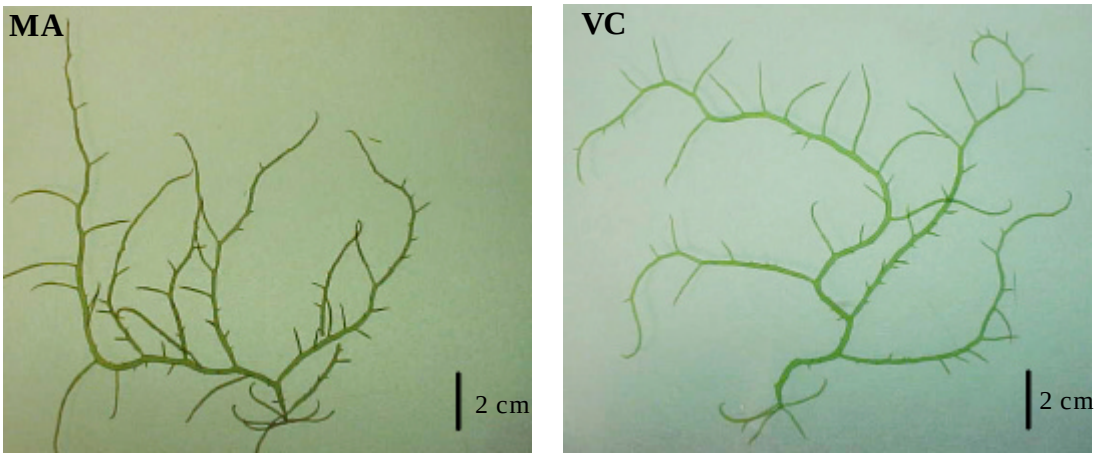

Figura 1.3. Aspecto geral das linhagens marrom (MA) e verde-clara (VC) de *Hypnea musciformis* cultivadas em laboratório.

Culturas unialgáceas em laboratório

A água do mar utilizada no cultivo das algas e em todos os experimentos realizados no presente estudo foi coletada na Base Norte do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, na Praia do Lamberto, em Ubatuba, SP. Essa água foi esterilizada por filtragem em membrana Millipore AP 20 e aquecida, por duas vezes, em banho-maria durante 1 hora, contados após o início da fervura do banho.

As culturas unialgáceas foram mantidas em meio de cultura composto por água do mar esterilizada enriquecida com a solução de von Stosch (Tabela 1.1), na concentração de 50% (referido com a abreviatura VSES/2). Essas culturas foram iniciadas a partir do isolamento de segmentos apicais das linhagens selecionadas e cultivadas em meio de cultura VSES/2 durante todo o período de estudo. A troca do meio de cultura foi feita semanalmente e foram utilizados Erlenmeyers (500 ml), contendo 350 ml de meio.

As culturas unialgáceas e os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Algas "Marilza Cordeiro Marino" da Seção de Ficologia, Instituto de Botânica, nas seguintes

condições: temperatura média de 23 ± 2 ^{o}C, fotoperíodo de 14 h, salinidade 30-32 ups, pH 8, densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, do tipo “luz do dia”, dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura.

Tabela 1.1. Composição química da solução de von Stosch preparada segundo Edwards (1970), com modificações segundo Yokoya (1996)

Componentes	**Concentração para um litro de meio**
$NaNO_3$	0,50 mM
$Na_2HPO_4.12H_2O$	30 µM
$FeSO_4.7H_2O$	1µM
$MnCl_2.4H_2O$	0,1 µM
$Na_2EDTA.2H_2O$	10 µM
Tiamina.HCl	0,59 µM *
Biotina	4,10 nM *
Cianocobalamina	1,0 nM *

* Concentração equivalente a 50% em relação à composição original proposta por Edwards (1970).

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO IN VITRO DA NITRATO REDUTASE EM VARIANTES PIGMENTARES DE *HYPNEA MUSCIFORMIS* (WULFEN IN JACQU.) J.V. LAMOUR. (GIGARTINALES, RHODOPHYTA)

Colaboradora: Dra. Fanly Fungyi Chow Ho
Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP

Abstract

[Optimization of *in vitro* assay of nitrate reductase in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)]

The enzyme nitrate reductase (NR) catalyzes the reduction of nitrate to nitrite and controls the rate of nitrate assimilation. The present study attempts to optimize the *in vitro* assay of NR to measure the NR activity in the brown (BR) and light-green (LG) strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. The strains were cultured at temperature of 23 ± 2°C, photoperiod of 14 h, irradiance of 60-90 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, and medium was composed by sterilized seawater (salinity 30 psu) enriched with von Stosch's solution at half strength (VSES/2). The algal samples (1g fresh mass per 10 ml of extraction buffer) were grinded with liquid nitrogen and extraction buffer was composed by 0.2 M phosphate buffer, pH 8, 0.5 mM EDTA, and 1 mM DTT. The following parameters were evaluated: the effect of presence and absence of bovine serum albumin (BSA) in the crude extracts (CE); different concentrations of nitrate (0 to 24 mM) and NADH (0 to 60 µM) during CE incubation; and variation of time (5, 10 and 15 min), volume (10, 50, 100, 200 e 300 µl), and temperature (5 to 35°C) of CE incubation. There were not significant differences in the NR activities of CE with or without BSA and in different temperatures. The optimal conditions of NR activity were: 40 µM of NADH; 10 min of CE incubation and 100 µl of content of CE to both strains. Optimal activities of NR occurred at 4 and 2 mM of nitrate to the LG and BR strains, respectively. The LG and BR strains showed, respectively, apparent Michaelis-Menten constants (K_M) for NADH of 0.2068 and 0.0837 µM, and for nitrate of 0.0492 and 0.0294 mM. The results indicate that the NR of BR strain has higher affinity by the substrate than the NR of LG strain of *H. musciformis*.

Resumo

A enzima nitrato redutase (NR) catalisa a redução do nitrato a nitrito e controla a taxa de assimilação do nitrato. O presente trabalho apresenta a otimização de um método para medir a atividade da NR em uma linhagem marrom (MA) e verde-clara (VC) de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. As linhagens foram cultivadas à temperatura de 23 ± 2°C, fotoperíodo de 14 h, irradiância de 60-90 µmol fótons m^{-2} s^{-1} e meio de cultura composto por água do mar esterilizada (salinidade de 30 ups) enriquecida com a solução de von Stosch a 50% (VSES/2). As algas (1g de massa fresca por 10 ml de tampão de extração) foram maceradas em nitrogênio líquido, utilizando o tampão de extração composto por 0,2 M tampão fosfato, pH 8, 0,5 mM EDTA e 1 mM DTT. Foram testados os seguintes parâmetros: o efeito da presença e ausência de albumina sérica bovina (BSA) nos extratos brutos (EB); diferentes concentrações de nitrato (0 a 24 mM) e de NADH (0 a 60 µM) na incubação; e variação do tempo (5, 10 e 15 min), volume (10, 50, 100, 200 e 300 µl), e temperatura (5 a 35°C) de incubação do EB. Não houve diferença significativa na atividade da NR nos EB com e sem BSA e nas diferentes temperaturas. A atividade da NR foi ótima nas seguintes condições: 40 µM de NADH; 10 min de incubação do EB e 100µl de EB para ambas as linhagens, e 4 e 2 mM de nitrato para as linhagens VC e MA, respectivamente. As linhagens VC e MA apresentaram, respectivamente, constante aparente de Michaelis-Menten (K_M) para NADH de 0,2068 e 0,0837 µM, e para nitrato de 0,0492 e 0,0294 mM. Os resultados indicam que a NR da linhagem MA tem maior afinidade pelo substrato do que a da linhagem VC de *H. musciformis*.

Introdução

O nitrogênio inorgânico da biosfera é convertido a nitrogênio orgânico pela fixação do nitrogênio molecular (N_2) ou pela assimilação do nitrato (NO_3^-). A fixação do N_2 ocorre em certos procariontes e em algumas plantas que possuem associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio. Entretanto, a assimilação do nitrato é o principal processo pelo qual o nitrogênio inorgânico é convertido à forma orgânica e este processo ocorre numa enorme variedade de organismos como bactérias, leveduras, fungos, algas e plantas vasculares. A regulação da assimilação do nitrato tem sido foco de muitos estudos, uma vez que a intervenção e o melhoramento da eficiência desse processo limitante do crescimento podem levar ao aumento da produtividade na agricultura (Solomonson & Barber 1990).

A primeira etapa da assimilação do nitrato é catalisada pela enzima nitrato redutase (NR), que reduz o nitrato à nitrito utilizando NAD(P)H como doador de elétrons, como mostra a reação abaixo:

$$NO_3^- + 2NAD(P)H^+ \rightarrow NO_2^- + 2NAD(P)^+ + H_2O$$

Posteriormente, o nitrito produzido é transportado ao cloroplasto, onde é reduzido ao íon amônio pela enzima nitrito redutase (NiR), que utiliza a ferredoxina como doadora de elétrons (Lea 1993).

Considera-se que a NR, por ser a primeira enzima da via de redução do nitrogênio, controla a taxa de assimilação do nitrato, constituindo um fator limitante para o crescimento, desenvolvimento e produção de proteínas (Solomonson & Barber 1990).

A NR pode ser regulada de diversas maneiras, como através da síntese e degradação da enzima, da inativação reversível, da concentração de substratos e do seqüestro intracelular da enzima. A luz, o oxigênio, o dióxido de carbono, o nitrato e outros metabólitos são fatores que podem influenciar a atividade da NR (Solomonson & Barber 1990).

Os ensaios para avaliar a atividade da NR podem ser realizados *in situ* ou *in vitro*. No primeiro caso, a enzima não é extraída, mas mantida no interior da célula, a qual é artificialmente

permeabilizada para permitir a liberação dos produtos de reação. Em geral, tal método é menos controlado e mais difícil de se reproduzir, uma vez que os substratos podem estar presentes em quantidades não saturantes (Berges 1997), subestimando dessa forma a atividade da enzima.

Para o ensaio *in vitro*, duas questões devem ser levadas em consideração: i. A extração enzimática, uma vez que pode ocorrer a perda de cofatores enzimáticos durante a extração (Vennesland & Solomonson 1972), a presença de proteases endógenas (Berges & Harrison 1995) e a inibição da atividade por compostos fenólicos (Thomas & Harrison 1988). A adição de albumina sérica bovina (BSA) no tampão de extração pode ajudar a preservar a NR, uma vez que este composto atua como substrato preferencial para as proteases endógenas e liga-se aos compostos fenólicos (Ingemarsson 1987); ii. Condições ótimas de ensaio, que são espécies-dependentes (Lobban & Harrison 1994) e requerem condições apropriadas como pH, temperatura e concentração de substrato (Berges 1997).

O ensaio *in vitro* da nitrato redutase de *Fucus gardneri* P. C. Silva foi otimizado e caracterizado (Hurd *et al.* 1995), e com base nesse ensaio otimizado, a atividade da NR de outras espécies de macroalgas marinhas foi determinada (tabela 2.1). Embora a atividade da NR tenha sido detectada em todas as espécies testadas, houve uma grande variação nos valores apresentados, o que pode estar relacionado a diferenças inter-específicas ou ao fato do protocolo utilizado não ser adequado para cada espécie.

A caracterização da atividade da NR tem sido realizada para diversas macroalgas, como para as rodófitas *Gracilaria caudata* J. Agardh (Chow *et al.* 2007), *G. chilensis* Bird, McLachlan *et* Oliveira (Chow *et al.* 2004), *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. Silva (Granbom *et al.* 2004) e *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J. Bird & E.C. Oliveira) Fredericq & Hommers (Rossa 1999).

A taxa de catálise enzimática em função da concentração do substrato pode ser determinada pela equação de Michaelis-Menten. A constante de Michaelis-Menten (K_M) é um importante parâmetro a ser considerado nos estudos enzimáticos, uma vez que mostra a afinidade da enzima pelo substrato (DeBoer 1981). Quanto menor for o K_M, maior é a afinidade da enzima pelo

substrato. Ao comparar os valores de K_M para nitrato de *Gracilaria caudata* (3,95 mM) (Chow *et al.* 2007) e *G. chilensis* (680 µM) (Chow *et al.* 2004), pode-se observar que a NR de *G. caudata* possui maior afinidade pelo substrato.

Uma vez que os métodos descritos na literatura para o ensaio *in vitro* da NR não são igualmente adequados para as diferentes espécies de macroalgas, o presente trabalho apresenta a otimização de um método, descrito por Chow *et al.* (2004), para medir a atividade da NR de duas linhagens de cor de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour., uma rodofícea com ampla distribuição geográfica ao longo do litoral brasileiro e importante economicamente por ser a maior fonte brasileira de k-carragenana.

Tabela 2.1. Comparação da atividade máxima da NR apresentada por diferentes espécies, utilizando o protocolo otimizado para *Fucus gardneri* (Hurd *et al.* 1995).

Espécies	Atividade da NR ($x\ 10^{-3}$ U g^{-1})
Fucus gardneri P. C. Silva	1,5
Macrocystis integrifolia Bory	9,61
Costaria costatum (C. Agardh) Saunders	10,7
Ulva sp.	9,3
Porphyra sp.	4,0
Corallina vancouveriensis Yendo	22,6

Materiais e métodos

Cultivo de Hypnea musciformis

As linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. utilizadas para a otimização do ensaio *in vitro* da NR foram cultivadas em VSES/2, renovado semanalmente, sob temperatura média de 23 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 h , salinidade 30-32 ups, pH 8, densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 µmol de fótons m^{-2} s^{-1}.

As linhagens estudadas foram cultivadas durante dois meses em frascos do tipo Erlenmeyer (500 ml) até atingir a massa necessária para cada um dos ensaios. Após 24h a partir da renovação do meio VSES/2, segmentos apicais de aproximadamente 2,5 cm de comprimento foram seccionados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados para os posteriores testes. No presente estudo, o horário para o congelamento das amostras utilizadas nos ensaios da NR foi padronizado e realizado às 12:00h.

Parâmetros testados

Para otimizar o método do ensaio *in vitro* da NR das duas linhagens de *H. musciformis* foram testados os seguintes parâmetros: extrato bruto (EB) com ou sem albumina sérica bovina (BSA; 0,3 % w/v); tempo (5, 10 e 15 min) e temperatura (5 a 35 °C) de incubação do extrato bruto; volume de extrato bruto incubado (10, 50, 100, 200 e 300 µl); concentração de NADH (entre 0 e 60 µM) e concentração de nitrato (0 a 24 mM).

Devido ao grande número de amostras, o que impossibilitou a realização do ensaio em um único dia, as algas foram congeladas em nitrogênio liquido e armazenadas em freezer até o momento da análise. Dessa forma, foi testado o tempo de armazenamento (1 e 7 dias) em duas temperaturas (-20 ºC e –80 ºC). A temperatura de -20 ºC foi testada em duas condições: mantendo-se as amostras cobertas com gelo seco e sem gelo seco.

Extração celular

A extração celular foi realizada através da maceração das amostras em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em um tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA; 1 mM DTT) na proporção de 1g de biomassa fresca por 10 ml de tampão. A solução foi centrifugada por 15 minutos a 12000 *g* e 4 ºC, e o sobrenadante foi retirado e mantido no gelo.

Ensaio "in vitro" da NR

Para a determinação da atividade da NR, o extrato bruto foi pré-incubado em uma mistura de reação composta por 0,2 M tampão fosfato, pH 8, KNO_3 (concentração variando de 0 a 24 mM) e 0,5 mM $MgSO_4$, por 10 minutos. A mistura foi incubada por um tempo adicional (5, 10 e 15 min)

após a adição de NADH (concentrações variando de 0 a 60 μM) para iniciar a reação. Um controle foi feito sem a adição de NADH. A reação foi interrompida adicionando 1,4 mM de $ZnSO_4$ e etanol 43% v/v. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 12000 *g* e 20ºC. A concentração de nitrito foi determinada por espectrofotometria pela absorção a 543 nm após a adição de 9,6 mM sulfanilamida e 0,7 mM n-(1-naftil) etilendiamina diidrocloreto (NED). Assim que cada parâmetro foi otimizado para cada linhagem, o mesmo foi substituído no ensaio enzimático a fim de aprimorar a eficiência do ensaio da atividade da NR.

O conteúdo de nitrito produzido foi transformado em atividade da NR por massa fresca considerando que 1 unidade da NR (U) corresponde a 1 μmol NO_2^- min^{-1} (Chapman & Harrison 1988) a temperatura de 30º. O cálculo da atividade da NR (U g^{-1}) foi realizado através da fórmula:

{[μl total de EB x (μmol NO_2 produzido/min incubação)]/μl de EB incubado}/g alga

As constantes aparentes de saturação média (K_M) para NADH e nitrato foram calculadas mediante regressão linear segundo o método descrito por Leatherbarrow (1990) e os ajustes dos gráficos foram feitos utilizando o programa ENZFITTER 1.05. Os valores de K_M foram determinados utilizando extratos brutos não dialisados e dialisados por 4 h, por meio de um kit de diálise Cellu-Sep com membranas do tipo MWCO 6.000-8000, de 28 μM de porosidade.

As análises da atividade da nitrato redutase foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Fungyi Chow Ho (Instituto de Biociências da USP, SP).

Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, e dois fatores, seguido do teste de comparação de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa SigmaStat (versão 1.0).

Resultados

EXTRATO BRUTO (EB) COM E SEM BSA: Não houve diferença significativa na atividade da NR de ambas as linhagens nos EB com e sem BSA (figura 2.1). Apesar deste resultado, optou-se adicionar BSA ao tampão de extração nos ensaios subseqüentes, uma vez que esse composto protege a proteína NR de proteases endógenas e dos compostos fenólicos.

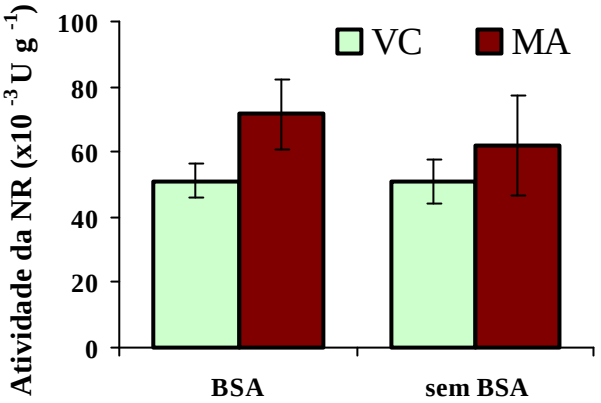

Figura 2.1. Variação da atividade da nitrato redutase (NR) em extratos brutos com e sem adição de albumina serica bovina (BSA) nas linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis.*

TEMPO DE INCUBAÇÃO: Houve um incremento linear na atividade da NR da linhagem VC com o aumento do tempo de incubação (figura 2.2 A), sendo que o aumento foi significativo de 5 para 10 min, porém de 10 para 15 min não houve diferença significativa na atividade enzimática (figura 2.2 A). A atividade da NR da linhagem MA também foi menor em 5 mim e maior em 10 e 15 min. Assim, o tempo de 10 min foi o escolhido para os demais ensaios com a NR.

VOLUME DE EB: A NR da linhagem VC apresentou maior atividade em 100 µl de EB incubado enquanto que a da MA foi em 300 µl (figura 2.2. B). Ao comparar a atividade entre ambas linhagens, a atividade da NR da linhagem MA foi significativamente maior do que a da VC apenas no volume de incubação de 300 µl de EB. Uma vez que a atividade da NR da linhagem VC foi maior em 100 µl e os resultados apresentados pela linhagem MA na incubação com 300 µl de EB não apresentaram diferenças significativas com o volume de 100 µl e apresentaram um desvio padrão muito alto, optou-se pelo volume de 100 µl para os ensaios posteriores.

TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO: A NR da linhagem VC apresentou maior atividade quando incubada nas temperaturas de 25, 30 e 35 ºC e a da linhagem MA foi maior em 30 e 35 ºC (figura 2.2 C). Ao comparar ambas as linhagens, a atividade da NR da linhagem MA foi maior do que a da linhagem VC nas temperaturas de 15, 20 e 30°C. Uma vez que a atividade da NR de ambas linhagens foi maior na temperatura de incubação de 30 °C e não houve diferença significativa com a de 35 °C, optou-se pela temperatura de 30 °C para os ensaios posteriores.

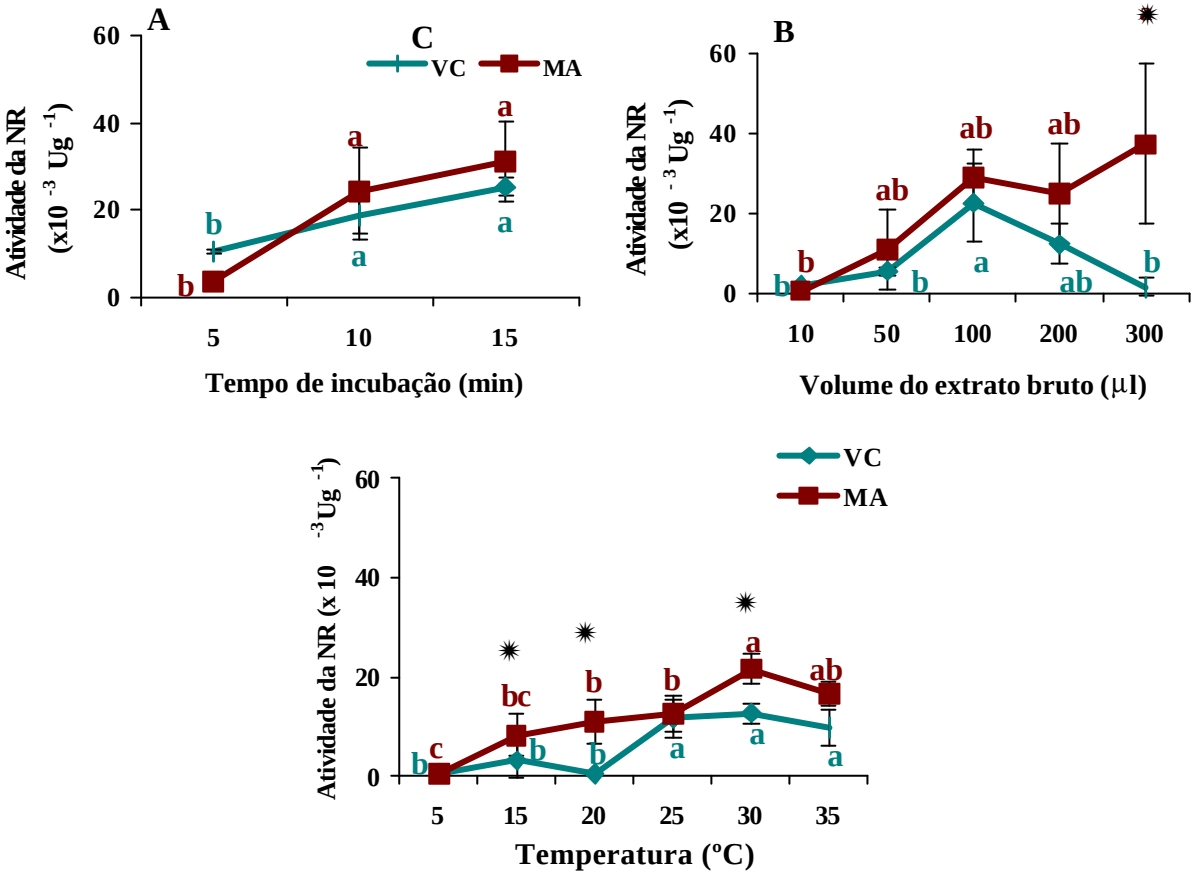

Figura 2.2. Variação da atividade da NR em extratos brutos das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* incubados em diferentes tempos (A), volumes (B) e temperaturas (C). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo a ANOVA bifatorial e o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

CONCENTRAÇÕES DE NITRATO E NADH: Ambas as linhagens apresentaram um aumento na atividade enzimática conforme o aumento da concentração do substrato (figura 2.3 B, C e D), excetuando o extrato não dialisado, incubado com diferentes concentrações de nitrato (figura 2.3 A). Considerando as curvas obtidas das amostras submetidas à diálise, as concentrações ótimas de

nitrato e NADH para o ensaio enzimático foram 2 mM de nitrato e 40 µM de NADH para a linhagem MA e 4 mM de nitrato e 40 µM de NADH para a linhagem VC (figura 2.3 B e D). As linhagens VC e MA apresentaram, respectivamente, K_M aparente para nitrato de 49,2 e 29,4 µM e para NADH de 0,2068 e 0,0837 µM, o que mostra que a NR da linhagem MA tem maior afinidade por ambos substratos do que a da linhagem VC.

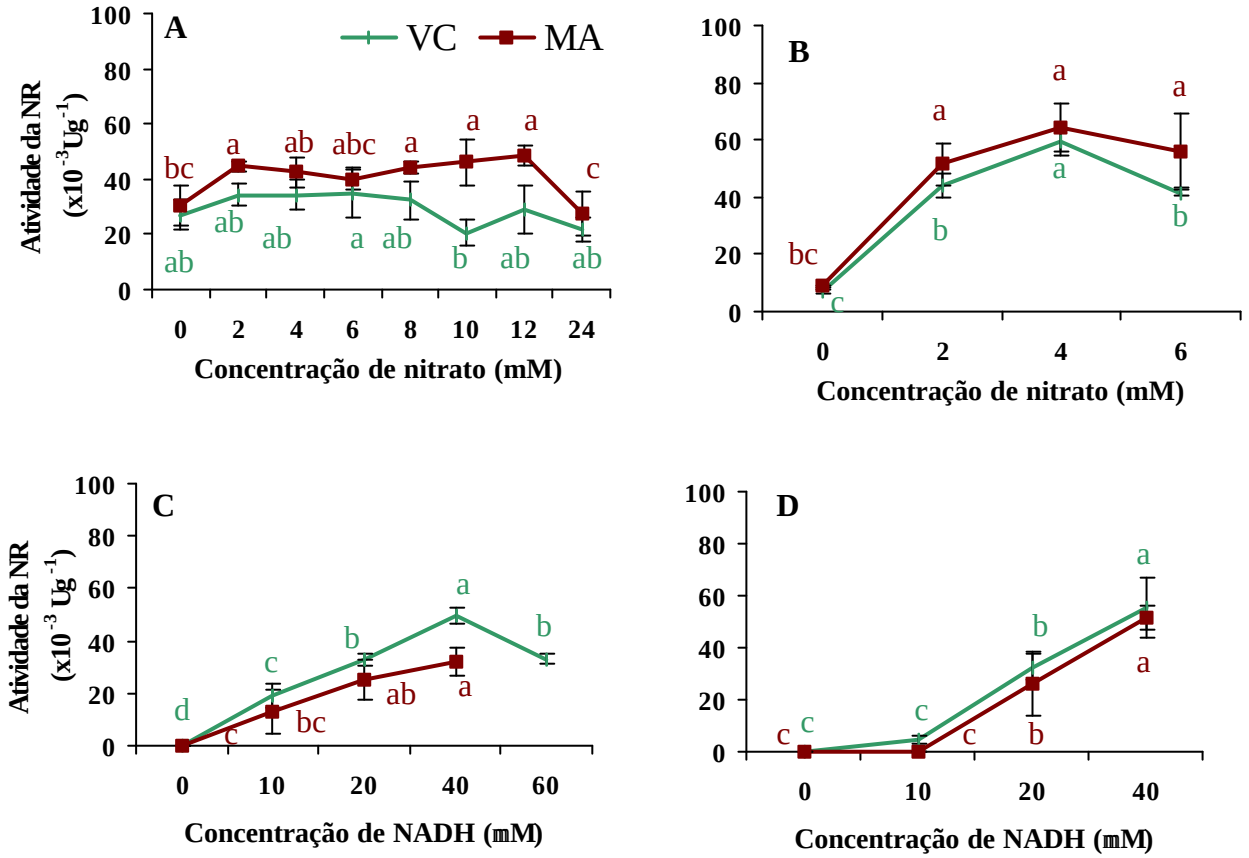

Figura 2.3. Variação da atividade da nitrato redutase (NR) em extratos brutos não submetidos à diálise (A e C) e submetidos à diálise (B e D) das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* incubados em diferentes concentrações de nitrato (A e B) e NADH (C e D). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparações múltiplas de Tukey.

TEMPERATURA E TEMPO DE ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS: A análise de variância bifatoral mostrou que, para ambas as linhagens, a temperatura de armazenamento não influenciou nos valores obtidos de atividade da NR, porém, o tempo de armazenamento de uma semana ocasionou um decréscimo significativo na atividade enzimática (Figura 2.4). Para a linhagem VC,

houve decréscimo significativo na atividade da NR apenas nas amostras congeladas a –20ºC com gelo seco (figura 2.4 A), enquanto que a atividade da NR da linhagem MA decresceu em todas as temperaturas de armazenamento testadas, após sete dias (figura 2.4 B).

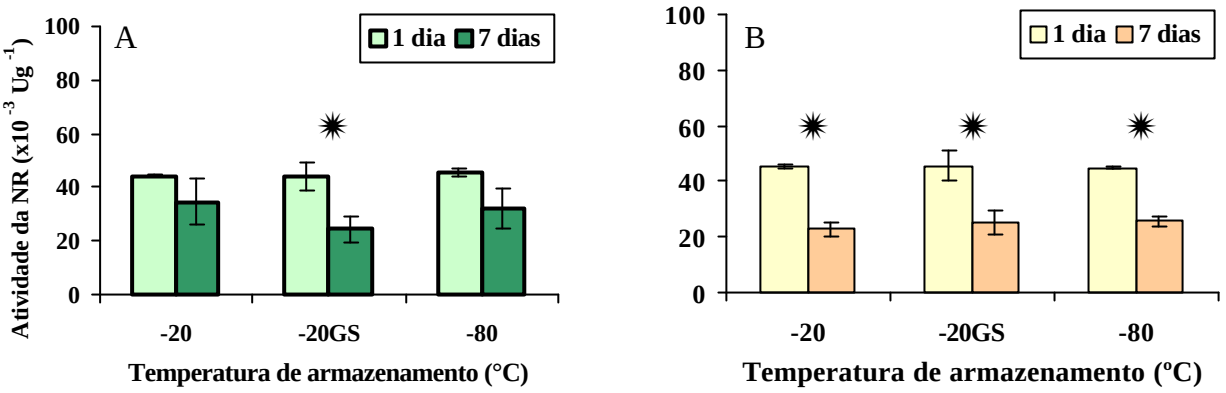

Figura 2.4. Variação da atividade da NR das amostras das linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis* estocadas em diferentes temperaturas (-20°C, -20°C + gelo seco e -80ºC) por 1 e 7 dias. ✷ indica as diferenças significativas entre o tempo de armazenamento de 1 e 7 dias, segundo a ANOVA bifatorial e o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Discussão

Os métodos para medir a atividade da NR não são igualmente eficientes para as diferentes espécies de macroalgas marinhas (Chow *et al.* 2004), uma vez que as características dessa enzima diferem entre os diferentes grupos de algas (Berges 1997) e também, devido à inibição da atividade enzimática por compostos fenólicos (Thomas & Harrison 1988) e a presença de proteases endógenas (Berges & Harrison 1995).

Por sua vez, as condições fisiológicas, característica de cada espécie, e as condições de cultivo em laboratório são ou podem ser diferentes para cada material estudado, e esses fatores podem ser determinantes ao se comparar a eficiência da enzima NR. Portanto, uma otimização específica do ensaio enzimático para *Hypnea musciformis* é fundamental e pertinente para as subseqüentes análises entre as linhagens.

Vários são os parâmetros do ensaio que podem influenciar a eficiência da atividade da NR, entre eles podem-se citar a proteção da enzima frente à atividade das proteases, enzimas que

degradam proteínas, proteção contra compostos fenólicos, tempo de incubação, volume de extrato bruto incubado, temperatura de ensaio, concentrações de substrato (ex. nitrato e NADH) e pH do tampão de ensaio. Neste trabalho, alguns dos fatores considerados mais importantes foram analisados para as linhagens VC e MA de *H. musciformis.*

A presença/ausência de BSA no tampão de extração não influenciou a atividade da NR de ambas as linhagens de *H. musciformis*, sendo o mesmo observado para *Fucus gardneri* (Hurd *et al*. 1995) e *Enteromorpha* sp. (Lartigue & Sherman 2002). Por outro lado, Rossa (1999) e Chow (2004) observaram um aumento significativo na atividade da NR de *Gracilariopsis tenuifrons* e *Gracilaria chilensis*, motivo pelo qual optou-se pela utilização de BSA nas análises subseqüentes.

Não houve diferença significativa na atividade da NR com o aumento do tempo de incubação de 10 para 15 min para as duas linhagens de *H. musciformis* estudadas. Portanto, foi utilizado o tempo de 10 min nos ensaios subseqüentes. Para *Gracilariopsis tenuifrons*, a produção de nitrito começou a diminuir a partir de 30 min de incubação e a velocidade de reação foi máxima em 5 e 10 min (Rossa 1999). Para *Gracilaria chilensis*, o tempo de incubação de 5 min foi a melhor condição de ensaio *in vitro* da NR (Chow 2002). Um menor tempo de ensaio implica em maior eficiência da enzima para reduzir o substrato disponível, o que pode significar que *G. chilensis* possui uma maior velocidade catalítica para a redução de nitrito através da enzima NR.

As atividades da NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis* foram maiores, respectivamente, em 100 e 300 µl de EB incubado. Para *F. gardneri*, a atividade da NR aumentou linearmente com o aumento do volume de EB incubado (Hurd *et al*. 1995). Embora a atividade da NR da linhagem MA tenha aumentado com o aumento do volume de EB incubado, o desvio padrão das amostras incubadas com 300 µl foi maior, motivo pelo qual adotou-se o volume de 100 µl para a realização de todos os demais ensaios enzimáticos realizados no presente estudo.

As atividades da NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis* foram maiores nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C. Para *Gracilariopsis tenuifrons* (Rossa 1999), a atividade da NR foi máxima na temperatura de 30 °C, enquanto que para *Gracilaria chilensis* e *Gracilaria tenuistipitata*

var. *liui* Zhang & Xia (Lopes *et al*. 1997) a atividade ótima ocorreu em 15 e 20 ºC, respectivamente. Uma vez que a atividade da NR da linhagem MA foi maior em 30 °C e a da linhagem VC foi maior nas temperaturas entre 25 e 35 ºC, adotou-se 30 °C para a realização de todos os demais ensaios enzimáticos realizados no presente estudo. Essa diferença na temperatura de ensaio pode estar relacionada ao local de distribuição dessas espécies, uma vez que *G. chilensis* é uma espécie de águas temperadas.

A concentração ótima de NADH para o ensaio da NR das linhagens estudadas de *H. musciformis* foi de 40 µM. Rossa (1999) observou que diferentes lotes de *Gracilariopsis tenuifrons*, que representavam fases reprodutivas e locais de distribuição diferentes, apresentaram variações quanto à concentração ótima de NADH, sendo que algas do lote 82 (gametófito masculino) e 83 (gametófito feminino), provenientes de Ubatuba, apresentaram concentrações ótimas de NADH de 0,1 e 0,15 mM, respectivamente. A concentração ótima de NADH para a atividade da NR apresentada pelas linhagens de *H. musciformis* é baixa, quando comparada às de outras algas. Para *G. tenuifrons* (Rossa 1999) e *Gracilaria tenuistipitata* (Lopes *et al*. 1997), as concentrações ótimas de NADH foram, respectivamente, 150 e 400 µM.

Há uma grande variação na constante de saturação para NADH e nitrato (Berges & Harrison 1995). O K_M aparente da NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis* para o NADH foi de 0,2068 e 0,0837 µM, respectivamente. Esses valores são baixos quando comparados aos K_M de outras algas. Para *Gracilariopsis tenuifrons* o valor do K_M aparente foi de 12,2 µM (Rossa 1999), para *Gracilaria tenuistipitata* foi de 95 µM (Lopes *et al*. 1997) e 8 µM para *G. chilensis* (Chow *et al*. 2004). Essas diferenças na concentração ótima e no valor do K_M para NADH evidenciam diferenças nos requerimentos metabólicos da NR para cada uma dessas espécies.

Para *H. musciformis*, o K_M aparente da NR para o nitrato apresentado pela linhagem VC (49,2 µM) foi maior do que o apresentado pela linhagem MA (29,4 µM) e por *Gracilariopsis tenuifrons* (31,44 µM) (Rossa 1999) e *Porphyra perforata* (35 µM) (Thomas & Harrison 1988), o que indica que a NR da linhagem VC possui menor afinidade pelo substrato. Porém, *Gracilaria*

tenuistipitata (Lopes *et al*. 1997) e *G. chilensis* (Chow *et al*. 2004) possuem K_M maiores do que o da linhagem VC, de 197,8 e 680 μM, respectivamente. Esses dados mostram as diferenças nas afinidades da NR pelos substratos, evidenciando a necessidade de estabelecer um protocolo de ensaio enzimático específico para cada espécie.

Houve um decréscimo na atividade da NR de ambas as linhagens de *Hypnea musciformis*, com o aumento do tempo (1 a 7 dias) de armazenamento das amostras, independente da temperatura de armazenamento (-20 e –80 ºC). O mesmo não foi observado por Lartigue & Sherman (2002) para *Enteromorpha* sp., onde a atividade da NR foi preservada ao longo de 25 dias quando estocada à -80°C, mas não foi preservada quando estocada à -20°C.

O presente estudo evidenciou algumas diferenças na atividade da NR das linhagens de cor de *H. musciformis*, destacando-se que a NR da linhagem MA apresenta maior afinidade pelo substrato (nitrato) do que a da VC, mas, por outro lado, a NR da linhagem VC apresentou maior estabilidade em relação ao tempo de congelamento das amostras do que a da linhagem MA.

A atividade da NR apresentada pelas linhagens MA e VC de *H. musciformis* no ensaio otimizado (com BSA; 10 min de incubação; 100 μl de EB incubado; 4 mM de nitrato; e 40 μM de NADH) foi de 40,08 e 35,05 $x10^{-3}$ U g^{-1}, respectivamente. Esses resultados são semelhantes ou maiores do que os valores de atividade da NR apresentados por outras espécies de macroalgas, em diferentes ensaios otimizados da NR *in vitro*. Por exemplo, a atividade da NR de *Ulva* sp., *Costaria costatum*, *Porphyra* sp. (Hurd *et al.* 1995) e *Gracilaria tenuistipitata* (Lopes *et al*. 1997) foi, respectivamente, 9,3; 10,7; 4,0 e 43,3 $x10^{-3}$ U g^{-1}. Dentro das condições experimentais adotadas no presente estudo, os resultados obtidos indicam que foram estabelecidas as condições ótimas para o ensaio *in vitro* da NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis*.

Referências Bibliográficas

Berges, J.A. 1997. Algal nitrate reductases. European Journal of Phycology 32: 3-8.

Lea, P.J. 1993. Nitrogen Metabolism. *In:* P.J. Lea & R.C. Leegood (eds.). Plant biochemistry and molecular biology. John Wiley & Sons Ltd, pp.155-180.

Berges, J.A. & Harrison, P.J. 1995. Nitrate activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. Limnology and Oceanography 40: 82–93.

Chapman, D.J. & Harrison, P.J. 1988. Nitrogen metabolism and measurement of nitrate reductase activity. *In:* C.S. Lobban, D.J. Chapman & B. Kremer (eds.). Experimental Phycology. A laboratory manual. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 196-202.

Chow, F. 2002. Atividade *in vitro* e regulação da enzima nitrato redutase na alga vermelha *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 136 p.

Chow, F., Oliveira, M.C. & Pedersen, M. 2004. *In vitro* assay and light regulation of nitrate reductase in the red alga *Gracilaria chilensis*. Journal of Plant Physiology 161: 769–776.

Chow, F., **Capociama, F.V., Faria, R. & Oliveira, M.C.** 2007. Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). Revista Brasileira de Botânica 30: 123-129.

Deboer, J.A. 1981. Nutrients. *In:* C.S. Lobban & M.J. Wynne (eds.). The Biology of Seaweeds. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 91-356.

Granbom, M., Chow, F., Lopes, P.L., Oliveira, M.C., Colepicolo, P., Paula, E.J. & Pedersén, M. 2004. Characterization of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). Aquatic Botany 78: 295-305.

Hurd, C.L., Berges, J.A., Osborne, J. & Harrison, P.J. 1995. An *in vitro* nitrate reductase assay for marine macroalgae: Optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta). Journal of Phycology 31: 835–4.

Ingemarsson, B. 1987. Nitrogen utilization in *Lemna*. I. Relations between net nitrate flux, nitrate reduction, and *in vitro* activity and stability of nitrate reductase. Plant Physiology 85: 856-859.

Lartigue, J. & Sherman, T.D. 2002. Field assays for measuring nitrate reductase activity in *Enteromorpha* sp. (Chlorophyceae), *Ulva* sp. (Chlorophyceae), and *Gelidium* sp. (Rhodophyceae). Journal of Phycology 38: 971–82.

Leatherbarrow, R.J. 1990. Use of nonlinear-regression to analyse enzyme kinetic data – application to situations of substrate contamination and background subtraction. Analytical Biochemistry 184: 274-278.

Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 366p.

Lopes, P.F, Oliveira, M.C. & Colepicolo, P. 1997 Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). Journal of Phycology 33: 225–31.

Rossa, M.M. 1999. A luz como fator de regulação da atividade enzimática da nitrato redutase (NR) e superóxido dismutase (SOD) em *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 110 p.

Solomonson, L. P. & Barber, M. J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41: 225-253.

Thomas, T.E. & Harrison, P.J. 1988. A comparison of *in vitro* and *in vivo* nitrate reductase assays in three intertidal seaweeds. Botanica Marina 31: 101–7.

Vennesland, B. & Solomonson, L. P. 1972. Nitrate reductase of *Chlorella* species or strain differences. Plant Physiology 49: 1029-1032.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA DISPONIBILIDADE DO NITRATO E DO FÓSFORO NA ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO, NO CRESCIMENTO E NA FOTOSSÍNTESE NAS VARIANTES PIGMENTARES DE *HYPNEA MUSCIFORMIS* (WULFEN IN JACQU.) J.V. LAMOUR. (GIGARTINALES, RHODOPHYTA)

Colaboradores:

Profa. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho
Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP

Prof. Dr. Orlando Necchi Júnior
IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, SP

Abstract

[Effects of nitrate and phosphate availabilities on nitrogen assimilation, growth and photosynthesis in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)]

In marine environment, nitrogen is available in the forms of ammonium, nitrate and nitrite, and is considered the main limiting nutrient for the growth of seaweeds. Considering that the knowledge of the relationship between nitrogen and seaweeds is important to the success of their cultivation, and phosphorus also can limit the productivity of some seaweeds, the main objective of the present study was to evaluate the effects of the availabilities of nitrate and phosphate on growth, nitrogen assimilation and storage and photosynthesis in the light-green (LG) and brown (BR) strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. Both colour strains were cultured at temperature of 23 ± 2°C, photoperiod of 14h, irradiance of 60-90 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}, and medium was composed by sterilized seawater (salinity 30 psu) enriched with von Stosch's solution at half strength (VSES/2). The experiments were carried out with plants with nutrient starvation (cultured in seawater without nutrients for two weeks) and without starvation (cultured in VSES/2). Experimental conditions were the same as described for unialgal cultures, except for the medium, which was composed by seawater enriched with nitrate in concentrations ranging from zero to 100 μM or with nitrate and phosphate (zero to 25 μM), with a N:P relation of 4:1. The activity of nitrate reductase (NR), contents of proteins, and photosynthetic pigments (AFC- allophycocyanin, FC-

phycocyanin, FE- phycoerythrin and Cl*a*- chlorophyll *a*), the photosynthetic rates (GP- gross photosynthesis and NP- net photosynthesis), respiration (RE), and growth rate (GR) were analyzed. Starved plants of LG strain showed positive correlations among nitrate concentrations and GR, protein contents and RE, while starved plants of BR strain showed positive correlations among nitrate concentrations and GR, protein contents, FC, FE and LP and GP. With the addition of N:P in the seawater, positive correlation was observed among N:P concentrations and AFC, FC, Cl*a* and GP for the LG strain, and among N:P concentrations and AFC and Cl*a* for the BR strain. These results show the metabolic differences between the colour strains of *H. musciformis* on nitrogen metabolism: with addition of nitrate, VC strain storaged nitrogen mainly as protein, and MA strain as protein and pigment (FC and FE), and with addition of N:P, VC strain also storaged nitrogen as pigment (AFC, FC and Cl*a*) and MA strain as Cl*a*. Moreover, the respiration of LG strain increased with nitrate concentrations, while the photosynthesis of BR strain increases. Both colour strains without nutrient starvation presented higher values of GR, activity of the NR and protein content than starved plants, indicating that starved plants cultured at enriched seawater with nitrate and phosphate for only one month did not restore their nitrogen pools, as well as physiological processes.

Resumo

No ambiente marinho, o nitrogênio é encontrado nas formas de amônio, nitrato e nitrito e é considerado o principal nutriente limitante para o crescimento das algas marinhas bentônicas. Considerando que o conhecimento das relações entre o nitrogênio e as algas é de extrema importância para o sucesso de seu cultivo, e que o fósforo também pode limitar a produtividade de algumas algas, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da disponibilidade do nitrato e do fosfato no crescimento, na assimilação e armazenamento do nitrogênio e na fotossíntese das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. As linhagens estudadas foram cultivadas em temperatura de 23 ± 2°C, fotoperíodo de 14h, irradiância de 60-90 µmol fótons.m^{-2}.s^{-1}, e meio composto por água do mar esterilizada (30 ups) enriquecida com a solução de von Stosch na concentração de 50% (VSES/2). Os experimentos foram realizados utilizando algas com limitação interna de nutrientes (cultivadas somente em água do mar durante 2 semanas antes do início dos experimentos) e sem limitação de nutrientes (cultivadas em meio VSES/2). As condições experimentais foram as mesmas descritas para as culturas unialgáceas, exceto pelo meio composto por água do mar com adição de nitrato (zero a 100 µM) e com adição de nitrato e fosfato (zero a 25 µM), mantendo a relação N:P de 4:1. Foram analisados a atividade da enzima nitrato redutase (NR), o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (AFC – Aloficocianina, FC – Ficocianina, FE – Ficoeritrina e Cl*a* – Clorofila *a*) e de proteínas, as

taxas fotossintéticas (FB- Fotossíntese bruta e FL – Fotossíntese líquida), respiratórias (RE) e de crescimento (TC). Nos experimentos utilizando algas com limitação interna de nutrientes, observou-se correlação positiva entre as concentrações de nitrato e a TC, o conteúdo de proteínas e a respiração na linhagem VC, e correlação positiva entre as concentrações de nitrato e a TC, o conteúdo de proteínas e pigmentos (FC e FE), a FL e a FB da linhagem MA. Com a adição de N:P no meio, também houve correlação positiva entre a concentração de nitrato e fosfato e o conteúdo de AFC, FC, Cl*a* e FB para a linhagem VC e AFC e Cl*a* para a linhagem MA. Esses resultados mostram as diferenças metabólicas entre as linhagens de cor de *H. musciformis* quanto ao metabolismo de assimilação do nitrogênio: com a adição de nitrato, a linhagem VC armazenou nitrogênio principalmente na forma de proteínas e a linhagem MA na forma de proteínas e de pigmentos (FC e FE); com adição de N:P, a linhagem VC também armazenou nitrogênio na forma de pigmentos (AFC, FC e Cl*a*) e a linhagem MA na forma de Cl*a*. Além disso, a respiração da linhagem VC aumentou com o incremento de nitrato no meio enquanto que a linhagem MA apresentou aumento na fotossíntese.Os espécimes sem limitação interna de nitrogênio apresentaram maiores valores de TC e de conteúdo de proteínas do que os espécimes com limitação interna de nitrogênio, indicando que as linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* cultivadas por duas semanas em água do mar sem adição de nutrientes não conseguem restabelecer seu estoque interno de nitrogênio e os seus processos fisiológicos, mesmo após serem cultivadas por um mês em meio enriquecido com nitrato.

Introdução

Nitrogênio

No ambiente marinho, o nitrogênio é encontrado nas formas de amônio, nitrato e nitrito, sendo considerado o principal nutriente limitante para o crescimento das algas marinhas bentônicas (Lobban & Harrison 1994). Na ausência desse nutriente, muitas algas apresentam formação de pêlos celulares (DeBoer & Whoriskey 1983, O'Connor & West 1991) e decréscimo no crescimento (Hwang *et al.* 1987, Collén *et al.* 2004), no conteúdo de proteínas solúveis e ficobiliproteínas (Collén *et al.* 2004), nas concentrações de nitrato, nitrito e aminoácidos presentes nos tecidos (Hwang *et al.* 1987), na fotossíntese e na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono (Collén *et al.* 2004) e na atividade da enzima nitrato redutase (NR), envolvida no metabolismo de assimilação de nitrogênio (Wheeler & Weidner 1983).

O nitrato é a fonte de nitrogênio mais abundante no ambiente marinho (Tyrrel 1999) e, ao ser captado pela célula, é reduzido à nitrito, pela ação da enzima NR, e este à amônia, pela ação da enzima nitrito redutase, que é incorporada às moléculas orgânicas. O conhecimento das relações entre esse nutriente e as algas é de extrema importância para o sucesso do cultivo desses organismos (Hanisak 1990).

Davison & Stewart (1984) observaram que a taxa de crescimento de esporófitos jovens de *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. variou conforme uma hipérbole com o aumento da disponibilidade de nitrato no meio. Entretanto, a atividade potencial *in vivo* da NR (obtida sob condições ótimas de ensaio enzimático) desses esporófitos manteve-se constante com a variação das concentrações de nitrato testadas. Já a atividade potencial da NR de regiões velhas de talos de plantas maduras respondeu a concentração externa de nitrato, sendo maior nas plantas cultivadas em altas concentrações desse nutriente. O mesmo foi observado para *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. (Wheeler & Weidner 1983). Costa (2005), ao estudar os efeitos da concentração do nitrato em linhagens selvagens e variantes de cor de *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, observou menores teores de pigmentos fotossintéticos em espécimes cultivados sem adição de nitrato.

Fósforo

O fósforo está disponível no mar principalmente na forma de íons fosfato. Na água do mar com pH 8,0 (20°C), 87% de fosfato ocorre como HPO_4^{2-}, 12% como PO_4^{3-}, e 1% como $H_2PO_4^-$. A concentração de ortofosfato na água do mar é geralmente de 1-3 μM, embora ocorram variações em águas costeiras (DeBoer 1981).

Quando o fosfato inorgânico é transportado através da membrana plasmática, ele é incorporado a compostos fosforilados ou estocado nos vacúolos ou em vesículas de polifosfato. Parte da quantidade de fosfato citoplasmático pode escapar da célula e reaparecer como fosfato externo. Algas deficientes em fósforo possuem a habilidade de incorporar rapidamente o fosfato, em quantidades que excedem a necessidade da célula (Lobban & Harrison 1994). O excesso de fósforo é incorporado à polifosfatos pela ação da enzima polifosfato quinase.

O fósforo participa na formação de muitas biomoléculas, como ácidos nucléicos, proteínas e fosfolipídeos. Entretanto, o seu papel mais importante está na transferência de energia através do ATP e outros compostos de alta energia presentes na fotossíntese e respiração (Lobban & Harrison 1994).

O enriquecimento com fósforo pode estimular o crescimento e a taxa fotossintética de algumas algas (Lapointe 1986), bem como aumentar a produção de carragenana, um polissacarídeo de parede encontrado em algumas algas vermelhas (Chopin & Wagey 1999). Porém, o enriquecimento com altas concentrações de fosfato ocasionou uma redução de 50% na sobrevivência de plântulas de *Fucus vesiculosus* L. (Bergstrom *et al*. 2003).

A adição de nutrientes na água decorrente da ação antropogênica resulta em uma proporção nitrogênio: fósforo (N:P) elevada nas águas costeiras (Conley 2000), uma vez que os processos utilizados em estações de tratamento de água removem preferencialmente o fósforo. Estudos têm demonstrado a importância da razão N:P no desenvolvimento das macroalgas marinhas. Essa razão teve efeito significativo na taxa de crescimento de *Gracilaria cornea* J. Agardh, sendo que a maior

taxa de crescimento ocorreu nas proporções de N:P de 10:1 e 10:5, e a menor na razão de 10:0 (Navarro-Angulo & Robledo 1999).

Considerando a importância da utilização de variantes pigmentares como ferramenta para a compreensão da fisiologia e biologia das macroalgas, bem como a importância do conhecimento das relações dessas algas com o nitrogênio e o fósforo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da disponibilidade do nitrato e do fosfato na atividade da enzima NR, no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e de proteínas, e nas taxas fotossintéticas e de crescimento em duas linhagens de cor de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour., uma rodofícea com ampla distribuição geográfica ao longo o litoral brasileiro e importante economicamente por ser a maior fonte brasileira de kappa-carragenana.

Materiais e métodos

Cultivo de Hypnea musciformis

As linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. utilizadas nos experimentos descritos abaixo foram cultivadas em meio VSES/2, sob temperatura média de 23 ± 2 ^{o}C, fotoperíodo de 14h, salinidade 30-32 ups, pH 8, densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}.

Testes preliminares para a extração de pigmentos

Para padronizar o método de extração pigmentar foram testados os seguintes parâmetros: proporção biomassa fresca (50, 75 e 100 mg) por tampão de extração (1ml) e maceração das amostras no claro e no escuro.

A extração de pigmentos foi realizada através da maceração das amostras em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em 1 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4°C. A solução foi centrifugada por 20 minutos a 36000 *g* e 4 ºC, e o sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi retirado e mantido no escuro em tubos de ensaios vedados, até a leitura em espectrofotômetro. O sedimento foi ressuspendido em 750 ml de acetona 90%, até a obtenção de

um homogeneizado. A solução foi centrifugada a 12000g e 4°C, durante 15 minutos e o sobrenadante, contendo a clorofila *a*, foi transferido para tubos de ensaio, vedados e mantidos no escuro até a leitura em espectrofotômetro, para a posterior determinação do conteúdo de pigmentos.

As concentrações das ficobiliproteínas foram determinadas segundo Kursar *et al*. (1983) e a concentração de clorofila *a* segundo Jeffrey & Humphrey (1975).

Experimentos com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, utilizando algas com e sem limitação interna de nutrientes

COM LIMITAÇÃO DE NUTRIENTES: Foi realizado um pré-tratamento onde as algas foram cultivadas em água do mar esterilizada sem adição de nutrientes durante duas semanas que antecederam o início dos experimentos.

SEM LIMITAÇÃO DE NUTRIENTES: As algas utilizadas nesses experimentos foram cultivadas em água do mar esterilizada enriquecida com VSES/2 durante todo o período anterior ao início do experimento.

NITRATO: Esse experimento foi realizado utilizando água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato ($NaNO_3$, zero, 20, 40, 60, 80 e 100 μM). O experimento teve duração de 28 dias e foram analisadas as seguintes variáveis: taxa de crescimento, atividade da NR e conteúdo de proteínas solúveis totais, nos espécimes com e sem limitação interna de nitrogênio, e conteúdo de pigmentos, fotossíntese e respiração, apenas nos espécimes com limitação interna de nitrogênio. Ao final do experimento, as amostras foram armazenadas à -20°C para posterior análise, por, no máximo, três dias.

Para as extrações (NR, pigmentos e proteínas), a última troca de meio foi realizada 24h antes do congelamento, cujo horário foi padronizado e realizado às 12:00h. Para o experimento de fotossíntese, a última troca de meio foi realizada no 28° dia e a incubação das algas para análise da evolução do oxigênio foi realizada no 30º dia.

NITRATO E FOSFATO: Esse experimento foi realizado com água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato ($NaNO_3$, zero, 20, 40, 60, 80 e100 μM) e fosfato ($Na_2HPO_4.12H_2O$, zero, 5, 10, 15, 20, 25 μM), mantendo a proporção 4:1 de nitrogênio:fósforo (N:P). O experimento teve duração de 28 dias e foram analisadas as seguintes variáveis: taxa de crescimento, atividade da NR e conteúdo de proteínas solúveis totais, nos espécimes com e sem limitação interna de nitrogênio, e conteúdo de pigmentos, fotossíntese e respiração, apenas nos espécimes com limitação interna de nitrogênio. Ao final do experimento, as amostras foram armazenadas à -20°C para posterior análise, por, no máximo, três dias.

Os procedimentos para as extrações (NR, pigmentos e proteínas) foram os mesmos descritos para o experimento com nitrato.

No experimento com algas sem limitação interna de nitrogênio, as algas foram cultivadas por mais 83 dias para obtenção da biomassa necessária para a análise da atividade da NR e conteúdo de proteínas solúveis totais. A taxa de crescimento das duas linhagens foi determinada em todas as concentrações de nitrato. Porém, as demais análises foram prejudicadas e a atividade da NR foi determinada somente para a linhagem VC, nas concentrações de zero a 60 μM de nitrato, uma vez que as demais amostras armazenadas a -80^{o}C foram perdidas devido à quebra do "deep-freezer".

ÁGUA DO MAR UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS: A água do mar utilizada nesses experimentos foi proveniente de um único lote para uma padronização. As amostras de água do mar foram analisadas no Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços do Mar (IO-USP). As análises de nitrato, nitrito, amônio e fosfato foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Strickland & Parsons (1972) e Grasshoff *et al.* (1983) em colaboração com a Profa. Dra. Elisabete de Santis Braga.

A tabela 3.1 apresenta as concentrações de nitrato, nitrito, amônio, fosfato e nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) na água do mar utilizada nos experimentos, antes da adição de

nutrientes. O conteúdo de nitrato e fosfato também foi analisado em todos os tratamentos testados (tabela 3.2 A e B).

Tabela 3.1. Concentração inicial de nutrientes na água do mar utilizada nos experimentos. Os valores correspondem a média (n=3) ± desvio padrão.

	Nitrato	Nitrito	Amônio	Fosfato	NOD
Concentração (M)	5,40 ± 0,1	0,30 ± 0,0	1,23 ± 0,1	0,53 ± 0,0	2,91 ± 0,4

Tabela 3.2. Concentração inicial de nitrato e fosfato na água do mar, em todos os tratamentos testados. Os valores correspondem à média (n=3) ± desvio padrão. **A**. Tratamentos com adição de apenas nitrato. **B.** Tratamentos com adição de nitrato e fosfato.

A	**Tratamentos testados (adição de nitrato)**					
	zero	20 M	40 M	60 M	80 M	100 M
Concentração de nitrato (M)	5,40 ± 0,07	24,20 ± 0,22	43,87 ± 0,02	62,51 ± 1,23	84,62 ± 0,68	101,42 ± 0,70
Concentração de fosfato (M)	0,53 ± 0,03	0,56 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,74 ± 0,04	0,59 ± 0,11	0,80 ± 0,05
Relação N:P	10,12	44,09	63,33	84,75	143,96	127,17

B	**Tratamentos testados (adição de nitrato:fosfato)**					
	zero	20:5 M	40:10 M	60:15 M	80:20 M	100:25 M
Concentração de nitrato (M)	5,40 ± 0,07	25.40 ± 0,92	44.81 ± 0,49	61,72 ± 0,35	84,69 ± 0,06	102,02 ± 0,30
Concentração de fosfato (M)	0,53 ± 0,03	5,32 ± 0,31	10,31 ± 0,22	14,37 ± 0,57	18,85 ± 0,22	22,37 ± 2,26
Relação N:P	10,12	4.77	4.35	4.30	4.49	4.56

Variáveis analisadas

- Taxa de crescimento:

O crescimento foi avaliado semanalmente por meio de medidas da massa fresca. As taxas de crescimento foram calculadas utilizando-se a fórmula:

TC = (l_n Massa final – l_n Massa inicial)/(Tempo final – Tempo inicial).

- Atividade da nitrato redutase *in vitro:*

As linhagens estudadas foram incubadas por 24 h no meio correspondente a cada tratamento, congeladas ao meio dia em nitrogênio líquido e armazenadas à –20ºC para as posteriores extrações.

A extração celular e o ensaio da atividade da NR foram realizados segundo o método otimizado para *H. musciformis* descrito no Capítulo 2.

Extração celular

A extração celular foi realizada através da maceração das amostras em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em um tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA; 1mM DTT e BSA 0,3% w/v) na proporção de 1g de biomassa fresca por 10 ml de tampão. A solução foi centrifugada por 15 minutos a 12000 *g* e 4 ºC, e o sobrenadante foi retirado e mantido no gelo até o ensaio.

Ensaio *"in vitro"* da NR

Para a determinação da atividade da NR, o extrato bruto (100 µl) foi pré-incubado em uma mistura de reação composta por 0,2 M tampão fosfato, pH 8, 4 mM KNO_3 e 0,5 mM $MgSO_4$, por 10 minutos. A mistura foi incubada por um tempo adicional de 10 min após a adição de 40 µM NADH para iniciar a reação. Um controle foi feito sem a adição de NADH. A reação foi interrompida adicionando 1,4 mM de $ZnSO_4$ e etanol 43% v/v. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 12000 *g* e 20ºC. A concentração de nitrito foi determinada por espectrofotometria pela absorção a 543 nm após a adição de 9,6 mM sulfanilamida e 0,7 mM n-(1-naftil) etilendiamina diidrocloreto (NED).

O conteúdo de nitrito produzido foi transformado em atividade da NR por massa fresca considerando que 1 unidade da NR (U) corresponde a 1 µmol de NO_2^- produzido por minuto (Chapman & Harrison 1988), sob uma temperatura de ensaio de 30ºC. O cálculo da atividade da NR (Ug^{-1}) foi realizado através da fórmula:

{[µl total de EB x (µmol NO_2 produzido/min incubação)]/µl EB incubado}/g alga

As análises da atividade da nitrato redutase foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Fungyi Chow Ho (Instituto de Biociências da USP, SP).

- Pigmentos e proteína solúvel total:

As linhagens estudadas foram incubadas por 24 h no meio correspondente a cada tratamento, congeladas ao meio dia em nitrogênio líquido e armazenadas à –20ºC para as posteriores extrações.

A extração e quantificação de pigmentos foram realizadas conforme descrito no item 'Testes preliminares para a extração de pigmentos'.

A biomassa utilizada foi de 75 mg de alga fresca para 1 ml de tampão fosfato.

No teste preliminar para a extração de pigmentos, a extração da clorofila *a* foi feita com 750 µl de acetona a 90%. Porém, como os valores das absorbâncias obtidas nesse teste foram muito altos, optou-se em utilizar 1 ml de acetona nas análises posteriores.

Para a determinação da proteína solúvel total, utilizou-se uma alíquota do extrato bruto obtido no ensaio da NR, que foi separada antes da adição de BSA. O conteúdo de proteína solúvel total foi determinado por espectrofotometria a 595 nm após a adição da solução de Coomassie Blue (Bio-Rad), segundo o método de Bradford (1976).

- Taxa fotossintética:

As taxas de fotossíntese bruta, líquida e respiração foram determinadas pela evolução de oxigênio, utilizando-se a técnica de frascos claros e escuros (Littler & Arnold 1985; Thomas 1988). As concentrações de oxigênio inicial e final foram determinadas com um medidor de oxigênio (modelo 5000, Yellow Springs, Ohio, USA) equipado com uma sonda agitadora. As plantas (100-

110 mg massa fresca) foram incubadas em frascos de vidro de borosilicato (98,5% de transparência), e os frascos do escuro foram cobertos com plástico preto.

As incubações foram realizadas em temperatura constante de 23 ^{o}C, agitação orbital de 100 ± 5 rpm por 60 minutos. Antes das incubações, o meio de cultura foi aquecido ou areado para diminuir ou aumentar a concentração de oxigênio nos frascos claros e escuros, respectivamente.

As taxas fotossintéticas e respiratórias foram calculadas com a massa seca dos espécimes.

As análises de fotossíntese foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Orlando Necchi Júnior (IBILCE, UNESP, campus de São José do Rio Preto).

Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados com três repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, e dois fatores, seguido do teste de comparação de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%.. Foi feita correlação de Pearson para as variáveis analisadas nos experimentos. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa SigmaStat (versão 1.0).

Resultados

Testes preliminares para a extração pigmentar

Foram realizadas extrações pigmentares com o objetivo de estabelecer a melhor proporção biomassa algácea/tampão de extração a ser utilizada nos experimentos. Foram utilizadas diferentes biomassas (50, 75 e 100 mg) das linhagens estudadas para 1 ml de tampão fosfato para a extração das ficobiliproteínas e 750 ml de acetona para a extração da Cl*a*. Essas extrações foram realizadas no escuro, segundo as recomendações do protocolo original. Após estabelecida a biomassa, foram realizadas extrações no claro e no escuro, utilizando apenas a linhagem VC, para verificar se ocorre degradação pigmentar durante a extração realizada no claro.

A linhagem VC apresentou menor conteúdo de ficobiliproteínas na biomassa de 50 mg, enquanto que o maior conteúdo desses pigmentos ocorreu nas biomassas de 75 e 100 mg (figura 3.1). O conteúdo de aloficocianina (AFC), ficocianina (FC) e ficoeritrina (FE) não foi significativamente diferente entre as biomassas de 75 e 100 mg testadas. Não houve diferença significativa no conteúdo de Cl*a* nas diferentes biomassas testadas.

Para a linhagem MA, não houve diferença significativa no conteúdo de ficobiliproteínas nas diferentes biomassas utilizadas (figura 3.1). Porém, o conteúdo de Cl*a* foi maior quando utilizada a biomassa de 50 mg.

Apesar de não ter havido diferença significativa no conteúdo de AFC, FC e FE nas biomassas de 75 e 100 mg na linhagem VC, optou-se em utilizar 75 mg de biomassa algácea nos experimentos subseqüentes, pois o desvio padrão das amostras foi menor nesse tratamento. Para a linhagem MA, também foi escolhida a biomassa de 75 mg, uma vez que não houve diferenças significativas entre as biomassas testadas e a fim de padronizar a mesma biomassa experimental para ambas linhagens.

Uma vez que foi escolhida a biomassa de 75 mg, segundo os resultados para ficobiliproteínas, e o conteúdo de Cl*a* da linhagem MA foi maior na biomassa de 50 mg, optou-se em aumentar a quantidade de acetona utilizada na extração de 750 para 1000 µl.

Não houve diferença significativa no conteúdo de pigmentos da linhagem VC extraídos no claro e escuro (figura 3.2). Uma vez que as amostras extraídas no escuro apresentaram maior desvio padrão do que as amostras extraídas no claro, optou-se em realizar as extrações pigmentares subseqüentes no claro.

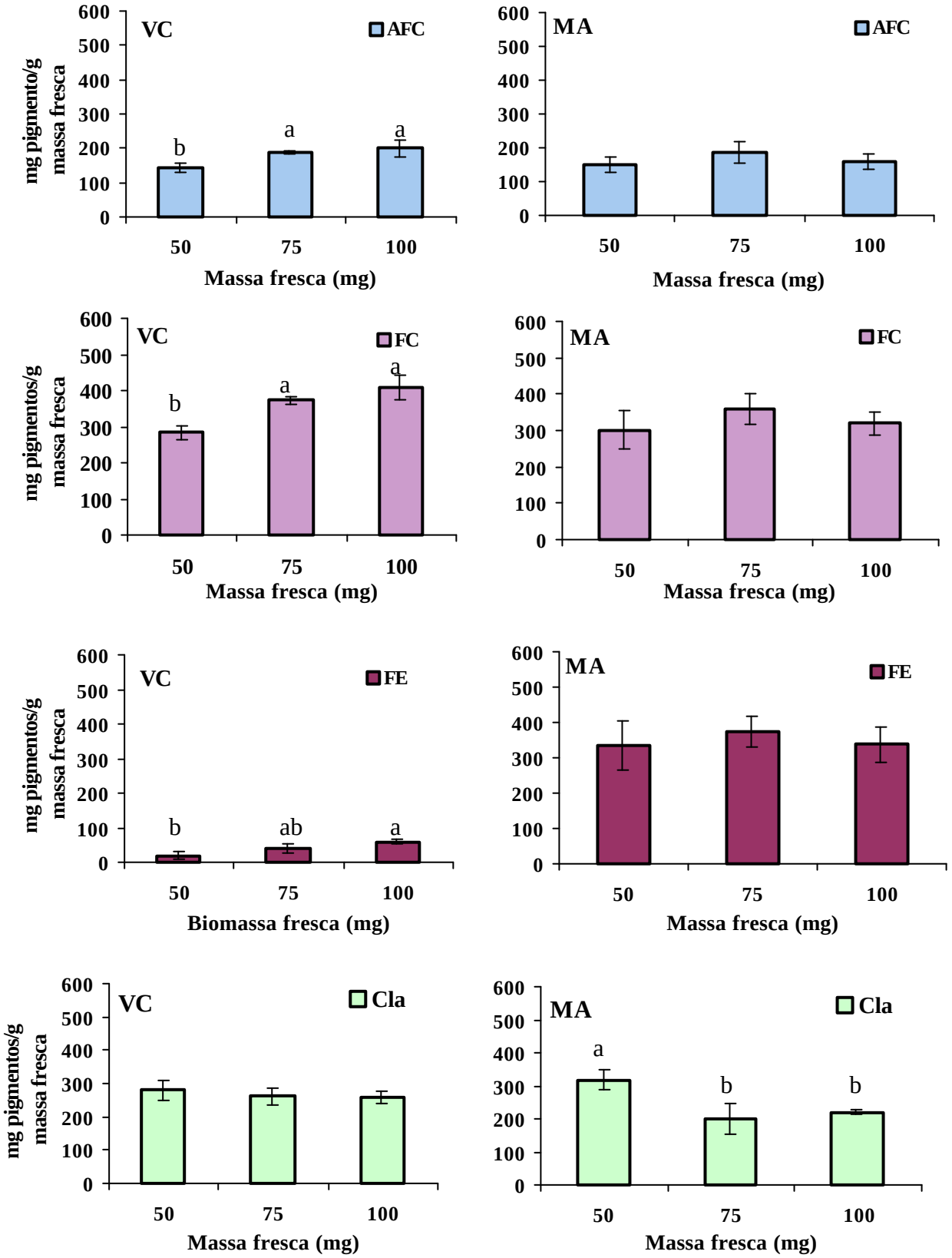

Figura 3.1. Variação no conteúdo de ficobiliproteínas (AFC – Aloficocianina; FC – Ficocianina; FE – Ficoeritrina) e clorofila *a* (Cl*a*) das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* em diferentes valores de biomassa (50, 75 e 100 mg). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey.

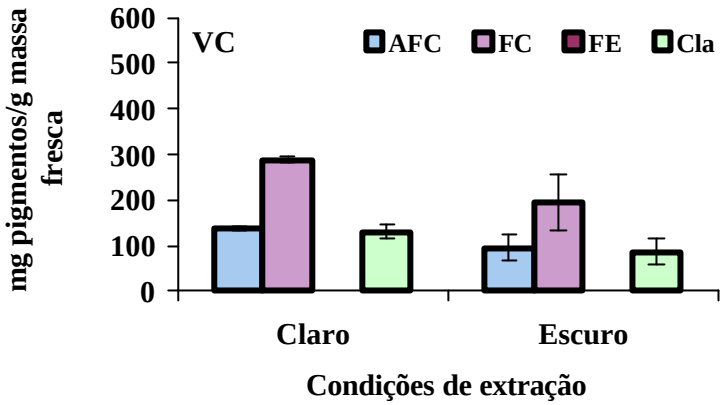

Figura 3.2. Variação no conteúdo de ficobiliproteínas (AFC – Aloficocianina; FC – Ficocianina; FE – Ficoeritrina) e clorofila *a* (Cl*a*) da linhagem verde-clara (VC) de *Hypnea musciformis* nas extrações realizadas no claro e no escuro.

Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em algas com limitação interna de nutrientes

Adição de nitrato

A taxa de crescimento da linhagem VC foi maior nos tratamentos com 20, 60, 80 e 100 µM de nitrato e a da linhagem MA nos tratamentos com 20, 80 e 100 µM de nitrato. A linhagem VC apresentou menor TC nos tratamentos controle e com 40 µM de nitrato e a linhagem MA nos tratamentos controle, 40 e 60 µM de nitrato (figura 3.3 A). A linhagem MA apresentou maior TC do que a VC no tratamento com 20 µM de nitrato.

A linhagem VC apresentou maior atividade da NR no tratamento controle e menor nos tratamentos com 20 a 100 µM de nitrato (figura 3.3 B). Para a linhagem MA, a atividade da NR foi menor no tratamento com 20 µM de nitrato e não variou entre os demais tratamentos (figura 3.3 B). A atividade da NR da linhagem MA foi maior do que a da VC no tratamento com 60 µM de nitrato.

A linhagem VC apresentou FE apenas no tratamento controle, e com a adição de nitrato no meio, o conteúdo desse pigmento foi nulo. O conteúdo de AFC e FC foi maior nos tratamentos com 20, 40, 60 e 80 µM de nitrato, exceto o tratamento de 80 µM para a AFC. O conteúdo de Cl*a* foi maior nos tratamentos variando do controle a 80 µM de nitrato (figura 3.4).

A linhagem MA, apresentou menor e maior conteúdo de ficobiliproteínas nos tratamentos controle e com adição de nitrato (20 a 100 µM), respectivamente (figura 3.4). Não houve diferença significativa no conteúdo de Cl*a*, nos diferentes tratamentos testados.

Ao se comparar ambas linhagens, a linhagem VC apresentou maior conteúdo de AFC do que a linhagem MA nos tratamentos controle e com 20 µM de nitrato, de FC nos tratamentos controle e com 20 e 60 µM de nitrato e de Cl*a* no tratamento com 20 µM de nitrato (figura 3.4). A linhagem MA apresentou maior conteúdo de FE do que a linhagem VC em todos os tratamentos testados.

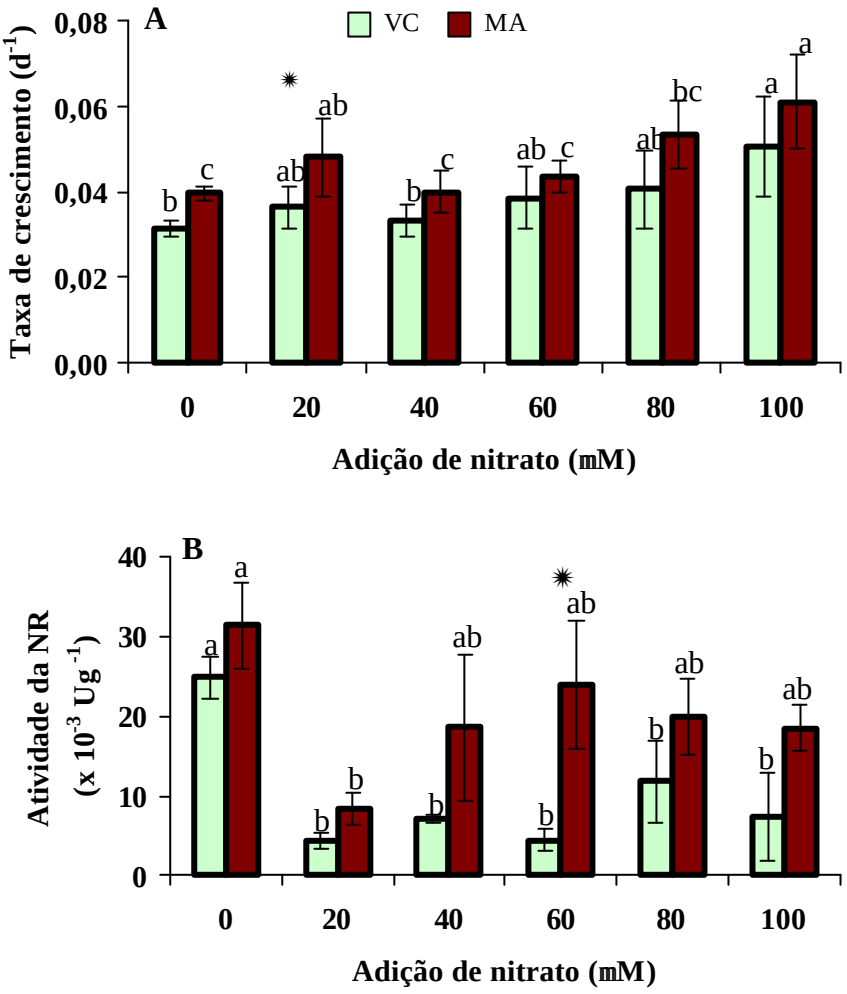

Figura 3.3. Variação da taxa de crescimento (A) e da atividade da NR (B) das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

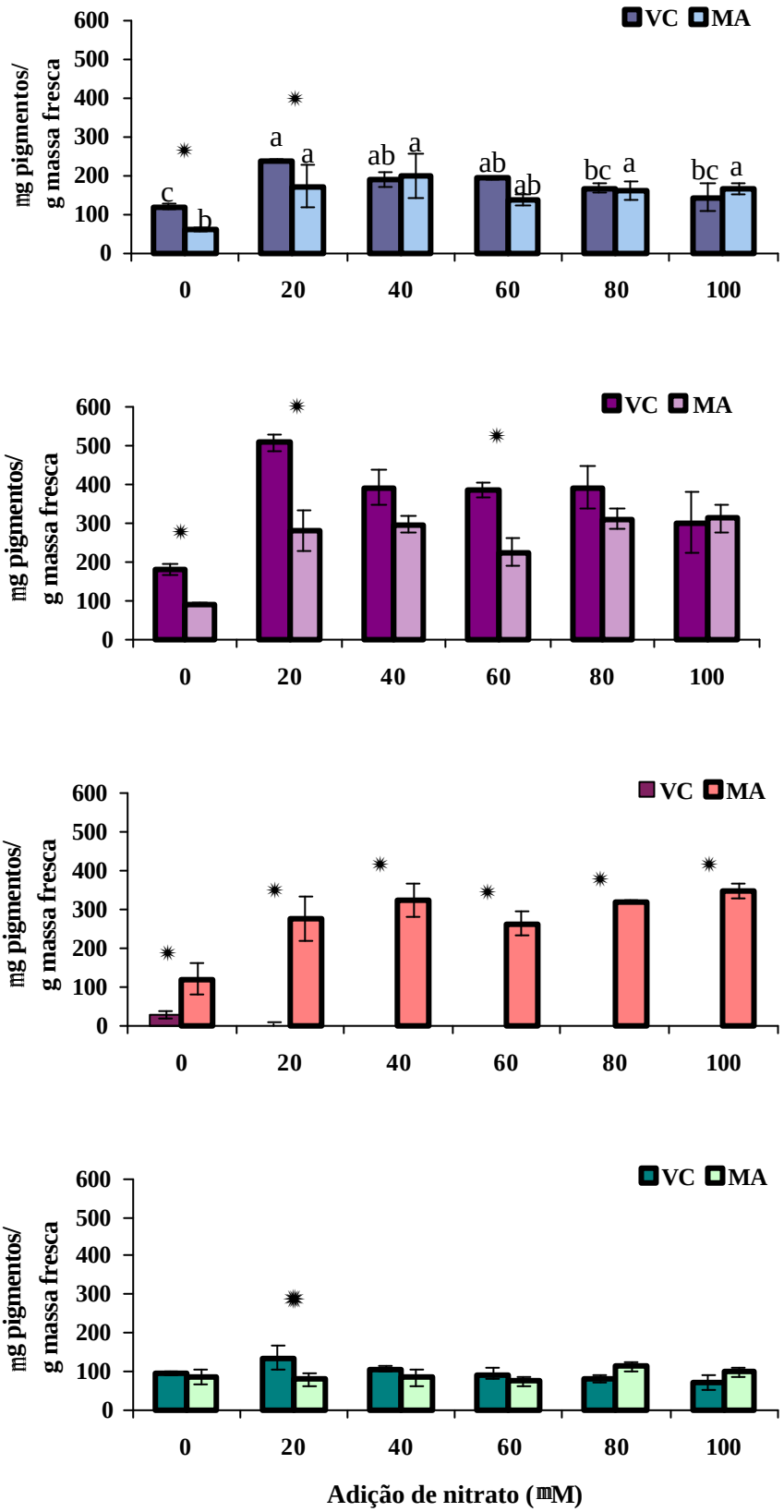

Figura 3.4. Variação no conteúdo de ficobiliproteínas (AFC – Aloficocianina; FC – Ficocianina; FE – Ficoeritrina) e clorofila *a* (Cl*a*) das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Ambas as linhagens estudadas apresentaram menor conteúdo de proteínas solúveis totais no tratamento controle e maior nos tratamentos variando de 20 a 100 µM de nitrato (figura 3.5). Ao se comparar ambas linhagens, a linhagem MA apresentou maior conteúdo de proteínas solúveis totais do que a linhagem VC no tratamento com 80 µM de nitrato.

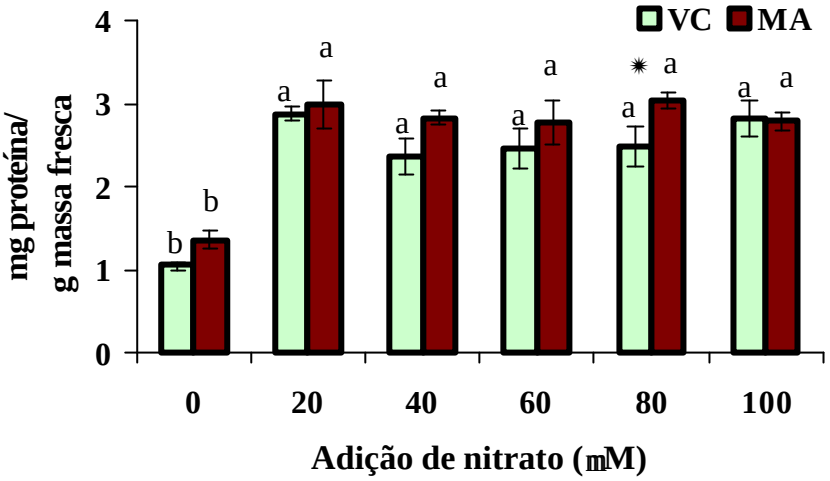

Figura 3.5. Variação no conteúdo de proteínas solúveis totais das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

A concentração ótima de nitrato para a fotossíntese bruta (FB) e líquida (FL) da linhagem VC foi de 20 µM de nitrato, sendo que a partir desse tratamento a fotossíntese começou a diminuir e a FL apresentou o menor valor em 100 µM de nitrato. Já a FB da linhagem MA foi menor no controle e maior em 20, 60 e 100 µM de nitrato (figura 3.6). A respiração (RE) da linhagem VC no tratamento controle foi de 1,64 mgO_2 g MS^{-1} h^{-1}; nos tratamentos de 20 a 60 µM de nitrato, a taxa respiratória diminuiu e, a partir de 80 µM de nitrato, aumentou, atingindo o maior valor (3,41 mg O_2 g MS^{-1} h^{-1}) em 100 µM de nitrato (figura 3.6). Já a respiração da linhagem MA foi maior em 60 µM de nitrato e menor em 100 µM (figura 3.6).

A linhagem MA apresentou maior FB, FL e RE do que a linhagem VC nos tratamentos com, respectivamente, 60 e 100 μM de nitrato; controle, 60 e 100 μM de nitrato; e 60 μM de nitrato. A linhagem VC apresentou maior RE do que a marrom no tratamento com 100 μM de nitrato.

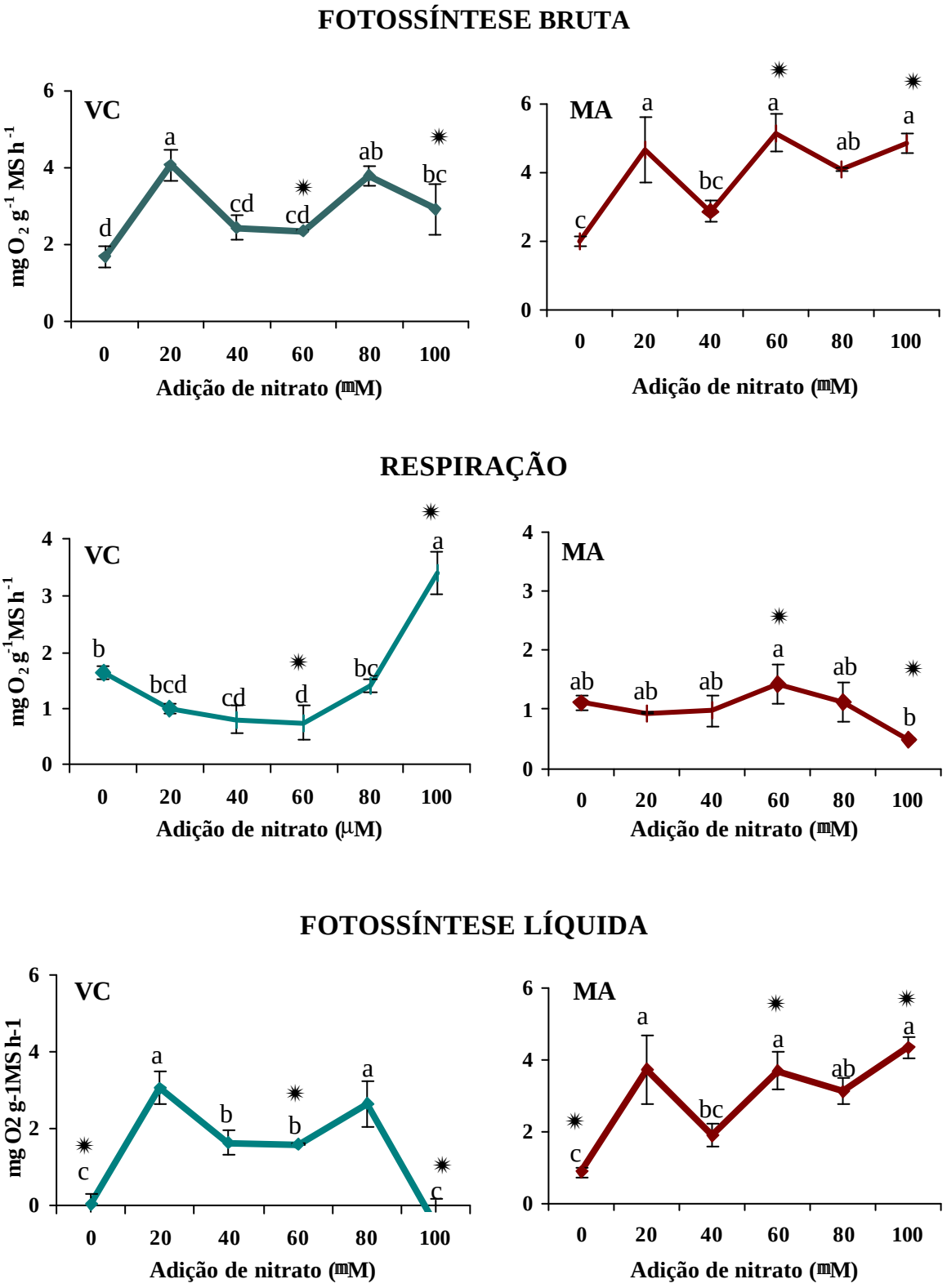

Figura 3.6. Variação da fotossíntese bruta, da respiração e da fotossíntese líquida das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Para a linhagem VC, houve correlação positiva significativa entre a concentração de nitrato e TC, proteína e RE (tabela 3.3 A). Para a linhagem MA, houve correlação positiva significativa entre a concentração de nitrato e TC, proteína, FC, FE, FL e FB (tabela 3.3 B).

Houve correlação negativa entre concentração de nitrato e FE e Cl*a* para a linhagem VC (tabela 3.3 A).

Tabela 3.3. Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com as linhagens verde-clara (A) e marrom (B) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. **Negrito**, correlação significativa.

A

Variáveis	TC	NR	Proteína	AFC	FC	FE	Cl*a*	FL	RE	FB
[Nitrato]	**0,694**	-0,431	**0,602**	-0,101	0,115	**-0,629**	**-0,557**	-0,303	**0,525**	-0,181
	0,001	0,073	**0,008**	0,691	0,649	**0,005**	**0,016**	0,222	**0,025**	0,473

B

Variáveis	TC	NR	Proteína	AFC	FC	FE	Cl*a*	FL	RE	FB
[Nitrato]	**0,506**	0,140	**0,589**	0,401	**0,666**	**0,733**	0,441	**0,7392**	-0,300	**0,669**
	0,032	0,579	**0,010**	0,099	**0,002**	**< 0,001**	0,066	**< 0,001**	0,227	**0,002**

Adição de nitrato e fosfato

A taxa de crescimento (TC) das linhagens MA e VC foi menor no controle, sendo que não houve diferença significativa entre os tratamentos com adição de nitrato e fosfato (figura 3.7 A) e não houve diferença significativa entre as linhagens.

Não houve diferença significativa na atividade da NR da linhagem VC nos diferentes tratamentos testados (figura 3.7 B). Entretanto, a atividade da NR da linhagem MA foi maior nos tratamentos controle e com 100:25 μM de nitrato:fosfato e menor nos demais tratamentos (figura 3.7 B). Não houve diferença significativa entre as linhagens.

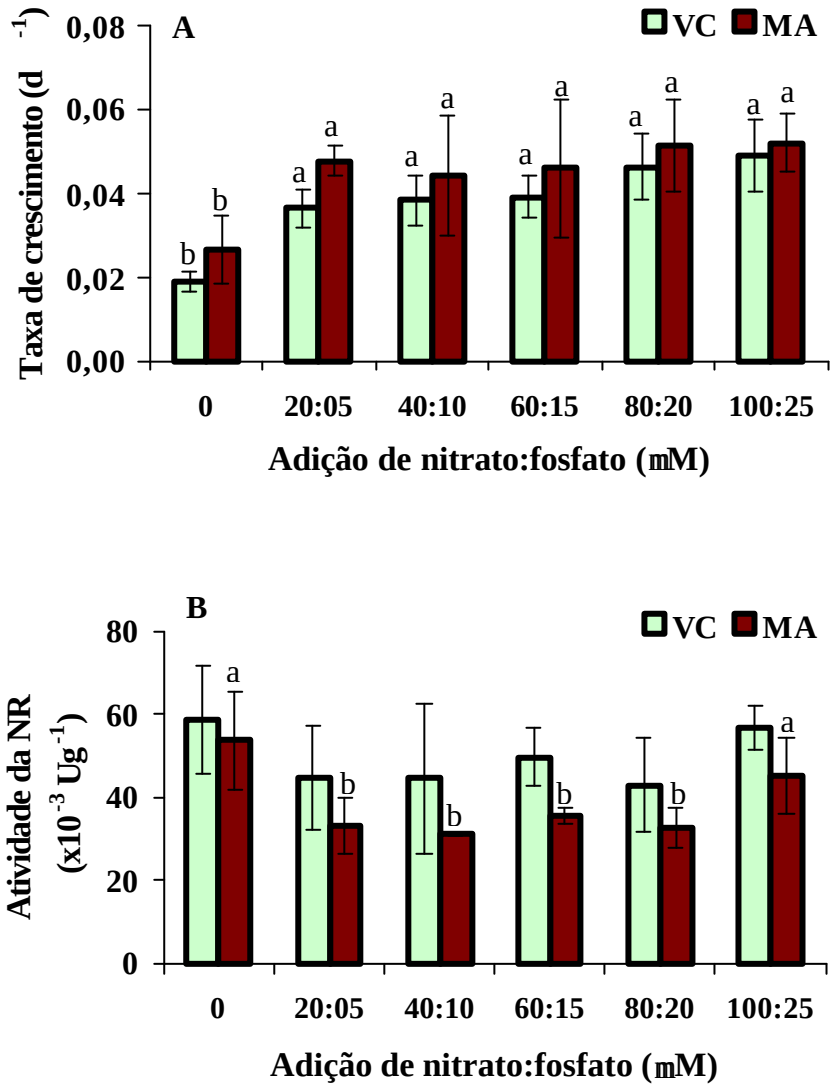

Figura 3.7. Variação da taxa de crescimento (A) da atividade da NR (B) das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 4:1. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey.

O conteúdo de proteínas solúveis totais de ambas as linhagens foi menor no controle e maior nos tratamentos com adição de nitrato e fosfato (figura 3.8). Não houve diferença significativa entre as linhagens.

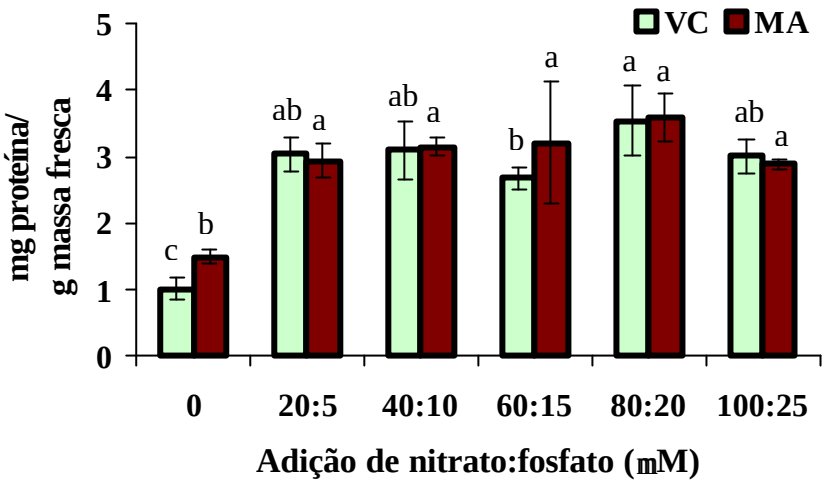

Figura 3.8. Variação no conteúdo de proteínas solúveis totais das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 4:1. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey.

O conteúdo de AFC e FC da linhagem VC foi maior nos tratamentos com 20:5, 80:20 e 100:25 µM de nitrato:fosfato e menor nos tratamentos controle e com 60:15 µM de nitrato:fosfato (Figura 3.9). Já a linhagem MA, apresentou menor conteúdo de AFC e FC no controle e maior nos demais tratamentos, não havendo diferença significativa entre os tratamentos com adição de nitrato e fosfato (Figura 3.9). A linhagem VC apresentou mais AFC e FC do que a MA nos tratamentos controle e com 20:5 e 80:20 µM de nitrato:fosfato.

A linhagem VC apresentou FE apenas no tratamento controle enquanto que para a linhagem MA, o conteúdo de FE foi menor nos tratamentos controle e em 20:5 µM de nitrato:fosfato e maior nos demais tratamentos (figura 3.9). A linhagem MA apresentou mais FE do que a VC em todos os tratamentos testados.

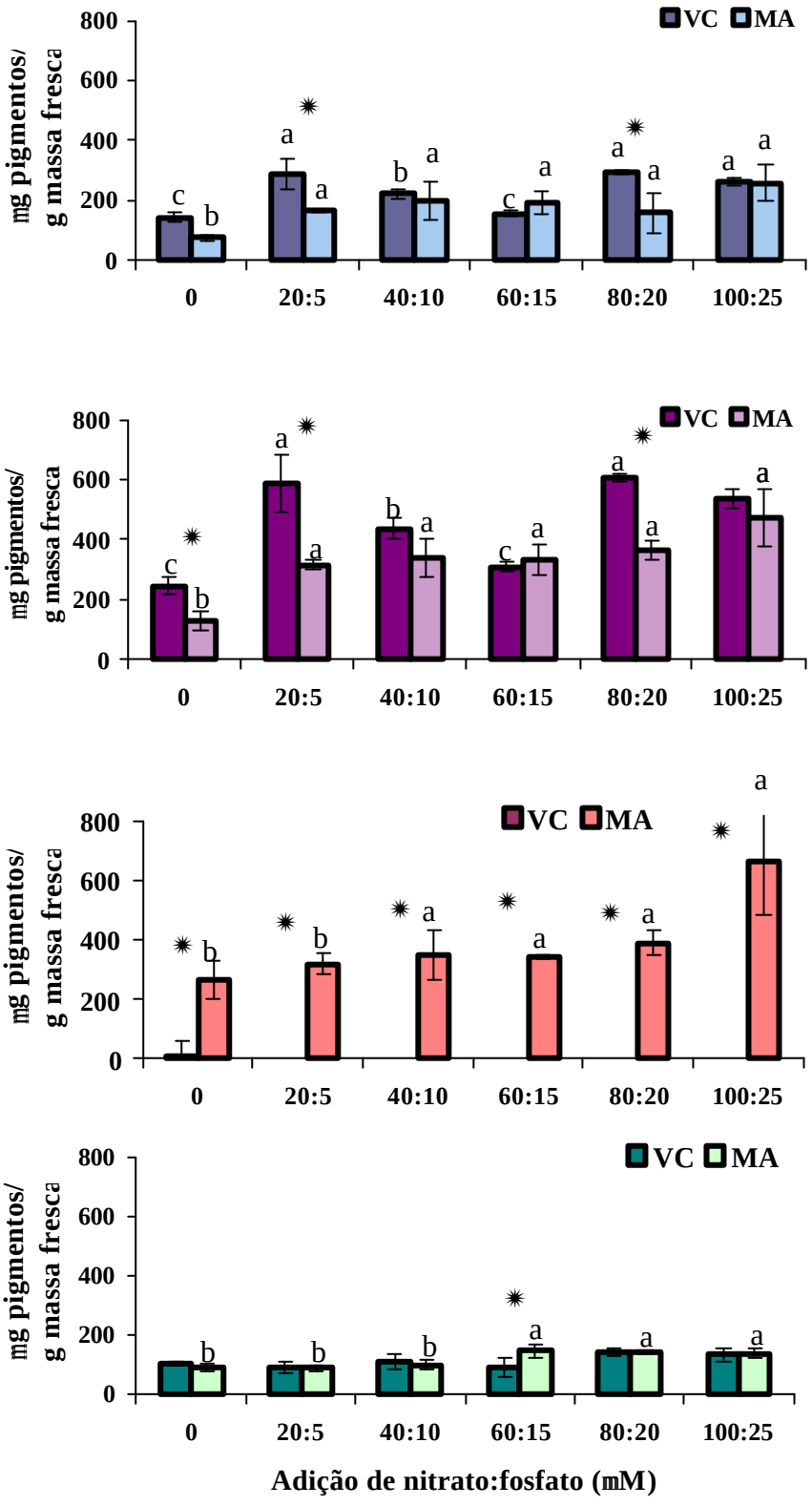

Figura 3.9. Variação no conteúdo de ficobiliproteínas (AFC – Aloficocianina; FC – Ficocianina; FE – Ficoeritrina) e clorofila *a* (Cla) das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo uma relação N:P de 4:1. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Para a linhagem VC, a fotossíntese bruta (FB) aumentou do controle para 20:5 μM de nitrato:fosfato e não houve resposta significativa entre as demais concentrações de nitrato:fosfato (Figura 3.10). A respiração (RE) aumentou do controle para 40:10 μM de nitrato:fosfato e apresentou os valores mínimos nos tratamentos com 60:15 e 80:20 μM de nitrato:fosfato (2,70 ± 0,15 e 2,66 ± 0,67 mgO_2 g MS^{-1} h^{-1}, respectivamente) e máximo em 100:25 μM de nitrato:fosfato (8,08 ± 0,62 mgO_2 g MS^{-1} h^{-1}) (Figura 3.10). Devido à alta taxa respiratória, a fotossíntese líquida (FL) foi muito baixa, sendo nula no controle e nos tratamentos com 20:5, 40:10 e 100:25 μM de nitrato:fosfato. O maior valor de FL ocorreu em 60:15 μM de nitrato:fosfato (1,99 ± 0,84 mgO_2 g MS^{-1} h^{-1}) (Figura 3.10).

A concentração ótima de nitrato:fosfato para a FB da linhagem MA também foi a de 20:5 μM de nitrato:fosfato, sendo que o menor valor da FB ocorreu em 60:15 μM de nitrato:fosfato (2,91 ± 0,37 mgO_2 g MS^{-1} h^{-1}) (Figura 3.10). A respiração dessa linhagem foi maior em 40:10 μM de nitrato:fosfato (7,71 ± 1,87 mgO_2 g MS^{-1} h^{-1}) e não houve diferença significativa entre os outros tratamentos (Figura 3.10). A FL apresentada por essa linhagem também foi muito baixa, sendo que os maiores valores ocorreram no controle (1,19 ± 0,22 mgO_2 g MS^{-1} h^{-1}) e em 80:20 μM de nitrato:fosfato (1,08 ± 0,23 mgO_2 g MS^{-1} h^{-1}) e os menores em 40:10 e 60:15 μM de nitrato:fosfato (Figura 3.10).

Comparando as respostas das duas linhagens, a linhagem VC apresentou maior FL do que a MA no tratamento com 60:15 μM de nitrato:fosfato, enquanto a linhagem MA apresentou maior FL do que a VC no tratamento controle. Em relação a respiração, a linhagem VC apresentou maior RE do que a MA em 100:25 μM de nitrato:fosfato, enquanto a linhagem MA apresentou maior RE do que a VC em 40:10 μM de nitrato:fosfato.

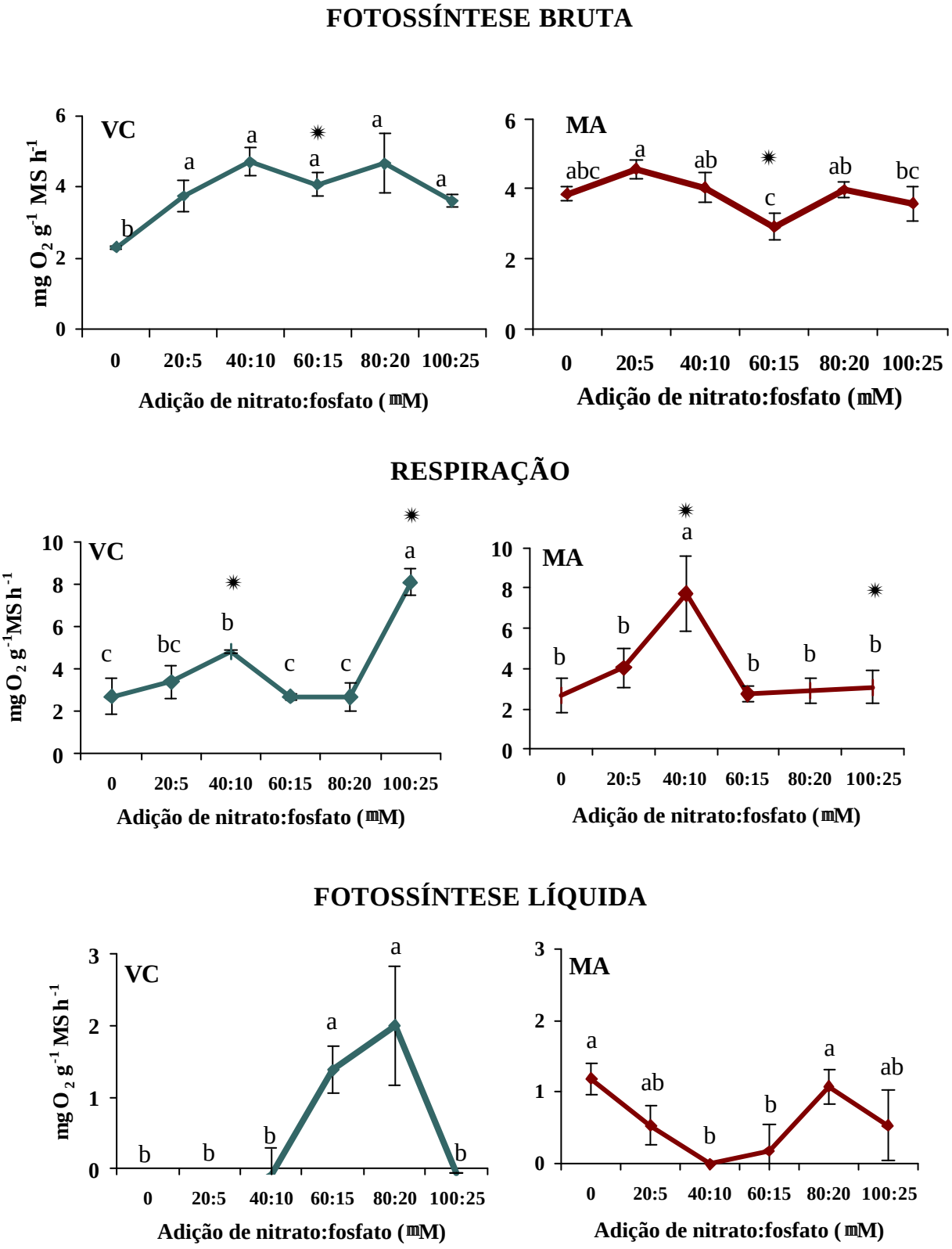

Figura 3.10. Variação da fotossíntese bruta, da respiração e da fotossíntese líquida das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 4:1. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Para a linhagem VC, houve correlação positiva significativa entre a concentração de nitrato e fosfato e TC, proteína, AFC, FC, Cl*a*, FB e RE (tabela 3.4 A). Para a linhagem MA, houve correlação positiva significativa entre a concentração de nitrato e fosfato e TC, proteína, AFC, FC, FE e Cl*a* (tabela 3.4 B).

Tabela 3.4. Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com as linhagens verde-clara (A) e marrom (B) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 4:1. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo ao valor de *p*. **Negrito**, correlação significativa.

A

Variáveis	TC	NR	Proteína	AFC	FC	FE	Cl*a*	FL	RE	FB
[Nitrato]	**0.820**	-0.042	**0.633**	**0.544**	**0.591**	-0.482	**0.552**	-0.257	**0.548**	**0.473**
	<0.001	0.866	**0.004**	**0.029**	**0.015**	0.058	**0.017**	0.303	**0.018**	**0.046**

B

Variáveis	TC	NR	Proteína	AFC	FC	FE	Cl*a*	FL	RE	FB
[Nitrato]	**0.478**	-0.207	**0.587**	**0.563**	**0.796**	**0.707**	**0.773**	0.063	-0.159	-0.360
	0.044	0.442	**0.010**	**0.035**	**< 0.001**	**0.004**	**< 0.001**	0.801	0.530	0.142

Comparação das diferentes variáveis analisadas entre o experimento com adição de nitrato e o experimento com adição de nitrato e fosfato

Não houve diferença significativa na TC de ambas as linhagens de *H. musciformis* cultivadas em meio com adição apenas de nitrato ou com adição de nitrato e fosfato. As linhagens VC e MA cultivadas em meio com enriquecimento com fosfato apresentaram maior atividade da NR do que os espécimes cultivados em meio sem adição de fosfato em, respectivamente, todas as concentrações testadas e 20:5 e 100:25 de nitrato:fosfato. A linhagem VC apresentou maior conteúdo de proteínas solúveis totais e de AFC na concentração de 80:20 µM de nitrato:fosfato, em relação ao meio sem adição de fosfato (tabelas 3.5 e 3.6).

Em relação aos pigmentos e a respiração de ambas as linhagens e à FB da linhagem VC, quando houve diferença significativa entre os meios testados (com ou sem adição de fosfato), os resultados foram maiores no meio com adição de fosfato (tabelas 3.5 e 3.6). A FB da linhagem MA foi maior quando esta linhagem foi cultivada com fosfato nas concentrações de 40:10 e 100:25 μM de nitrato:fosfato . Porém, na concentração de 60:15 μM de fosfato:nitrato, a FB foi maior no meio sem adição de fosfato (tabela 3.6). Para a FL de ambas as linhagens, quando houve diferença significativa entre os meios testados, os resultados foram maiores no meio sem adição de fosfato (tabelas 3.5 e 3.6).

Tabela 3.5. Comparação entre os experimentos com adição apenas de nitrato e com adição de nitrato e fosfato realizados com a linhagem verde-clara (VC) de *Hypnea musciformis*, cultivada por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato. Os valores correspondem à média e desvio padrão de cada variável analisada. As células com os números em negrito representam as diferenças significativas entre os meios testados (com ou sem fosfato), segundo a ANOVA bifatorial e o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Variáveis analisadas	**TRATAMENTOS (adição de nitrato:fosfato)**									
	20:0	**20:5**	**40:0**	**40:10**	**60:0**	**60:15**	**80:0**	**80:20**	**100:0**	**100:25**
TC (d^{-1})	0,04 ±0,00	0,04 ±0,00	0,03 ±0,00	0,04 ±0,01	0,04 ±0,01	0,04 ±0,00	0,04 ±0,01	0,05 ±0,01	0,05 ±0,01	0,05 ±0,01
NR ($x10^{-3}$ Ug^{-1})	**4,28 ±1,07**	**44,59 ±12.52**	**7,08 ±0,45**	**44,62 ±18,20**	**4,43 ±1,33**	**49,62 ±6.92**	**11,76 ±5,21**	**43,01 ±11,10**	**7,41 ±5,50**	**56,66 ±5,26**
Proteína (mg pt/g MF)	2,88 ±0,07	3,04 ±0,26	2,36 ±0,22	3,10 ±0,44	2.47 ±0,24	2,68 ±0,16	**2,12 ±0,87**	**3,54 ±0,51**	2,82 ±0,22	3,00 ±0,26
AFC (mg pig/g MF)	**238,15 ±1,79**	**290,49 ±52,06**	187,76 ±18,14	222,32 ±14,06	192,18 ±1,75	155,75 ±9,71	**167,37 ±11,14**	**296,60 ±5,47**	**142,75 ±33,70**	**263,61 ±11,20**
FC (mg pig/g MF)	507,08 ±19,79	587,89 ±96,43	391,86 ±44,56	437,15 ±33,56	384,66 ±17,85	310,31 ±15,97	**390,25 ±54,60**	**606,00 ±13,51**	**301,86 ±78,11**	**535,83 ±34,00**
FE (mg pig/g MF)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cl*a* (mg pig/g MF)	134,50 ±31,60	89,41 ±19,73	106,29 ±9,06	108,59 ±24,63	92,91 ±14,17	93,71 ±32,31	**82,18 ±8,59**	**142,18 ±12,93**	**71,53 ±18,72**	**134,76 ±21,43**
FB (mgO_2 g^{-1}MS h^{-1})	4,06 ±0,42	3,75 ±0,46	**2,45 ±0,32**	**4,71 ±0,39**	**2,36 ±0,01**	**4,08 ±0,33**	3,79 ±0,26	4,65 ±0,84	2,92 ±0,66	3,61 ±0,19
RE (mgO_2 g^{-1}MS h^{-1})	**1,00 ±0,09**	**3,38 ±0,76**	**0,80 ±0,25**	**4,80 ±0,08**	**0,74 ±0,31**	**2,70 ±0,15**	**1,41 ±0,11**	**2,66 ±0,67**	**3,41 ±0,38**	**8,08 ±0,62**
FL (mgO_2 g^{-1}MS h^{-1})	**3,06 ±0,42**	**0,00**	**1,65 ±0,32**	**0,00**	1,62 ±0,01	1,38 ±0,33	2,65 ±0,58	1,99 ±0,84	0,00	0,00

Tabela 3.6. Comparação entre os experimentos com adição apenas de nitrato e com adição de nitrato e fosfato realizados com a linhagem marrom (MA) de *Hypnea musciformis*, cultivada por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato. Os valores correspondem à média ± desvio padrão de cada variável analisada. As células com os números em negrito representam as diferenças significativas entre os meios testados (com ou sem fosfato), segundo a ANOVA bifatorial e o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Variáveis analisadas	**TRATAMENTOS (adição de nitrato:fosfato)**									
	20:0	**20:5**	**40:0**	**40:10**	**60:0**	**60:15**	**80:0**	**80:20**	**100:0**	**100:25**
TC (d^{-1})	0,05 ±0,01	0,05 ±0,00	0,04 ±0,00	0,04 ±0,01	0,04 ±0,00	0,05 ±0,02	0,05 ±0,01	0,05 ±0,01	0,06 ±0,01	0,05 ±0,01
NR ($x10^{-3}$ Ug^{-1})	**8,30 ±1,98**	**33,03 ±6,72**	18,55 ±9,11	31,09 ±0,25	23,91 ±8,09	35,59 ±1,87	19,92 ±4,76	32,53 ±4,73	**18,44 ±2,94**	**45,22 ±8,88**
Proteína (mg pt/g MF)	2,93 ±0,40	2,94 ±0,26	2,83 ±0,08	3,15 ±0,14	2,84 ±0,38	3,20 ±0,92	3,04 ±0,09	3,58 ±0,36	2,79 ±0,11	2,89 ±0,07
AFC (mg pig/g MF)	172,03 ±56,32	164,80 ±2,50	198,26 ±56,03	198,32 ±64,94	136,01 ±13,52	193,18 ±38,40	161,28 ±23,58	159.40 ±66,78	164,80 ±16,27	259,26 ±59,50
FC (mg pig/g MF)	280,25 ±54,07	315,89 ±15,16	294,63 ±21.33	339,09 ±65,87	**225.04 ±34,09**	**335,39 ±51,48**	309,63 ±25,74	363,75 ±31,84	**311,38 ±33,69**	474,29 **±97,28**
FE (mg pig/g MF)	274,93 ±57,21	319,59 ±36,81	321,38 ±41,90	349,15 ±80,11	263,45 ±31,94	343,17 ±4,57	320,60 ±3,35	390,52 ±42,05	**344,71 ±18,24**	**662,32 ±181,23**
Cla (mg pig/g MF)	78,07 ±18,23	89,63 ±9,15	84,30 ±20,94	97,95 ±16,06	**74,25 ±10,95**	**147,32 ±23,57**	113,84 ±12,10	142,81 ±8,23	**98,81 ±12,40**	**137,48 ±15,94**
FB ($mgO_2\ g^{-1}MS\ h^{-1}$)	4,66 ±0,95	4,57 ±0,27	**2,86 ±0,32**	**4,03 ±0,41**	**5,13 ±0,54**	**2.91 ±0,37**	4,08 ±0,05	3,98 ±0,23	**4,84 ±0,30**	**3,59 ±0,50**
RE ($mgO_2\ g^{-1}MS\ h^{-1}$)	**0,93 ±0,02**	**4,03 ±0,99**	**0,98 ±0,26**	**7,71 ±1,87**	1,43 ±0,34	2,73 ±0,38	1,13 ±0,34	2,90 ±0,61	**0,49 ±0,03**	**3,05 ±0,82**
FL ($mgO_2\ g^{-1}MS\ h^{-1}$)	**3,73 ±0,95**	**0,54 ±0,27**	**1,88 ±0,32**	**0,00**	**3,70 ±0,54**	**0,18 ±0,37**	**3,13 ±0,36**	**1,08 ±0,23**	**4,35 ±0,30**	**0,54 ±0,50**

Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato em algas sem limitação interna de nitrogênio

Adição de nitrato

Foram realizados experimentos para verificar os efeitos de diferentes concentrações de nitrato no desenvolvimento de algas sem limitação interna de nitrogênio, para avaliar se o estado fisiológico nutricional das algas pode influenciar na TC, na atividade da NR e no conteúdo de proteínas solúveis totais das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis*.

A linhagem VC apresentou maior TC nos tratamentos com 80 e 100 μM de nitrato e menor nos tratamentos variando de 0 a 60 μM de nitrato (figura 3.11). Já a linhagem MA apresentou maior TC nos tratamentos com 20 a 100 μM de nitrato e menor no controle (figura 3.11). A linhagem MA apresentou maior TC do que a VC nos tratamentos com 20 e 40 μM de nitrato.

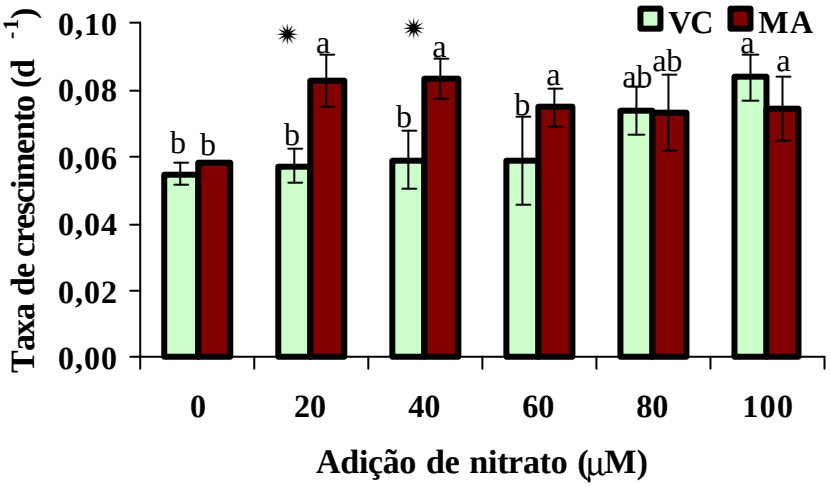

Figura 3.11. Variação da taxa de crescimento das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Para ambas as linhagens, a atividade da NR foi maior no tratamento controle (figura 3.12 A). Ambas as linhagens estudadas apresentaram menor conteúdo de proteínas solúveis totais no tratamento controle e maior nos tratamentos variando de 20 a 100 µM de nitrato (figura 3.12 B). A linhagem VC apresentou maior conteúdo de proteínas do que a linhagem MA nos tratamentos de 20 e 100 µM de nitrato.

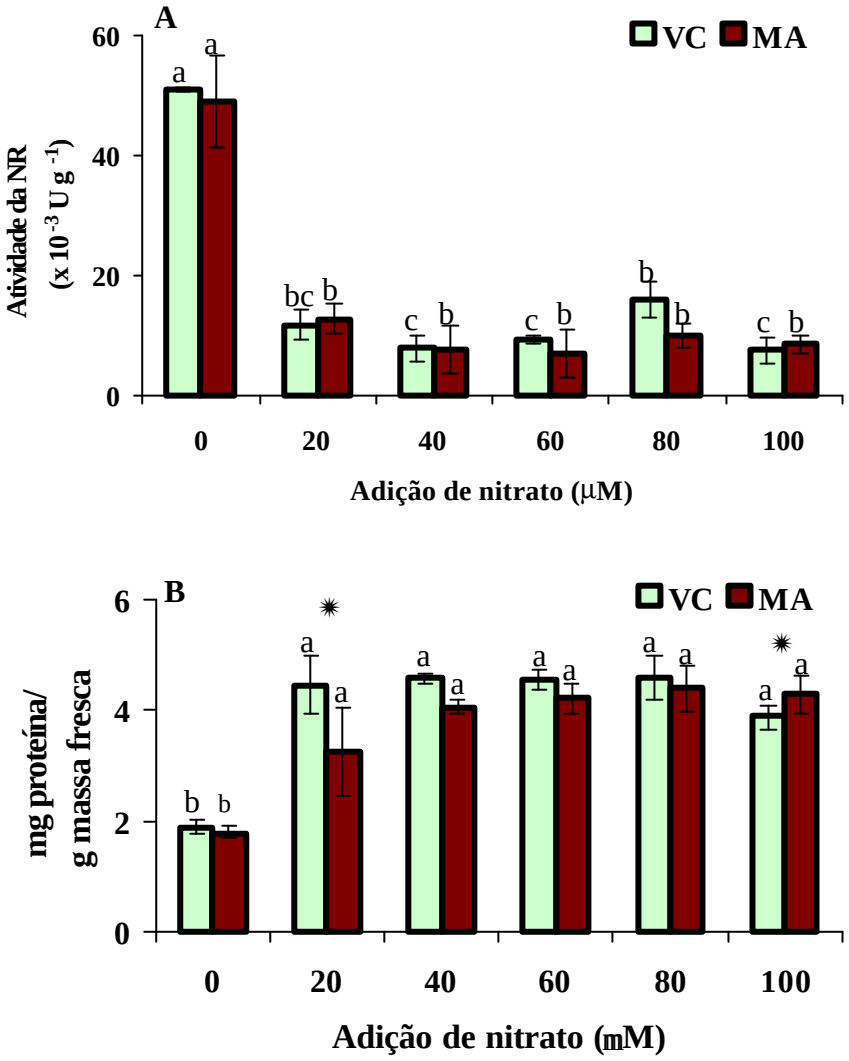

Figura 3.12. Variação da atividade da NR (A) e do conteúdo de proteínas (B) das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey. ✷ indica as diferenças significativas entre as linhagens, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Adição de nitrato e fosfato

Foram realizados experimentos para verificar os efeitos da relação N:P na TC, na atividade da NR e no conteúdo de proteínas solúveis totais das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis*. Como houve a perda de amostras devido à quebra do "deep-freezer" onde elas estavam armazenadas, os resultados da atividade da NR e do conteúdo de proteínas solúveis totais serão apresentados apenas para a linhagem VC, nas concentrações de 0 a 60:15 μM de nitrato:fosfato.

Não houve diferença significativa na TC de ambas as linhagens nos diferentes tratamentos (figura 3.13).

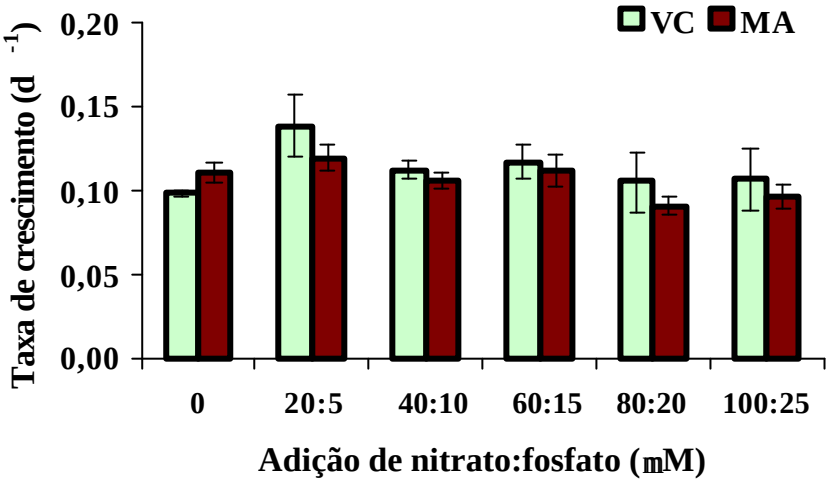

Figura 3.13. Variação da taxa de crescimento das linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 4:1.

A atividade da NR da linhagem VC foi maior no tratamento com 20:5 μM de nitrato:fosfato e menor no controle (figura 3.14 A). O conteúdo de proteínas solúveis totais aumentou do controle para o tratamento de 60:15 μM de nitrato:fosfato (figura 3.14 B).

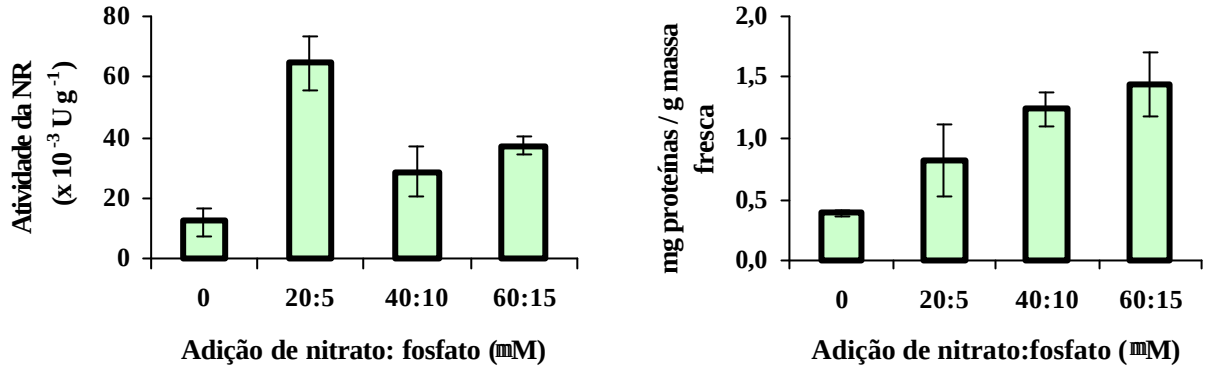

Figura 3.14. Variação da atividade da NR (A) e do conteúdo de proteínas solúveis totais (B) da linhagem verde-clara (VC) de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato, mantendo a relação N:P de 4:1. Tratamentos com letras distintas são significativamente diferentes entre si, segundo o teste de comparação múltipla de Tukey.

Discussão

Testes preliminares para a extração de pigmentos

Nos testes preliminares para a extração de pigmentos das variantes pigmentares de *Hypnea musciformis*, a biomassa escolhida foi de 75 mg e optou-se em utilizar 1000 µl de acetona para a extração de clorofila *a*. Esta proporção é um pouco menor do que a utilizada por Plastino & Guimarães (2001), de 500 mg de amostra para 4 ml de tampão fosfato e acetona, o que corresponde a 125 mg massa fresca/1ml de tampão.

Os procedimentos originais que descrevem a extração de ficobiliproteínas utilizam a maceração do material biológico e a extração dos pigmentos no escuro ou em luminosidade muito tenue e no gelo, a fim de evitar a foto-oxidação do pigmento. No entanto, com o advento da maceração em nitrogênio líquido, essa técnica foi incorporada a uma série de protocolos utilizando material vivo. Considerando que não houve diferença significativa no conteúdo de pigmentos da linhagem VC, extraídos com nitrogênio líquido no claro e no escuro, adotou-se a extração no claro, uma vez que o desvio padrão das amostras extraídas no escuro foi maior, o que se deve, provavelmente, a maior perda das amostras ao contato com o nitrogênio líquido e a maceração. Ao

macerar a alga congelada, pedaços do talo são perdidos, e no escuro a perda de material é maior do que no claro. Também ocorre perda do material algáceo durante a suspensão do macerado no tampão de extração, uma vez que não se enxerga a sobra de material no almofariz.

Assimilação do nitrogênio, crescimento e fotossíntese em espécimes com diferentes estados nutricionais

Nitrato

No experimento utilizando algas com limitação interna de nitrogênio, a taxa de crescimento das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* foi maior nos tratamentos variando de 20 a 100 μM de nitrato, enquanto que a atividade da NR da linhagem VC foi máxima no tratamento controle (sem adição de nitrato). Para *Laminaria saccharina* (Phaeophyta), a taxa de crescimento atingiu o valor máximo em concentrações menores de nitrato, entre 5 e 10 μM, e a atividade da nitrato redutase e outras enzimas foi máxima entre 10 e 30 μM de nitrato (Wheeler & Weidner 1983).

A literatura cita que a nitrato redutase é uma enzima substrato-induzível, ou seja, sua atividade é estimulada pela presença de substrato, no caso o nitrato (Berges, 1997). Entretanto, os resultados apresentados pelas linhagens VC e MA de *H. musciformis* não estão de acordo com os dados da literatura, pois a atividade da NR das duas linhagens não aumentou com o incremento de nitrato no meio, sendo maior no controle. Essa resposta pode ser explicada pelo estado nutricional das algas. As linhagens foram cultivadas por duas semanas em água do mar esterilizada sem adição de nutrientes, e durante esse período, as algas podem consumir suas reservas, como proteínas e pigmentos, para sustentar a sobrevivência e o crescimento (Smit *et al.* 1997). Durante o experimento, as algas foram incubadas em água do mar com adição de nitrato, exceto as algas do controle, que continuaram sendo mantidas em água do mar sem adição de nutrientes. O conteúdo de proteínas das algas do controle foi muito menor do que o dos espécimes cultivados com adição de nitrato, o que mostra que enquanto os espécimes cultivados em água do mar com adição de nitrato sintetizaram e armazenaram proteínas, o metabolismo das algas do controle manteve-se em um

nível basal. Ao se adicionar nitrato durante o ensaio *in vitro* da enzima, a NR dos espécimes do controle da linhagem VC foi rapidamente estimulada, sendo que o mesmo não foi observado com a NR das algas cultivadas com adição de nitrato. Tal resposta evidencia que quando esses espécimes passam por longos períodos de limitação de nitrogênio, assim como populações de algas de regiões oligotróficas, são ativados mecanismos que possibilitam uma absorção rápida de nutrientes, quando estes se tornam disponíveis. Esse resultado corrobora com o observado por Thompson & Valieda (1999), que verificaram que pulsos de nitrato aumentaram significativamente a atividade da NR de *Cladophora vagabunda* (L.) Hoek e *Gracilaria tikvahiae* McLachlan. Estes resultados podem indicar que, embora a linhagem VC de *Hypnea musciformis* seja uma variante deficiente em ficoeritrina, sua NR pode ser eficiente em ambientes oligotróficos.

A linhagem VC apresentou FE apenas no tratamento controle. Com a adição de nitrato no meio, o conteúdo desse pigmento foi nulo. A concentração ótima de nitrato para AFC, FC, Chl *a* e proteínas da linhagem VC e para as ficobiliproteínas e proteínas da linhagem MA foi de 20 µM de nitrato. Andria *et al.* (1999) observaram que a taxa de crescimento de *Gracilaria* sp. foi maior nos tratamentos com pouca disponibilidade de N do que nos tratamentos com alta disponibilidade desse nutriente. No entanto, o conteúdo de proteínas solúveis totais e de ficoeritrina decresceu quando a espécie foi cultivada com pouca disponibilidade de nitrogênio, o que reflete o papel desses compostos nitrogenados como reserva de nitrogênio em condições de limitação desse nutriente e sua utilização para o crescimento (Andria *et al.* 1999). Entretanto, resposta oposta foi observada para a linhagem VC de *Hypnea musciformis*, que apresentou FE apenas no tratamento controle, e o conteúdo desse pigmento foi nulo nos tratamentos com a adição de nitrato.

A concentração ótima de nitrato para a fotossíntese líquida das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* foi 20 µM. Enquanto a fotossíntese líquida da linhagem VC foi totalmente inibida em 100 µM, a da linhagem MA atingiu valores máximos. Para *Gracilaria tenuistipitata* Chang et Xia (García-Sánchez 1993) cultivada em tratamento com baixa e alta concentração de nitrato (0,1 e 1 mM), a evolução do oxigênio, ao longo de 10 dias, manteve-se elevada no

tratamento com alta concentração de N e cessou no tratamento com baixa concentração de nitrato, resultado semelhante ao observado para a linhagem MA. Para *G. tenuistipitata* (García-Sánchez 1993) no tratamento de 0,1 mM de nitrato, a taxa de crescimento e a evolução de oxigênio aumentaram enquanto havia nitrogênio externo, enquanto que em 1 mM, ocorreu uma relação inversamente proporcional entre a TC e evolução de oxigênio.

Para a linhagem VC de *Hypnea musciformis*, a taxa de crescimento, o conteúdo de proteínas e a respiração foram correlacionados positivamente com o incremento da concentração de nitrato no meio. Já a concentração de nitrato da linhagem MA está correlacionada positivamente com a TC, o conteúdo de proteína, FC, FE, FL e FB. Para *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* (Harvey) Taylor (Lapointe 1981) e para as linhagens selvagens e as variantes cromáticas de *Gracilaria birdiae* (Costa 2005) não ocorreu incremento significativo na TC com o aumento das concentrações de nitrato. Entretanto, Costa (2005) observou resultados semelhantes ao da linhagem MA de *H. musciformis*, uma vez que houve uma tendência ao aumento nos conteúdos pigmentares das linhagens de *G. birdiae* como resposta ao aumento da concentração de nitrato no meio de cultura, exceto para aloficocianina.

A respiração da linhagem VC de *H. musciformis* aumentou com o incremento da concentração de nitrato no meio, enquanto que a fotossíntese da linhagem MA aumentou nessas mesmas condições. Esse resultado evidencia diferenças metabólicas entre as linhagens quanto ao metabolismo de assimilação do nitrato, indicando que a linhagem MA fixaria mais carbono fotossintético do que a linhagem VC. A linhagem VC, por sua vez, supriria a demanda de carbono necessária para a síntese de aminoácidos através da glicólise.

Comparando-se os resultados das linhagens de *Hypnea musciformis* com diferentes estados nutricionais, verificou-se que as TC apresentadas pelas plantas sem limitação de nitrogênio não foi maior do que a das plantas com limitação, exceto no tratamento com 100µM de nitrato; a atividade da NR de plantas sem limitação foi maior do que a das plantas com limitação apenas no controle; e o conteúdo de proteínas solúveis totais de plantas sem limitação foi maior do que o das plantas com

limitação nos tratamentos variando de 40 a 100 µM de nitrato. No entanto, para *G. tenuistipitata*, tanto a taxa de crescimento quanto o conteúdo de proteínas solúveis decresceram ao longo de 21 dias, quando cultivada em condições de limitações de nutrientes. Quando os nutrientes foram adicionados, a taxa de crescimento e o conteúdo de proteínas solúveis se re-estabeleceram totalmente (Collén *et al*. 2004). Os resultados obtidos para *H. musciformis* indicam que o cultivo durante um mês em meio enriquecido com nitrato não foi suficiente para que as algas pudessem restabelecer o estoque de nitrogênio e os processos fisiológicos em níveis compatíveis com aqueles apresentados pelas algas sem limitação de nutrientes.

Adição de nitrato e fosfato

No experimento mantendo a relação N:P de 4:1 realizado utilizando algas com deficiência interna de nutrientes, não houve diferença significativa na TC das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* entre as diferentes concentrações de nitrato e fosfato. O mesmo não foi observado para *Gracilaria cornea* J. Agardh, uma vez que as maiores taxas de crescimento ocorreram nos tratamentos com razão N:P de 10:1 e 5:1 e a menor TC ocorreu no tratamento com razão de 10:0 e 10:10 (Navarro-Angulo & Robledo 1999).

Ao comparar a atividade da NR apresentada pelas linhagens VC e MA de *H. musciformis* cultivadas em meio com apenas nitrato e com nitrato e fosfato, observou-se um aumento significativo na atividade enzimática com a presença de fosfato no meio, principalmente para a linhagem VC. Tem sido considerado que o fosfato estimula a atividade da NR, embora uma parte do seu efeito estimulatório possa ser resultado de um incremento na força iônica, quando esse fator não foi adequadamente controlado (Nicholas & Scawin 1956, Huber *et al.* 1994). A estimulação do fosfato é específica para atividades de redução do nitrato e geralmente é resultado da interação do fosfato com o centro Mo-pterina (Solomonson & Barber 1990).

Para as linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis*, verificou-se uma correlação positiva entre o acréscimo de fosfato no meio e os conteúdos de pigmentos fotossintéticos. Entretanto,

Chopin *et al.* (1995) observaram que o fósforo não teve efeito significativo na fotossíntese e no conteúdo de pigmentos fotossintéticos de *Chondrus crispus* Stackhouse. Por outro lado, o fósforo foi o nutriente limitante mais importante para a produtividade de *G. tikvahiae* (Lapointe 1987) em águas costeiras da Flórida, sendo que a fotossíntese foi mais estimulada pelo fósforo do que pelo nitrogênio. O enriquecimento com fósforo também estimulou as taxas fotossintéticas de *Sargassum natans* (L.) Gaillon e *Sargassum fluitans* (Børgesen) Børgesen (Lapointe 1986). O mesmo não foi observado para as linhagens VC e MA de *H. musciformis*, uma vez que a FL dos espécimes cultivados em meio com fosfato foi menor do que a dos espécimes cultivados sem fosfato na maioria dos tratamentos.

As TC apresentadas pelas plantas sem limitação interna de nutrientes foram maiores que a das plantas com limitação, porém o efeito da disponibilidade de nitrato:fosfato foi significativo apenas nos espécimes com limitação interna de nutrientes.

Comparação entre as linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis*

Ao comparar as respostas apresentadas pelas linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* com deficiência interna de nutrientes cultivadas em diferentes concentrações de nitrato observou-se que a linhagem MA apresentou maior TC, atividade da NR e conteúdo de proteínas do que a linhagem VC, em determinados tratamentos. Costa (2005) também observou que a linhagem verde clara de *Gracilaria birdiae* apresentou menores TC, independente das concentrações de nitrato testadas, o que parece estar relacionado às deficiências metabólicas dessa variante de cor. Entretanto, a linhagem VC de *H. musciformis* apresentou maior FL do que a linhagem MA nos tratamentos com 40:10, 60:15 e 80:20 μM de nitrato:fosfato. Esses resultados indicam que a variante VC pode apresentar melhor desempenho fotossintético do que a MA em determinadas condições de disponibilidade de nitrogênio e fósforo.

Quando foi adicionado somente nitrato na água do mar, a linhagem VC armazenou nitrogênio principalmente na forma de proteínas e a linhagem MA na forma de proteínas e de pigmentos (FC e

FE). Quando foi adicionado N:P na água do mar, a linhagem VC também armazenou nitrogênio na forma de pigmentos (AFC, FC e Cl*a*) e a linhagem MA na forma de Cl*a*. Esses resultados evidenciam as diferenças existentes no metabolismo do nitrogênio das duas linhagens de cor de *Hypnea musciformis*, e a importância do fósforo no metabolismo do nitrogênio.

Referências Bibliográficas

Andria, J.R., Vergara, J.J. & Perez-Llorens, J.L. 1999. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. European Journal of Phycology 34: 497-504.

Berges, J.A. 1997. Algal nitrate reductases. European Journal of Phycology 32: 3-8.

Bergstrom, L., Berger, R. & Kautsky, L. 2003. Negative direct effects of nutrient enrichment on the establishment of *Fucus vesiculosus* in the Baltic Sea. European Journal of Phycology 38: 41-46.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Chapman, D.J. & Harrison, P.J. 1988. Nitrogen metabolism and measurement of nitrate reductase activity. *In:* C.S. Lobban, D.J. Chapman & B. Kremer (eds.). Experimental phycology. A laboratory manual. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 196-202.

Chopin, T., Gallant, T. & Davison, I. 1995. Phosphorus and nitrogen nutrition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta): Effects on total phosphorus and nitrogen content, carrageenan production, and photosynthetic pigments and metabolism. Journal of Phycology 31: 283-293.

Chopin, T. & Wagey, B.T. 1999. Factorial study of the effects of phosphorus and nitrogen enrichments on nutrient and carrageenan content in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and on residual nutrient concentration in seawater. Botancia Marina 42: 23-31.

Collén, P.N., Camitz, A., Hancock, R.D., Viola, R. & Pedersén, M. 2004. Effect of nutrient deprivation and resupply on metabolites and enzymes related to carbon allocation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). Journal of Phycology 40: 305-314.

Conley, D.J. 2000. Biogeochemical nutrient cycles and nutrient management strategies. Hydrobiologia 410: 87-96.

Costa, V.L. 2005. Diversidade intraespecífica em gametófitos de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): Efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 100 p.

Davison, I.R. & Stewart, W.D.P. 1984. Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. II. The role of nitrate availability in the regulation of enzyme activity. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 79: 65-78.

Deboer, J.A. 1981. Nutrients. *In:* C.S. Lobban & M.J. Wynne (eds.). The Biology of Seaweeds. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 91-356.

Deboer, J.A. & Whoriskey, F.G. 1983. Production and role of hyaline hairs in *Ceramium rubrum.* Marine Biology 77: 229-234.

García-Sánchez, M.J., Fernández, J.A. & Niell, F.X. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. Physiologia Plantarum 88: 631-637.

Grasshoff, K., Enhardt, M. & Kremling, K 1983. Methods of Sea Water Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, 419 p.

Hanisak, M.D. 1990. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. Hydrobiologia 204/205: 79-87.

Huber, S.C., Huber, J.L. & Kaiser, W.M. 1994. Differential response of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase-activation to inorganic and organic salts, in vitro and in situ. Physiologia Plantarum 92: 302-310.

Hwang, S.-P.L., Williams, S.L. & Brinkhuis, B.H. 1987. Changes in internal dissolved nitrogen pools as related to nitrate uptake and assimilation in *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Rhodophyta). Botanica Marina 30: 11-19.

Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 e c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP). 167: 191-194.

Kursar, T.A., Van Der Meer, J. & Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. Plant Physiology 73: 353-360.

Lapointe, B.E. 1981. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* v. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). Journal of phycology 17: 90-95.

Lapointe, B.E. 1986. Phosphorus-limited photosynthesis and growth of *Sargassum natans* and *Sargassum fluitans* (Phaephyceae) in the Western North Atlantic. Deep Sea Research 33: 391-399.

Lapointe, B.E. 1987. Phosphorus- and nitrogen-limited photosynthesis and growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in the Florida Keys: an experimental field study. Marine Biology 93: 561-568.

Littler, M.M & Arnold, K.E. 1985. Electrodes and chemicals. *In:* M.M. Littler & D.S. Littler (eds.). Handbook of Phycological Methods; Ecological Field Methods: Macroalgae. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 349-375.

Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 366 p.

Navarro-Ângulo, L. & Robledo, D. 1999. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. Hydrobiologia 398/399: 315–320.

Nicholas, D.J.D & Scawin, J.H. 1956. A phosphate requirement for nitrate reductase from *Neurospora crassa*. Nature 178:1474-1475.

O'connor, K.A. & West, J.A. 1991. The effect of light and nutrient conditions on hair formation in *Spyridia filamentosa* (Wulfen) Harvey (Rhodophyta). Botanica Marina 34: 359-364.

Plastino, E.M. & Guimarães, M. 2001. Diversidad intraespecífica. *In:* K, Alveal & T. Antezana (eds.). Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual. Bases científico-técnicas, teorizaciones y proyecciones. Universidad de Concepción, Concepción, pp. 19-27.

Smit, A.J., Robertson, B.L. & du Preez, D.R. 1997. Influence of ammonium-N pulse concentrations and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and biochemical composition of *Gracilaria gracilis*. Journal of Applied Phycology 8: 473-481.

Solomonson, L. P. & Barber, M. J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41: 225-253.

Strickland J.D.H & Parsons, T.R. 1972. A pratical handbook of seawater. Fisheries Research Board, Canada, Bulletin n° 167, 311 p.

Thomas, M.L.H. 1988. Photosynthesis and respiration of aquatic macro-flora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygen analyzer. *In:* C.S. Lobban, D.J. Chapmam & B.P. Kremer (eds.). Experimental Phycology: a laboratory manual. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 64-77.

Thompson, S.M. & Valieda, I. 1999. Effect of nitrogen loading on enzime activity of macroalgae in estuaries in Waquoit Bay. Botanica Marina 42: 519-529.

Tyrrell, T. 1999. The relative influence of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. Nature 400: 525-531.

Wheeler, W.N. & Weidner, M. 1983. Effects of external inorganic nitrogen concentration on metabolism, growth and activities of key carbon and nitrogen assimilating enzymes of *Laminaria saccharina* (Phaeophyceae) in culture. Journal of Phycology 19: 92-96.

CAPÍTULO 3

CAPTAÇÃO E REMOÇÃO DE NUTRIENTES E LIBERAÇÃO DO NITROGÊNIO ORGÂNICO DISSOLVIDO NA ÁGUA DO MAR ENRIQUECIDA COM NITRATO E FOSFATO PELAS VARIANTES PIGMENTARES DE *HYPNEA MUSCIFORMIS* (WULFEN IN JACQU.) J.V. LAMOUR. (GIGARTINALES, RHODOPHYTA)

Colaboradora: Dra. Elisabete de Santis Braga
Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, SP

Abstract

[Nutrient uptake and removal and release of dissolved organic nitrogen into seawater enriched with nitrate and phosphate by colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)]

In the marine environment, nitrogen is available in small amounts for the majority of seaweeds and is considered the main limiting nutrient on their growth. The main objectives of the present study were to evaluate the uptake and removal of nitrogen and phosphorus, and the release of dissolved organic nitrogen (DON) into seawater by the light-green (LG) and brown (BR) strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. Initial biomass from both strains was cultivated for one week in sterilized seawater enriched with different concentrations of nitrate (from zero to 100 μM), and enriched with nitrate (from zero to 100 μM) and phosphate (from zero to 25 μM). Experiments were carried out under temperature of 23 ± 2 ^{o}C, photoperiod of 14 h, salinity of 30-32 psu, pH 8, irradiance of 60 a 90 μmol photons.m^{-2}.s^{-1}, with aeration. In both colour strains, nitrate uptake increased linearly with nitrate concentrations, while phosphate uptake showed a kinetic of saturation. Percentages of nitrate removal of both strains were very high (95%) in all treatments, and it did not show saturation. Percentages of nitrite removal of both strains were lower in the control and higher in 60 μM of nitrate and 100:25 μM of nitrate:phospate. The LG strain removed ammonium only in the treatments with 40 and 60 μM of nitrate, while the BR strain removed in treatments from 40 to 100μM of nitrate. With the addition of nitrate:phosphate, percentage of ammonium removal was zero and the highest percentage of phosphorus removal was in treatment with 20:5 μM (nitrate:phosphate) to LG strain, and in 20:5 and 40:10 μM (nitrate:phosphate) to the BR strain. LG and BR strains liberated high amounts of DON to seawater at concentrations of 80

μM and 100 μM of nitrate, respectively. The addition of nitrate:phosphate in the seawater caused high release of DON by the BR strain. The results show that LG and BR strains of *H. musciformis* are efficient in removing nitrogen and phosphorus from seawater at concentrations up to 60 μM, in which high levels of removed nitrate ate released to the seawater as DON.

Resumo

No ambiente marinho, o nitrogênio está disponível em pequenas quantidades para a maioria das macroalgas e é considerado o principal nutriente limitante para o seu crescimento. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a captação e remoção do nitrogênio e do fósforo da água do mar e a liberação do nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) na água do mar pelas linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour., cultivadas por uma semana em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato (de zero a 100 μM), e enriquecida com nitrato (de zero a 100 μM) e com fosfato (de zero a 25 μM). Os experimentos foram realizados em temperatura de 23 ± 2 ^{o}C, fotoperíodo de 14 h, salinidade 30-32 ups, pH 8, densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, com aeração. Nas duas linhagens, a captação de nitrato aumentou linearmente com o incremento das concentrações de nitrato, enquanto que a captação de fosfato apresentou uma cinética de saturação. As porcentagens de remoção de nitrato das duas linhagens estudadas foram muito altas (≥ 95%) em todos os tratamentos testados, não atingindo a saturação. As porcentagens de remoção de nitrito das duas linhagens foram menores no controle e maiores em 60 μM de nitrato e em 100:25 μM de nitrato:fosfato. Para a linhagem VC, houve remoção do amônio apenas nos tratamentos com 40 e 60 μM de nitrato, e para a linhagem MA nos tratamentos variando de 40 a 100 μM de nitrato. Com a adição de nitrato:fosfato na água do mar, a porcentagem de remoção de amônio foi nula e a porcentagem de remoção de fosfato foi maior no tratamento com 20:5 μM (nitrato:fosfato) para a linhagem VC, e em 20:5 e 40:10 μM (nitrato:fosfato) para a linhagem MA. As linhagens VC e MA liberaram maiores quantidades de NOD para o meio nas concentrações de 80 μM e 100 μM de nitrato, respectivamente. A adição de nitrato:fosfato no meio ocasionou maior liberação de NOD pela linhagem MA. Estes resultados mostram que as linhagens VC e MA de *H. musciformis* são eficientes na remoção do nitrogênio e do fósforo da água do mar em concentrações de até 60 μM, uma vez que, a partir dessa concentração, grande parte do nitrato removido é liberado à água do mar como NOD.

Introdução

No ambiente marinho, o nitrogênio está disponível em pequenas quantidades para a maioria das macroalgas e é considerado o principal nutriente limitante para o crescimento desses organismos (DeBoer 1981).

O nitrogênio (N) é encontrado nas formas de nitrato, nitrito e amônio nos ecossistemas marinhos, sendo o nitrato a forma mais abundante (Tyrrel 1999). Ao serem captados pela célula, o nitrato e o nitrito são convertidos a amônio, o qual é incorporado aos aminoácidos. A uréia e alguns aminoácidos também podem ser captados por alguns organismos autótrofos. Os organismos heterótrofos assimilam as formas orgânicas de nitrogênio, como aminoácidos, peptídeos e proteínas (Braga 2002).

O sucesso do cultivo de macroalgas requer o conhecimento das relações entre o nitrogênio e as algas (Hanisak 1990). Estudos demonstram que a adição de compostos nitrogenados na água do mar pode estimular a taxa de crescimento (Wheeler & Weidner 1983), a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, como a nitrato redutase, e de enzimas relacionadas ao metabolismo do carbono como a RuBisCO (Wheeler & Weidner 1983), e a fotossíntese (Dawes & Koch 1990). Algumas espécies de algas podem estocar o nitrogênio na forma de aminoácidos, proteínas e pigmentos (Bird *et al.* 1982, Rosemberg & Ramus 1982).

Devido ao crescente problema da eutrofização nos ecossistemas costeiros, têm sido realizados estudos para verificar a possível utilização das macroalgas marinhas como biofiltros, ou seja, para verificar a capacidade desses organismos em remover determinados nutrientes dissolvidos na água do mar, como, por exemplo, o nitrato e o fosfato (Jensen 1993). Hayashi (2007) observou que a rodofícea *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva, quando cultivada em tanques com água de efluentes de cultivo de peixes, por oito dias, removeu 18,20% do nitrato e 15,63% do fosfato. Porém, pouco se sabe sobre a quantidade de nitrogênio inorgânico dissolvido e de matéria orgânica liberada para a água do mar pelas macroalgas (Tyler & McGlathery 2006). Tyler *et al.*

(2001) verificaram que a macroalga *Ulva lactuta* L. pode incrementar substancialmente o fluxo total de nitrogênio orgânico dissolvido dos bentos para a coluna d'água, durante o seu crescimento ativo.

Um aspecto a ser considerado é a relação nitrogênio: fósforo (N:P), uma vez que a adição de nutrientes na água decorrente da ação antrópica resultou em uma proporção N:P elevada nas águas costeiras (Conley 1999), e estudos recentes têm demonstrado a importância dessa relação no desenvolvimento das algas marinhas.

Considerando a importância do conhecimento das relações entre o nitrogênio e as algas para o sucesso do cultivo desses organismos, bem como da relação N:P na água do mar, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a captação e remoção do nitrato e fosfato da água do mar e a liberação do nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) na água do mar pelas linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour., cultivadas em diferentes concentrações nitrato, em tratamentos com alta relação N:P (adição de nitrato, sem adição de fosfato) e com baixa relação N:P (adição de nitrato e fosfato, mantendo a relação constante de N:P de 4:1).

Materiais e métodos

Cultivo de Hypnea musciformis

As linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. utilizadas nos experimentos descritos abaixo foram cultivadas em meio VSES/2, sob temperatura média de 23 ± 2 ^{o}C, fotoperíodo de 14 h , salinidade 30-32 ups, pH 8, densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}.

Experimento com água do mar enriquecida com nitrato e com nitrato e fosfato

Os experimentos foram realizados utilizando água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato ($NaNO_3$, zero, 20, 40, 60, 80 e 100 μM), e enriquecida com as mesmas concentrações de nitrato e com fosfato ($Na_2HPO_4.12H_2O$, zero, 5, 10, 15, 20 e 25 μM), na

proporção 4:1 de nitrogênio:fósforo. Foi realizado um pré-tratamento onde as algas foram cultivadas em água do mar esterilizada sem adição de nutrientes durante duas semanas que antecederam o início do experimento. Durante o período experimental, as algas foram cultivadas com aeração em intervalos alternados de 30 minutos, em Erlenmeyes de 500 ml, mantendo-se a proporção de 1,6 g (massa fresca) por 400 ml de meio de cultura (Figura 4.1). As culturas foram aeradas com ar úmido produzido por uma bomba (marca Devilbiss, modelo tufão) ligada a um Kitasato com água destilada. As condições experimentais foram as mesmas já descritas no item anterior.

O experimento teve a duração de uma semana, sendo que as amostras de água do mar dos tratamentos testados foram coletadas no tempo inicial de incubação (T=0 dias) e no tempo final (T=7 dias), e congeladas a –20°C, para posterior análise. A determinação das concentrações de nitrogênio e fosfato foi realizada coletando-se amostras de água do mar correspondentes a cada tratamento e quantificando-se os níveis remanescentes de nitrogênio e fosfato no meio de incubação.

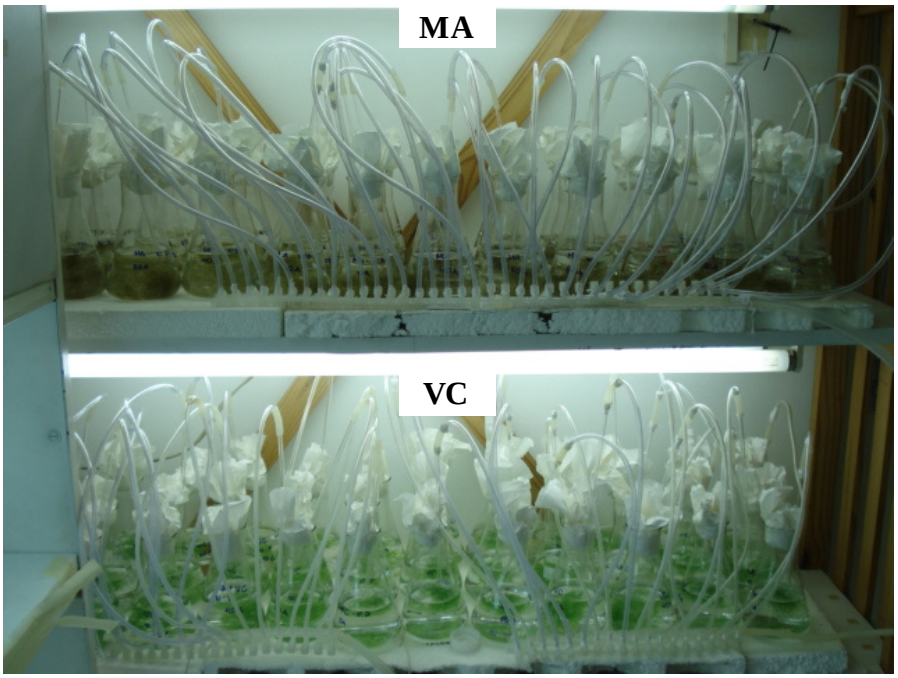

Figura 4.1. Aspecto geral das incubações das linhagens marrom (MA) e verde-clara (VC) de *Hypnea musciformis* para avaliar as concentrações de nutrientes no meio de incubação.

Água do mar utilizada nos experimentos: A água do mar utilizada nesses experimentos foi proveniente de um único lote para uma padronização e foi coletada na Base Norte do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, na Praia do Lamberto, em Ubatuba, SP. Antes da incubação das algas (T=0 dias), a água do mar esterilizada enriquecida com as diferentes concentrações de nitrato sem e com fosfato foi filtrada em um filtro de fibra de vidro (0,45 µm de diâmetro do poro). Após a incubação das algas (T=7 dias), as alíquotas de água retiradas para posterior análise de nutrientes remanescentes também foram filtradas nesse mesmo tipo de filtro.

Análise de nutrientes na água do mar: As amostras de água do mar foram analisadas no Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços do Mar (IO-USP), contando com a colaboração com da Prof ª Dra. Elisabete de Santis Braga.

- **Nitrato e nitrito:** A quantificação de nitrato e nitrito foi realizada utilizando o Technicon Auto Analyzer II, de acordo com a metodologia descrita por Grasshoff *et al.* (1983). Essa metodologia consiste na redução do nitrato à nitrito, a qual é feita através da passagem das amostras de nitrato por uma coluna de cádmio. A concentração final de nitrito é determinada por espectrofotometria à 543 nm, após a adição de sulfanilamida e n-(1-naftil) etilenodiamina diidrocloreto (NED).

- **Amônio:** A quantificação de amônio consiste na adição de um reagente contendo hipoclorito seguido da adição de um reagente contendo fenol. O amônio reage com o hipoclorito formando monocloramina. Este composto, na presença de fenol, dá lugar à formação do azul de indofenol, que é medido por espectrofotometria à 630 nm (Grasshoff *et al.* 1983, Strickland & Parsons 1968).

- **Fosfato:** A quantificação de fosfato baseia-se na reação do íon com um reagente contendo molibdato, em meio ácido, produzindo o complexo fosfomolibdato. Essa reação, catalisada pelo antimônio, forma um complexo amarelado que é reduzido a um composto azul, por ação do ácido ascórbico. A leitura é realizada por espectrofotometria à 880 nm (Grasshoff *et al.* 1983, Strickland & Parsons 1968).

- **Nitrogênio orgânico dissolvido (NOD):** A análise de NOD foi realizada através da foto-oxidação das amostras de água do mar. Primeiramente, as amostras de água do mar foram transferidas para tubos de ensaio de quartzo, onde foi realizada adição de peróxido de hidrogênio. Em seguida, as amostras foram incubadas, por 10 horas, em uma câmara contendo uma lâmpada com radiação ultravioleta, para a quebra das moléculas orgânicas. A adição de peróxido de hidrogênio foi realizada para garantir que todo o nitrogênio formado fosse oxidado, formando nitrato e nitrito, que foram analisados como descrito anteriormente. Os valores finais obtidos correspondem ao conteúdo de nitrogênio orgânico total (NTD). Para obter os valores de NOD, subtraiu-se o valor de NTD pelos valores de nitrato, nitrito e amônio das análises anteriores (amostras não foto-oxidadas). Essa análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Armstrong *et al*. (1966) e adaptada pela Profa. Dra. Elisabete de Santis Braga.

As concentrações iniciais de nitrato, nitrito, amônio, fosfato e nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) foram analisadas na água do mar, sem adição de nutrientes (tabela 4.1). Os conteúdos de nitrato e fosfato também foram analisados em todos os tratamentos testados (tabela 4.2 A e B).

Cálculos realizados: Foram avaliadas a remoção dos nutrientes da água do mar, taxa de captação de nitrato e de fosfato e a liberação de NOD pelas linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis*.

- **Porcentagem de remoção de nutrientes** (%): O cálculo da remoção dos nutrientes foi baseado na seguinte fórmula: 100 x {([inicial]-[final])[inicial]$^{-1}$}, onde [inicial] = concentração do nutriente no tempo zero e [final] = concentração do nutriente após sete dias de incubação.

- **Taxa de captação de nitrato e fosfato** ($\mu M\ g^{-1}\ d^{-1}$): [Inicial] – [Final]/ biomassa x tempo

- **Liberação de NOD** (μM): Foi calcula pela diferença nas concentrações iniciais e finais de NOD na água do mar ([Final NOD]-[Inicial NOD]).

Análise estatística: Cada tratamento foi testado com 3 repetições simultâneas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um e dois fatores, seguido do teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Tabela 4.1. Concentração inicial de nutrientes na água do mar utilizada nos experimentos. Os valores correspondem a média (n=3) ± desvio padrão. NOD = nitrato orgânico dissolvido.

	Nitrato	Nitrito	Amônio	Fosfato	NOD
Concentração (μM)	5,40 ± 0,1	0,30 ± 0,0	1,23 ± 0,1	0,53 ± 0,0	2,91 ± 0,4

Tabela 4.2. Concentração inicial de nitrato e fosfato na água do mar em todos os tratamentos testados. Os valores correspondem à média (n=3) ± desvio padrão. **A**. Tratamentos com adição de apenas nitrato. **B.** Tratamentos com adição de nitrato e fosfato.

A	**Tratamentos testados (adição de nitrato)**					
	zero	20 μM	40 μM	60 μM	80 μM	100 μM
Concentração de nitrato (μM)	5,40 ± 0,07	24,20 ± 0,22	43,87 ± 0,02	62,51 ± 1,23	84,62 ± 0,68	101,42 ± 0,70
Concentração de fosfato (μM)	0,53 ± 0,03	0,56 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,74 ± 0,04	0,59 ± 0,11	0,80 ± 0,05
Relação N:P	10,12	44,09	63,33	84,75	143,96	127,17

B	**Tratamentos testados (adição de nitrato:fosfato)**					
	zero	20:5 μM	40:10 μM	60:15 μM	80:20 μM	100:25 μM
Concentração de nitrato (μM)	5,40 ± 0,07	25.40 ± 0,92	44.81 ± 0,49	61,72 ± 0,35	84,69 ± 0,06	102,02 ± 0,30
Concentração de fosfato (μM)	0,53 ± 0,03	5,32 ± 0,31	10,31 ± 0,22	14,37 ± 0,57	18,85 ± 0,22	22,37 ± 2,26
Relação N:P	10,12	4.77	4.35	4.30	4.49	4.56

Resultados

Efeitos da disponibilidade do nitrato na remoção de nutrientes e liberação de nitrogênio orgânico dissolvido

Ao incubar as linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* por sete dias em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato, observou-se que a concentração final de nitrato na água do mar foi muito baixa, com valores próximos a zero em todos os tratamentos testados. Ambas as linhagens removeram a maior parte do nitrato presente na água do mar, sendo que a linhagem VC apresentou menor porcentagem de remoção (97,35%) no tratamento controle (sem adição de nitrato), não havendo diferença significativa entre os demais tratamentos (figura 4.2 A). Para a linhagem MA, a menor porcentagem de remoção (98,27%) também ocorreu no tratamento controle e a maior (99,98%) ocorreu em 80 μM de nitrato (figura 4.2 B). As diferenças ocorridas entre as porcentagens de remoção nos diferentes tratamentos testados foram muito pequenas, uma vez que ambas as linhagens removeram mais de 97% do nitrato em todos os tratamentos testados. Houve diferença entre as linhagens apenas no tratamento controle, onde a linhagem MA removeu mais nitrato do que a linhagem VC. As taxas de captação de nitrato de ambas as linhagens aumentaram linearmente com o incremento na concentração de nitrato (figura 4.3 A e B).

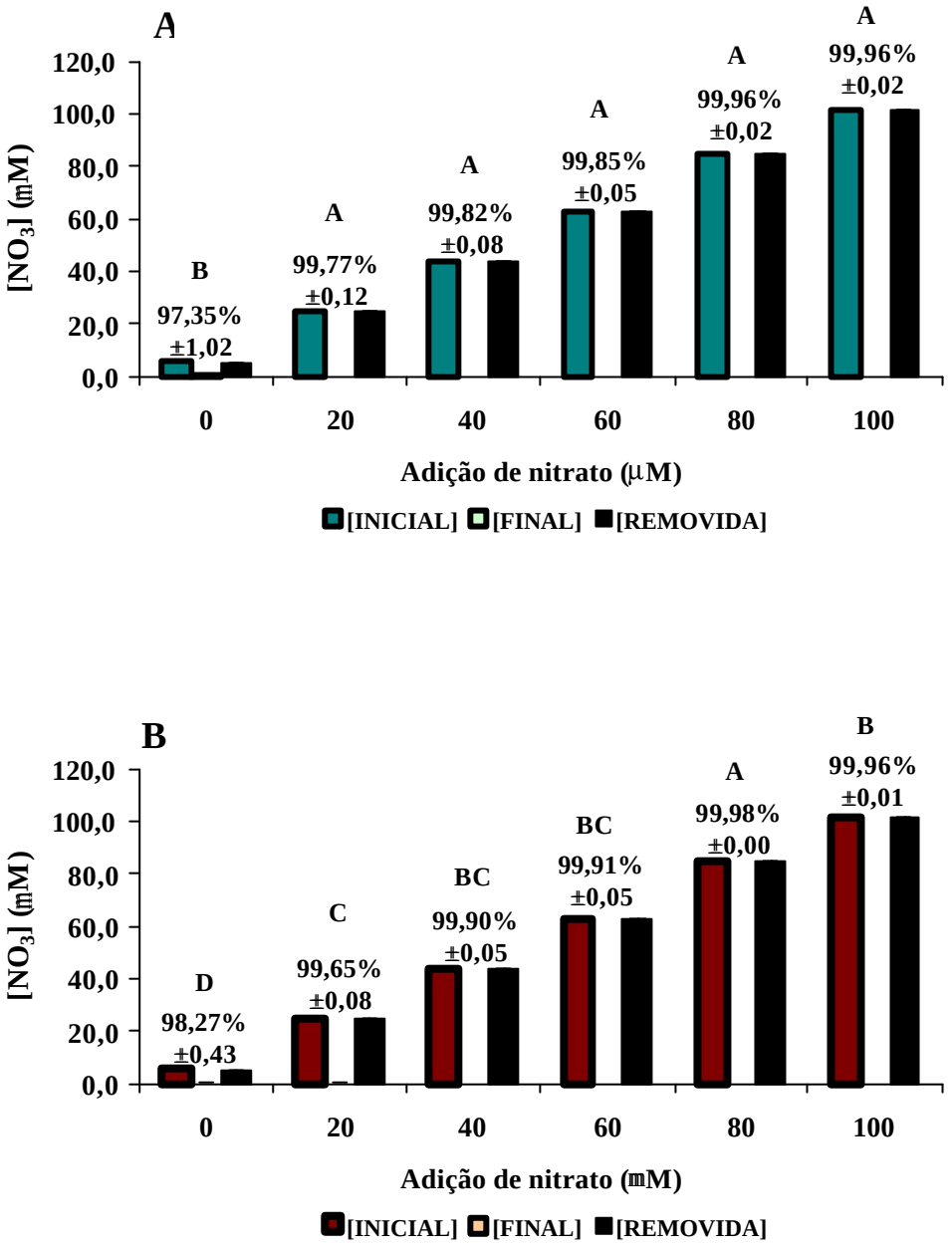

Figura 4.2. Concentrações iniciais e finais de nitrato presentes na água do mar (µM) e concentração de nitrato removida e porcentagens de remoção do nitrato apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as taxas de remoção, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls. As concentrações finais de nitrato foram próximas a zero.

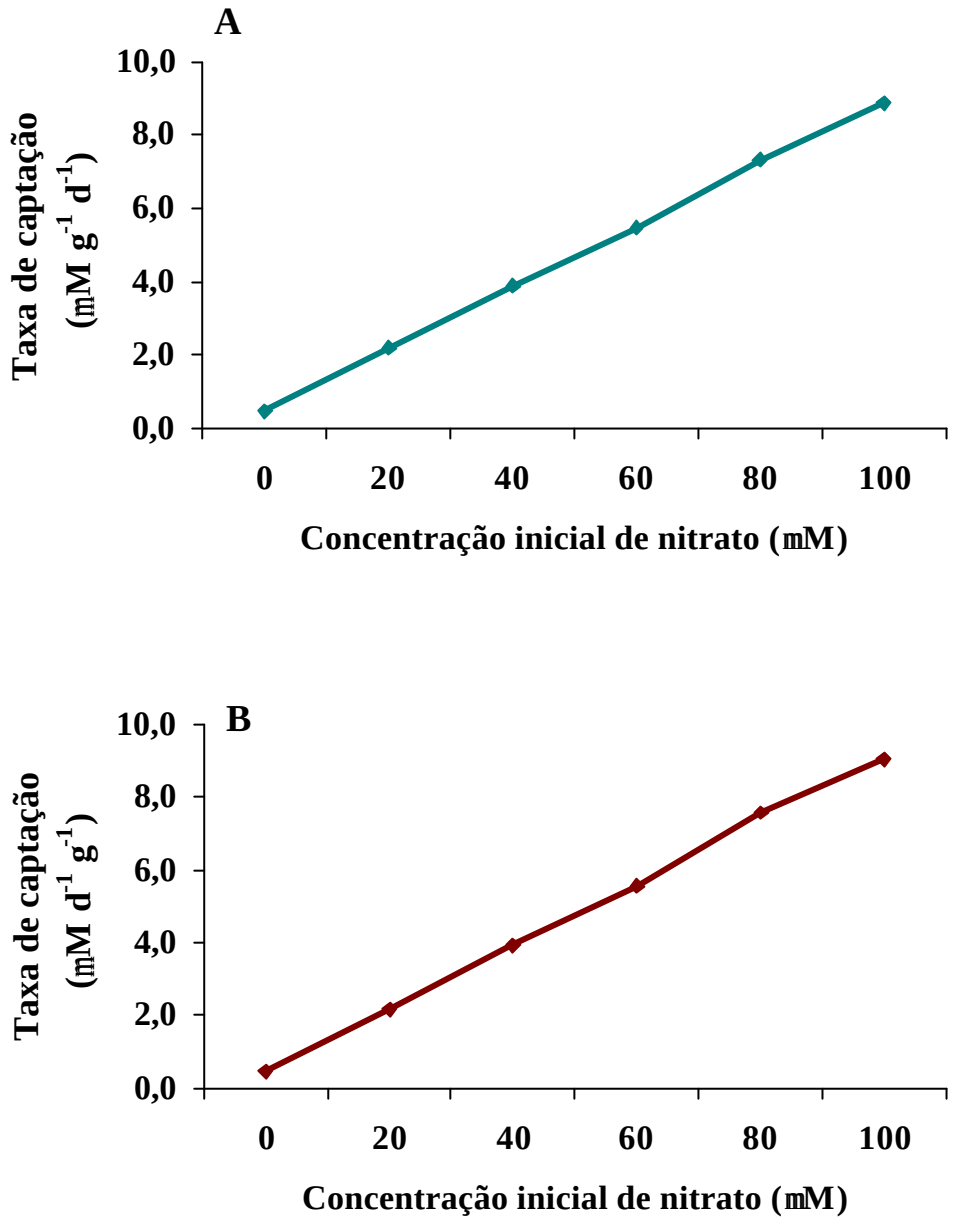

Figura 4.3. Taxas de captação do nitrato (µM g^{-1} d^{-1}) apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato.

Também foram analisadas as concentrações de nitrito e amônio na água do mar, em todos os tratamentos testados. Tal análise foi realizada para verificar a porcentagem de remoção desses nutrientes pelas linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis.*

A porcentagem de remoção do nitrito, para ambas as linhagens de *H. musciformis*, foi maior em 60 μM de nitrato e menor no controle (figura 4.4 A e B). A linhagem MA apresentou maior porcentagem de remoção de nitrito do que a VC nos tratamentos com 20 e 100 μM de nitrato.

Para a linhagem VC, não houve remoção de amônio nos tratamentos controle e com 20, 80 e 100 μM de nitrato (figura 4.5 A). Entretanto, o amônio foi removido nos tratamentos com 40 e 60 μM de nitrato. Para a linhagem MA, no tratamento com 20 μM de nitrato houve aumento na concentração de amônio no meio enquanto nos outros tratamentos (exceto controle) houve remoção. A maior porcentagem de remoção de amônio da linhagem MA também ocorreu no tratamento com 60 μM de nitrato (figura 4.5 B).

A remoção do fosfato foi maior no controle para a linhagem VC, e nos tratamentos controle e com 20 μM de nitrato para a linhagem MA (figura 4.6 A e B). Não houve diferença significativa entre as linhagens.

A concentração inicial de NOD na água do mar foi nula no tratamento com 80 μM de nitrato e não variou entre os demais tratamentos, sendo que a média da concentração de NOD entre esses tratamentos foi de 2,39 ± 0,90 μM (figura 4.7 A e B). Para a linhagem VC, houve um incremento significativo na concentração final de NOD em todos os tratamentos testados, sendo que esta linhagem liberou mais NOD para o meio quando cultivada com 80 μM de nitrato (figura 4.7 A). Já para a linhagem MA, houve um incremento significativo na concentração final de NOD apenas nos tratamentos com 80 e 100 μM de nitrato, sendo que esta linhagem liberou mais NOD em 100 μM de nitrato (figura 4.7 B). A linhagem MA liberou mais NOD do que a VC nos tratamentos com 80 e 100 μM de nitrato.

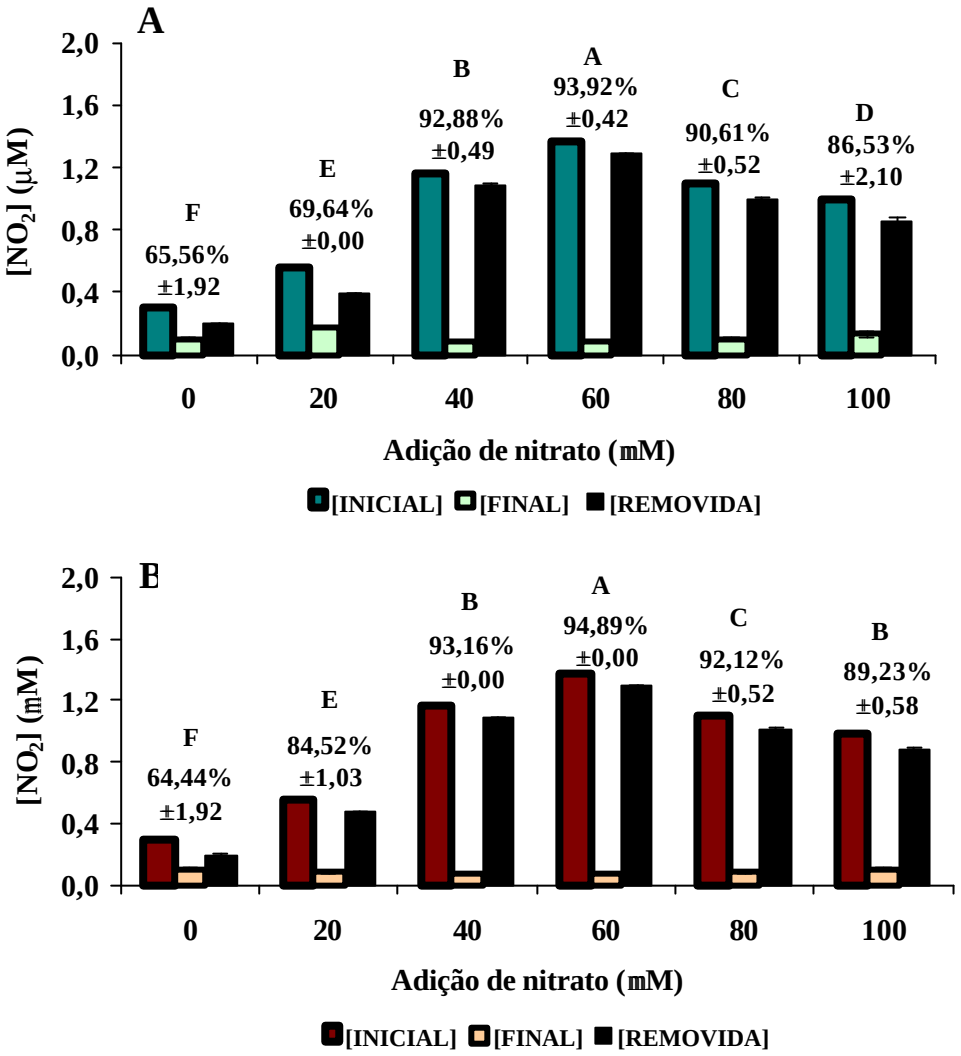

Figura 4.4. Concentrações iniciais e finais de nitrito presentes na água do mar (µM) e concentração de nitrito removida e porcentagens de remoção do nitrito apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as taxas de remoção, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

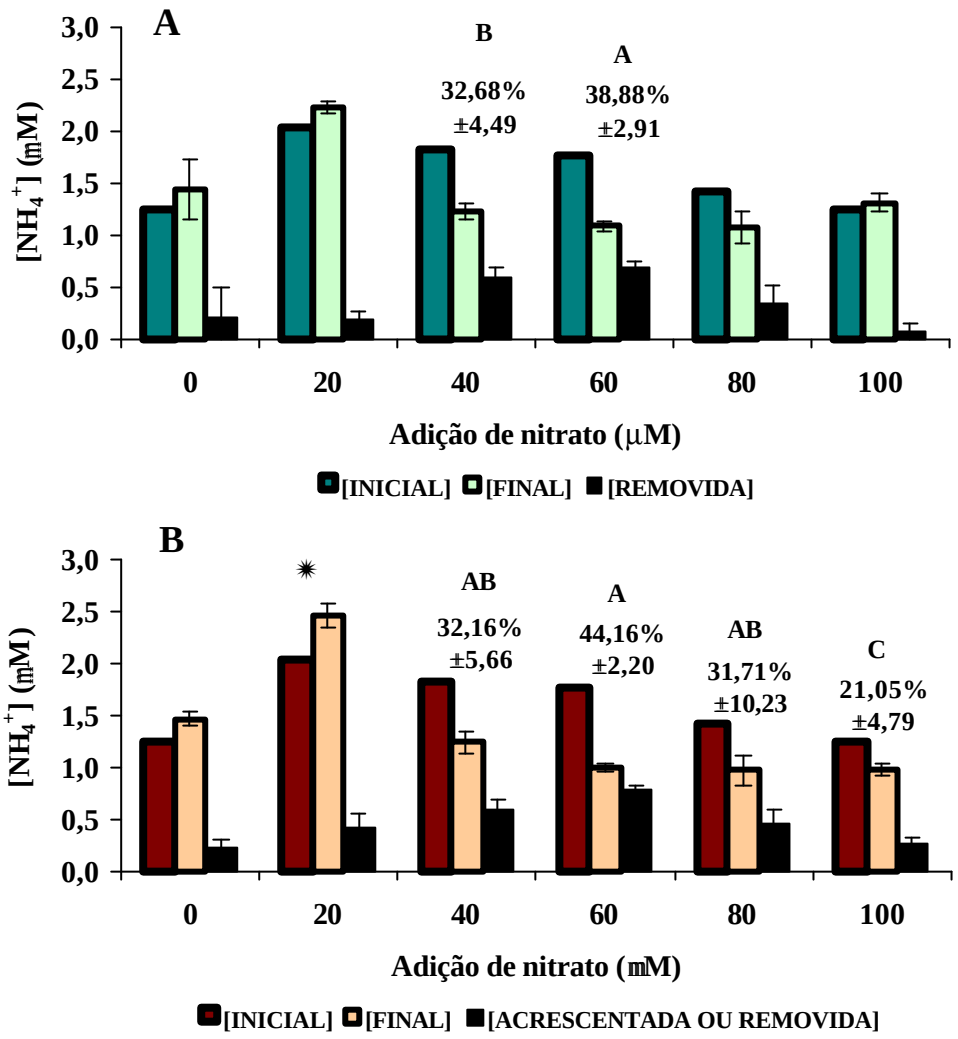

Figura 4.5. Concentrações iniciais e finais de amônio presentes na água do mar (µM) e concentração de amônio removida ou acrescentada e porcentagens de remoção do amônio apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as taxas de remoção, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls. ✷ acréscimo significativo de amônio na água do mar.

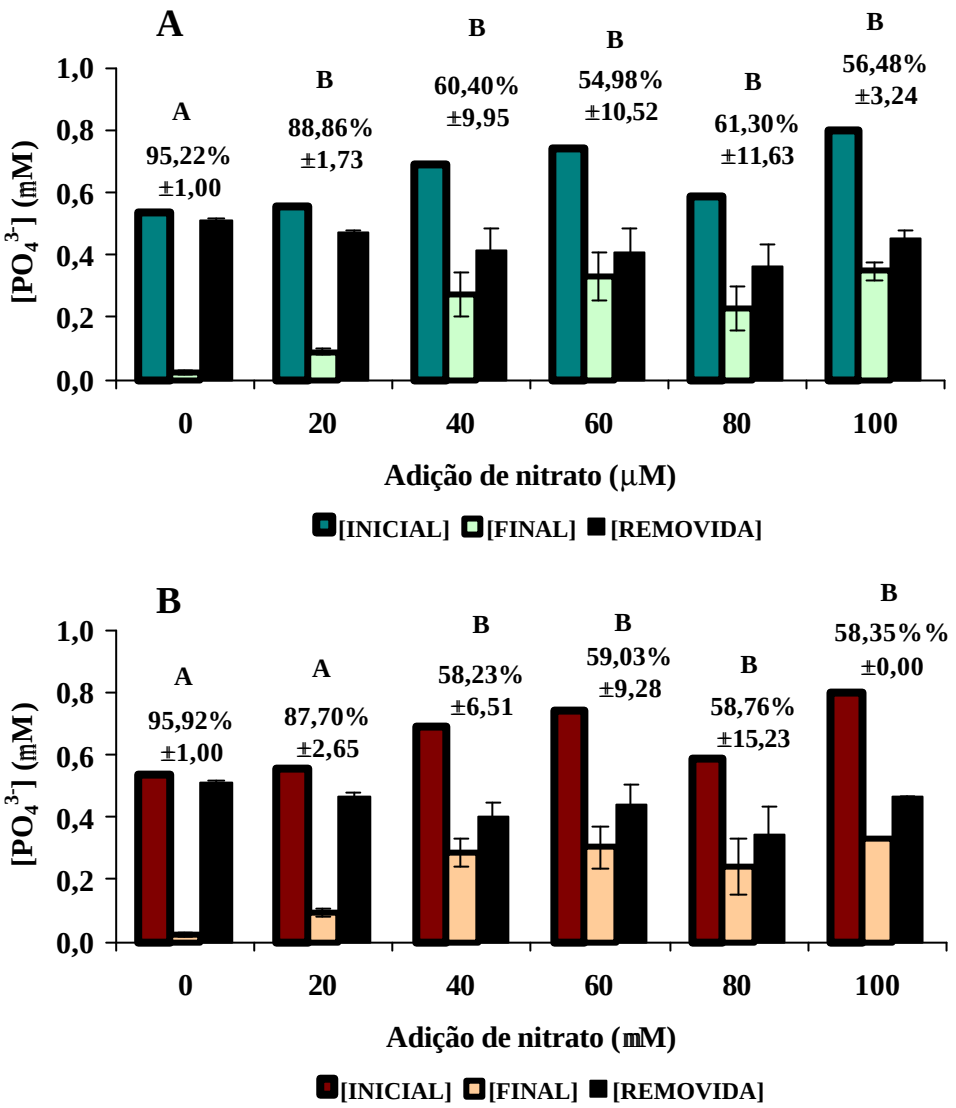

Figura 4.6. Concentrações iniciais e finais de fosfato presentes na água do mar (µM) e concentração de fosfato removida e porcentagens de remoção do fosfato apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as taxas de remoção, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

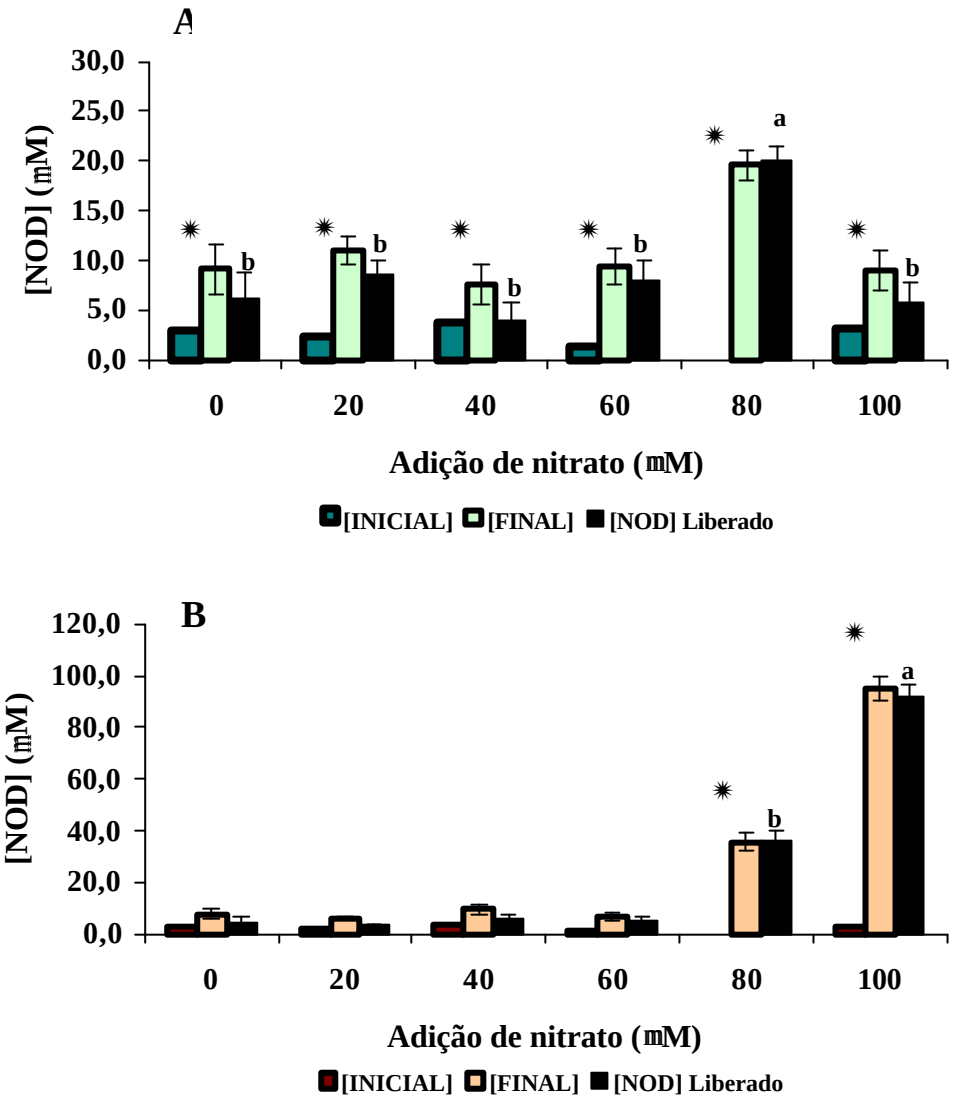

Figura 4.7. Concentrações iniciais e finais de nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) presentes na água do mar (µM) e concentração de NOD liberada pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. ✷ indica as diferenças significativas entre as concentrações iniciais e finais de NOD na água do mar. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as concentrações de NOD liberadas nos diferentes tratamentos.

Para ambas as linhagens estudadas, houve correlação positiva entre concentração inicial de nitrato X remoção de nitrato e nitrito do meio. Além disso, para a linhagem MA, houve correlação positiva entre concentração inicial de nitrato X liberação de NOD (tabela 4.3).

Tabela 4.3. Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com a linhagem VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo valor ao valor de *p*. **Negrito**, correlação significativa.

A

Variáveis	Remoção NO_3^-	Captação NO_3^-	Remoção $[NO_2^-]$	Remoção $[PO_4^{3-}]$	Liberação [NOD]
[Nitrato]	**0,663**	**0,100**	**0,724**	**-0,794**	0,322
	0,002	**0,008**	**< 0,001**	**< 0,001**	0,193

B

Variáveis	Remoção NO_3^-	Captação NO_3	Remoção $[NO_2^-]$	Remoção $[PO_4^{3-}]$	liberação [NOD]
[Nitrato]	**0,735**	**1,0**	**0,697**	**-0,782**	**0,799**
	< 0,001	**0,034**	**0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**

Efeitos da disponibilidade do nitrato e fosfato na remoção de nutrientes e liberação de nitrogênio orgânico dissolvido

A concentração de nitrato na água do mar, após incubar as linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* por sete dias em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato:fosfato, variou de 0,02 μM (tratamento com 80:15 μM de nitrato:fosfato, linhagem MA) até 0,14 ± 0,06 μM (controle, linhagem VC). Ambas as linhagens apresentaram menor porcentagem de remoção no tratamento controle (sem adição de nitrato e fosfato) e maior em 80 μM de nitrato (figura 4.8 A e B). Não houve diferença nas porcentagens de remoção de nitrato entre as linhagens estudadas. Houve um incremento linear na taxa de captação do nitrato em ambas as linhagens estudadas (figura 4.9 A e B).

Para a linhagem VC, a porcentagem de remoção de nitrito foi maior no tratamento com 100:25 μM de nitrato:fosfato e menor no controle (figura 4.10 A). Já para a linhagem MA, a porcentagem de remoção de nitrito foi menor no controle e em 60:15 μM de nitrato:fosfato e maior nos demais tratamentos (figura 4.10 B). A porcentagem de remoção de nitrito da linhagem MA foi maior do que a da VC no tratamento com 40:15 μM de nitrato:fosfato. Entretanto, nos tratamentos controle e com 60:20 μM de nitrato:fosfato a porcentagem de remoção da linhagem VC foi maior do que a da MA.

Não houve remoção de amônio em todos os tratamentos testados, em ambas as linhagens. Houve incremento significativo de amônio na água do mar, nos tratamentos controle e com 20:5 μM de nitrato:fosfato para ambas as linhagens e em 100:25 μM de nitrato:fosfato para a linhagem MA (figura 4.11 A e B).

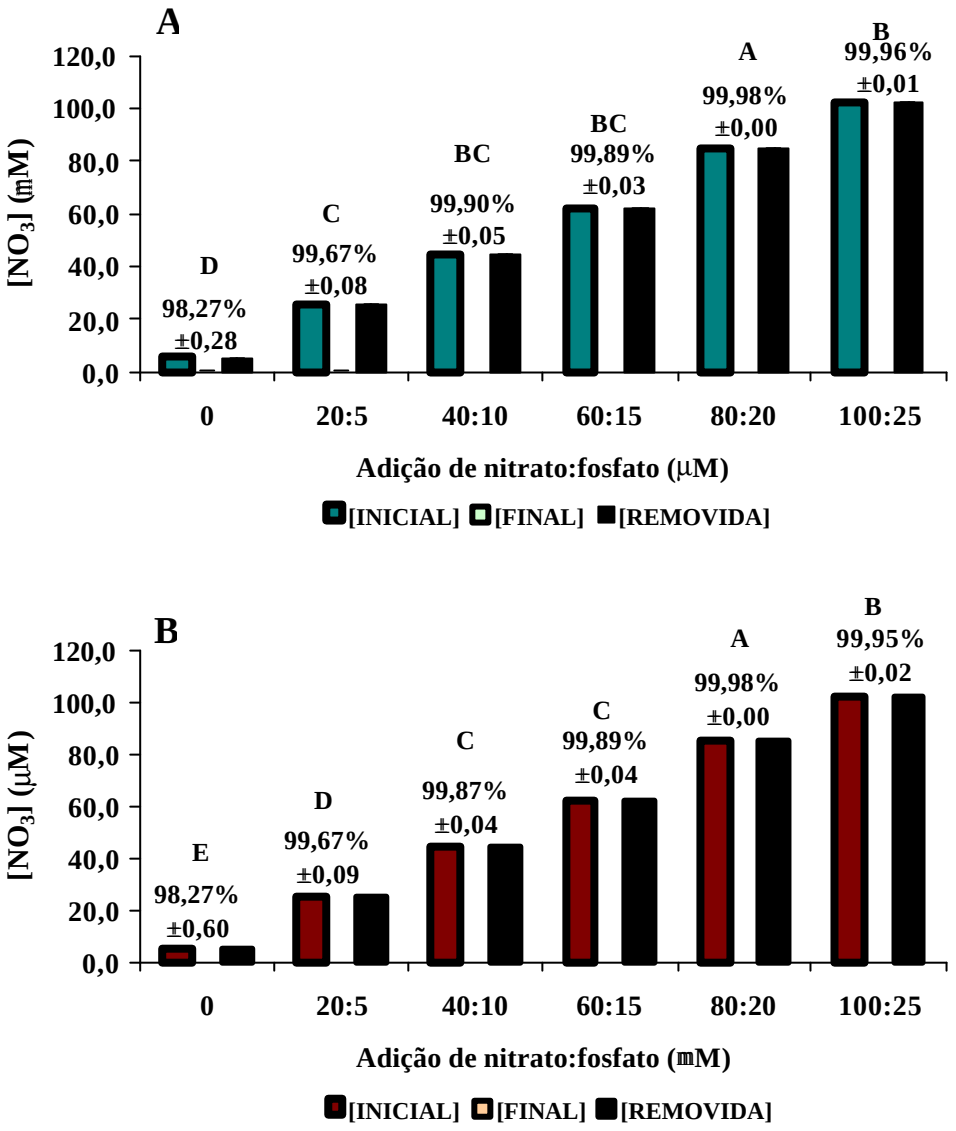

Figura 4.8. Concentrações iniciais e finais de nitrato presentes na água do mar (µM) e concentração de nitrato removida e porcentagens de remoção do nitrato apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato:fosfato. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as taxas de remoção, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

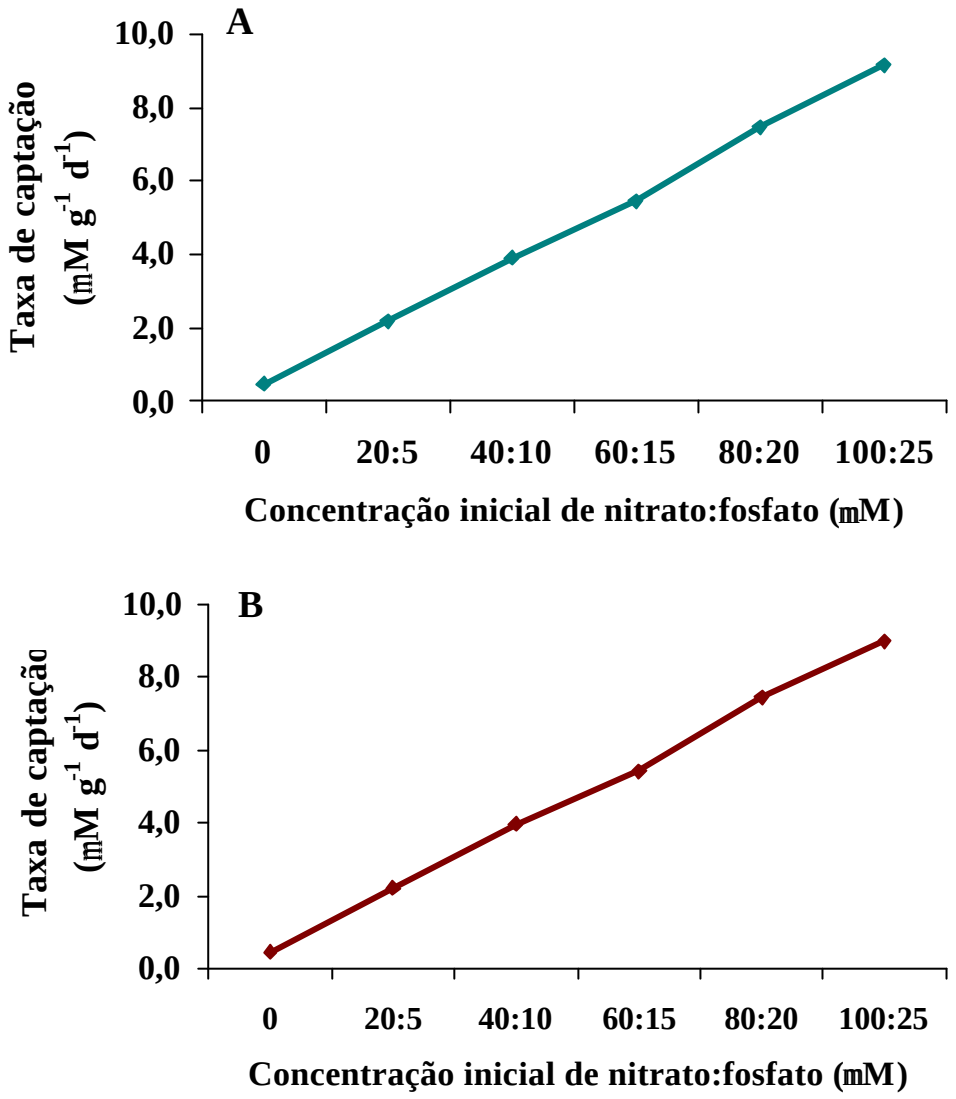

Figura 4.9. Taxas de captação do nitrato (µM g^{-1} d^{-1}) apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato:fosfato.

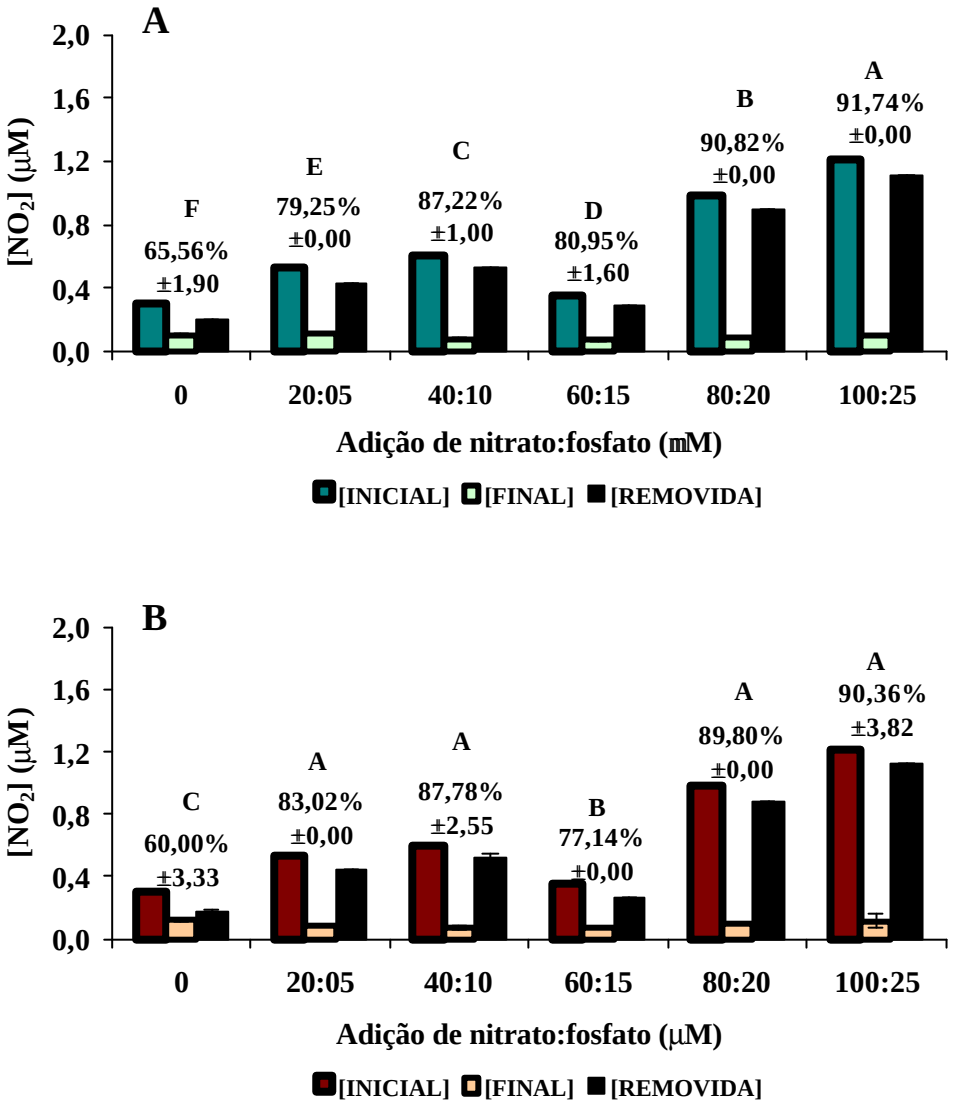

Figura 4.10. Concentrações iniciais e finais de nitrito presentes na água do mar (µM) e concentração de nitrito removida e porcentagens de remoção (%) do nitrito apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as taxas de remoção, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

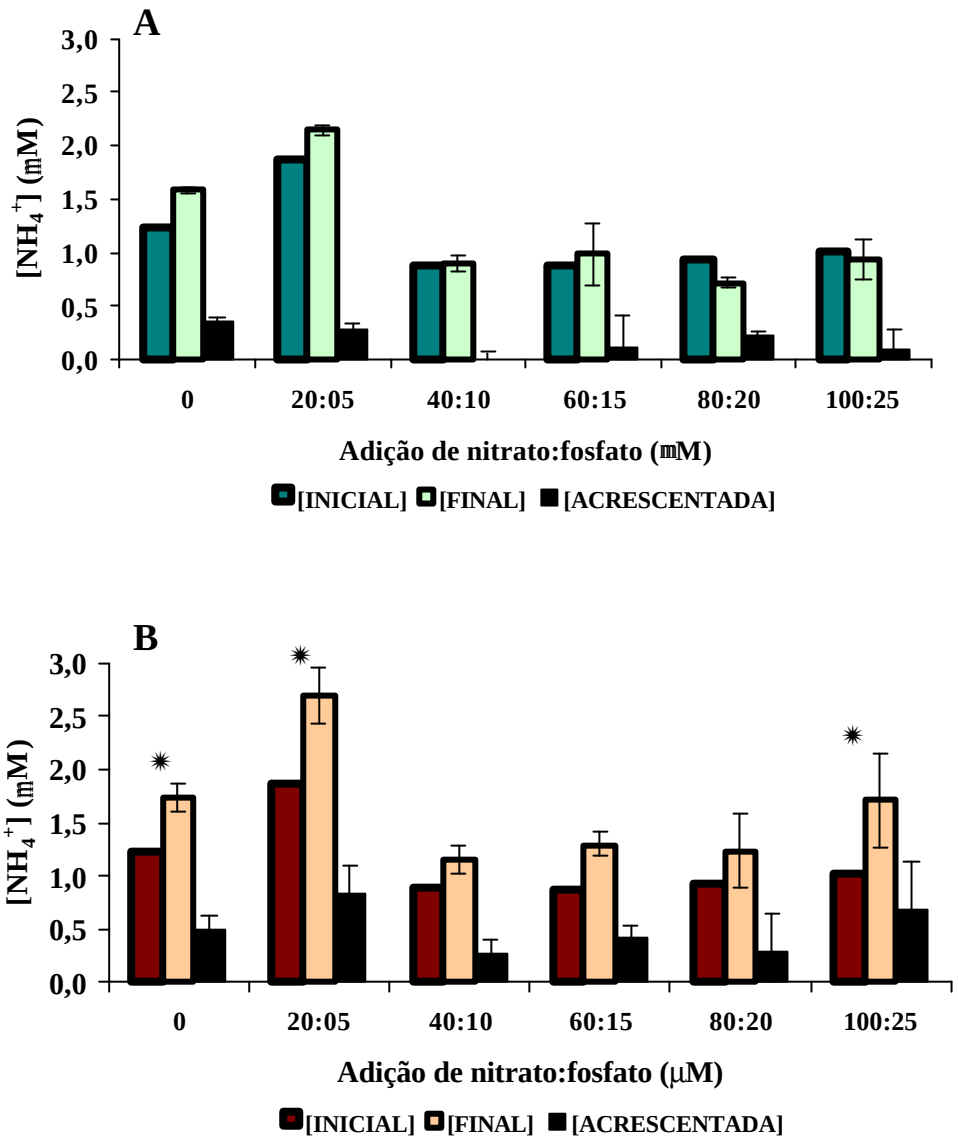

Figura 4.11. Concentrações iniciais e finais de amônio presentes na água do mar (µM) e concentração de amônio acrescentada na água do mar onde as linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis* foram cultivadas por uma semana, com diferentes concentrações de nitrato:fosfato. ✷ indica as diferenças significativas entre as concentrações iniciais e finais de amônio na água do mar, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

A linhagem VC apresentou maior (99,31 %) e menor (48,91%) porcentagem de remoção de fosfato nos tratamentos com 20:5 e 100:25 µM de nitrato:fosfato, respectivamente (figura 4.12 A). A linhagem MA também apresentou menor porcentagem de remoção (38,02%) em 100:25 µM de nitrato:fosfato. Porém a maior porcentagem ocorreu nos tratamentos controle e com 20:5 e 40:10 µM de nitrato:fosfato (figura 4.12 B). A remoção de fosfato da linhagem VC foi maior do que a MA nos tratamentos com 60:15, 80:20 e 100:25 µM de nitrato:fosfato. A captação de fosfato seguiu uma cinética de saturação, sendo que a taxa de captação de fosfato da linhagem VC saturou em 60:15 µM de nitrato:fosfato e da linhagem MA em 40:10 de nitrato:fosfato (figura 4.13).

Não houve diferença na concentração inicial de NOD na água do mar dos diferentes tratamentos testados, sendo que a média da concentração de NOD entre esses tratamentos foi de 2,63 ± 0,66 µM (figura 4.14 A e B). Para a linhagem VC, houve um incremento significativo na concentração final de NOD em todos os tratamentos testados, sendo que esta linhagem liberou mais NOD para o meio quando cultivada com 80:20 µM de nitrato:fosfato (figura 4.14 A). Já para a linhagem MA, houve um incremento significativo na concentração final de NOD apenas nos tratamentos com 20:5, 40:10, 80:20 e 100:25 µM de nitrato:fosfato, sendo que esta linhagem liberou mais NOD em 100:25 µM de nitrato:fosfato (figura 4.14 B). A linhagem MA liberou mais NOD do que a linhagem VC nos tratamentos com 20:5, 40:10, 80:20 e 100:25 µM de nitrato:fosfato.

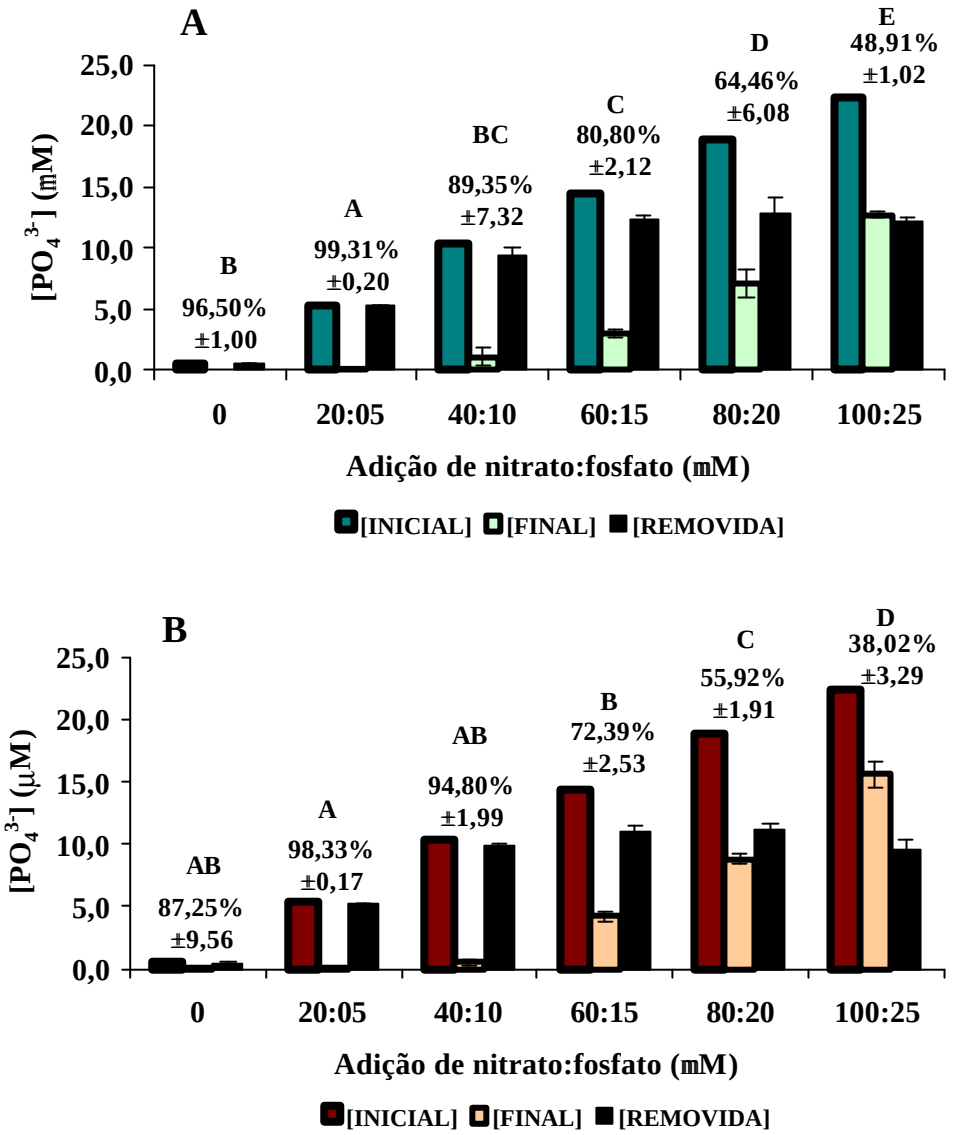

Figura 4.12. Concentrações iniciais e finais de fosfato presentes na água do mar (µM) e concentração de fosfato removida e porcentagens de remoção do fosfato apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato:fosfato. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as taxas de remoção, segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

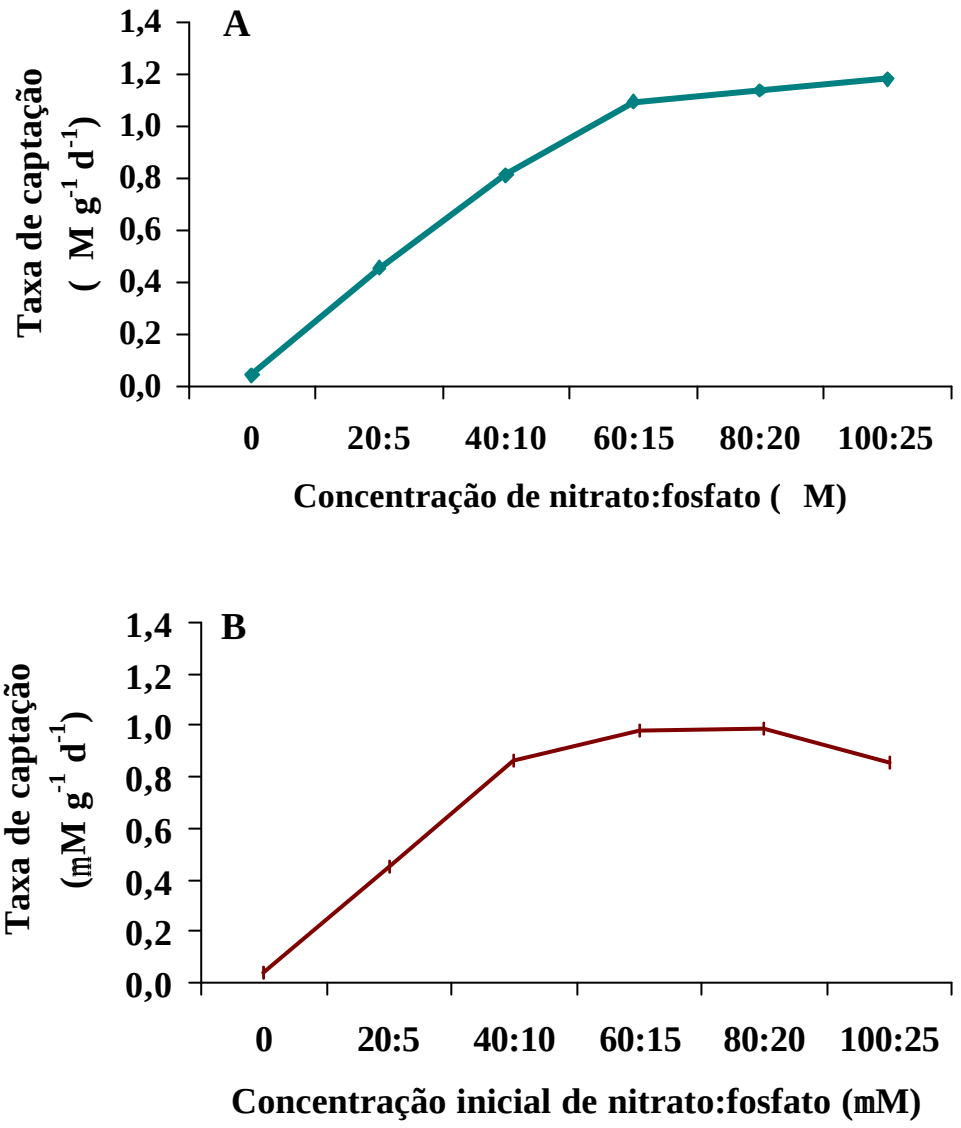

Figura 4.13. Taxas de captação do fosfato (µM g^{-1} d^{-1}) apresentadas pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato:fosfato.

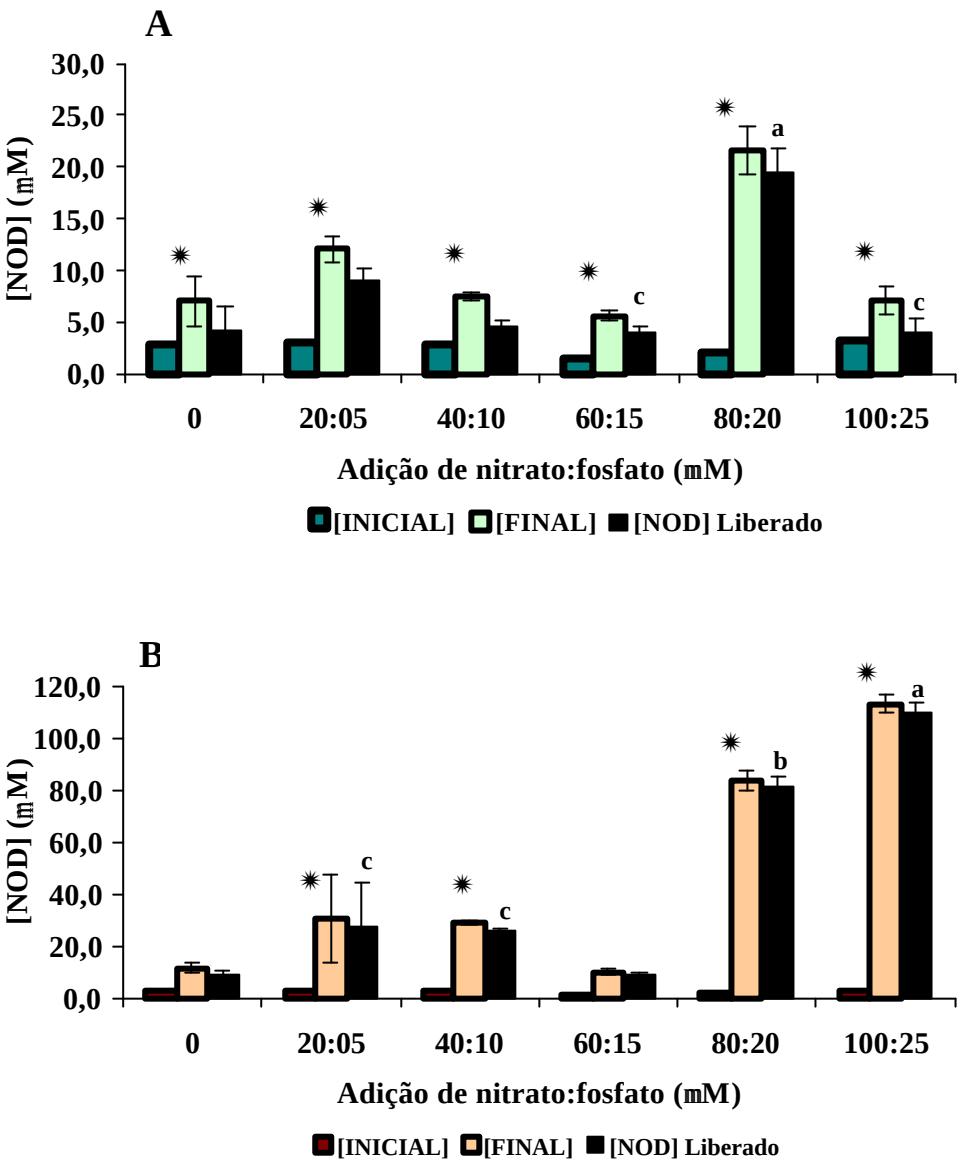

Figura 4.14. Concentrações iniciais e finais de nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) presentes na água do mar (µM) e concentração de NOD liberada pelas linhagens VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivadas por uma semana em água do mar enriquecida com diferentes concentrações de nitrato:fosfato. ✷ indica as diferenças significativas entre as concentrações iniciais e finais de NOD na água do mar. As letras distintas indicam as diferenças significativas entre as concentrações de NOD liberadas nos diferentes tratamentos, , segundo teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Para ambas as linhagens estudadas, houve correlação positiva entre concentração inicial de nitrato:fosfato e remoção de nitrato e nitrito do meio e captação de nitrato e fosfato. Para a linhagem MA, houve correlação positiva entre concentração inicial de nitrato e fosfato X liberação de NOD e concentração final de NOD no meio (tabela 4.4).

Tabela 4.4. Análise de correlação de Pearson das variáveis estudadas com a linhagem VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis* cultivada por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato:fosfato. Em cada célula da tabela, o primeiro valor corresponde ao coeficiente de correlação e o segundo valor ao valor de *p*. **Negrito**, correlação significativa.

A

Variáveis	Remoção NO_3^-	Captação NO_3^-	Remoção NO_2^-	Remoção PO_4^{3-}	Captação PO_4^{3-}	Liberação NOD
[Nitrato]	**0,744**	**1,00**	**0,867**	**-0,928**	**0,923**	0,272
	< 0,001	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	0,291
[Fosfato]	**0,764**	**0,100**	**0,884**	**-0,916**	**0,926**	0,265
	< 0,001	**0,013**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	0,303

B

Variáveis	Remoção NO_3^-	Captação NO_3^-	Remoção NO_2^-	Remoção PO_4^{3-}	Captação PO_4^{3-}	liberação NOD
[Nitrato]	**0,719**	**1,00**	**0,733**	**-0,878**	**0,820**	**0,804**
	< 0,001	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
[Fosfato]	**0,739**	**0,10**	**0,754**	**-0,858**	**0,824**	**0,775**
	< 0,001	**0,013**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**

Comparação entre os experimentos com adição de nitrato e com adição de nitrato:fosfato

Não houve diferença significativa na porcentagem de remoção de nitrato de ambas as linhagens, nos tratamentos com ou sem fosfato. A porcentagem de remoção de nitrito da linhagem VC cultivada em 20 e 100 μM de nitrato, foi maior nos tratamentos sem adição de fosfato. Porém, nos tratamentos com 40 e 60 μM de nitrato, ambas as linhagens apresentaram maiores porcentagens de remoção de nitrito nos meios com adição de fosfato (tabelas 4.5 A e B).

A porcentagem de remoção de fosfato da linhagem VC cultivada com 40 e 60 μM de nitrato foi maior nos meios com adição de fosfato. Para a linhagem MA, no tratamento com 40 μM de nitrato, a remoção de fosfato foi maior no meio com adição de fosfato, porém no tratamento com 100 μM de nitrato, a remoção foi maior no tratamento sem adição de fosfato (tabelas 4.5 A e B).

A linhagem MA liberou mais NOD nos tratamentos com adição de fosfato (tabelas 4.5 B).

Tabela 4.5. Comparação das porcentagens de remoção de nutrientes pela linhagem VC (A) e MA (B) de *Hypnea musciformis*, cultivada por 7 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e nitrato:fosfato (4:1). Os valores correspondem à média e desvio padrão de cada variável analisada. As células em negrito representam as diferenças significativas entre os meios testados (com ou sem fosfato).

A

Variáveis analisadas	**TRATAMENTOS (Nitrato:fosfato)**									
	20:0	**20:5**	**40:0**	**40:10**	**60:0**	**60:15**	**80:0**	**80:20**	**100:0**	**100:25**
Remoção NO_3^- (%)	99,77 ±0.12	99,67 ±0,08	99,82 ±0,08	99,90 ±0,05	99,85 ±0,05	99,89 ±0,03	99,96 ±0,02	99,98 ±0,00	99,96 ±0,02	99,96 ±0,01
Remoção NO_2^- (%)	**69,64 ±1,07**	**79,25 ±12.52**	**92,88 ±0,49**	**87,22 ±1,00**	**93,92 ±0,42**	**80,95 ±1,60**	90,61 ±0,52	90,82 ±0,00	**86,53 ±2,10**	**91,74 ±0,00**
Remoção PO_4^{3-} (%)	88,86 ±1,73	99,31 ±0,20	**60.40 ±9,95**	**89,35 ±7,32**	**54,98 ±10,52**	**80,80 ±2,12**	61,30 ±11,63	64,46 ±6,08	56,48 ±3,24	48,91 ±1,02
Liberação NOD (µM)	8,68 ±1,36	8,98 ±1,19	3,85 ±1,94	4,67 ±0,42	8,08 ±1,84	4,09 ±0,52	20,05 ±1,50	19,53 ±2,33	5,81 ±2,04	3,96 ±1,35

B

Variáveis analisadas	**TRATAMENTOS (Nitrato:fosfato)**									
	20:0	**20:5**	**40:0**	**40:10**	**60:0**	**60:15**	**80:0**	**80:20**	**100:0**	**100:25**
Remoção NO_3^- (%)	99,65 ±0,08	99,67 ±0,09	99,90 ±0,05	99,87 ±0,04	99,91 ±0,05	99,89 ±0,03	99,98 ±0,00	99,98 ±0,00	99,96 ±0,01	99,95 ±0,02
Remoção NO_2^- (%)	84,52 ±1,03	83,02 ±0,00	**93,16 ±0,00**	**87,78 ±2,55**	**94,89 ±0,00**	**77,14 ±0,00**	92,12 ±0,52	89,80 ±0,00	89,23 ±0,58	90,36 ±3,82
Remoção PO_4^{3-} (%)	87,70 ±2,65	98,33 ±0,17	**58,23 ±6,51**	**94,80 ±1,99**	59,03 ±9,28	72,39 ±2,53	58,76 ±15,23	55,92 ±1,91	**58,35 ±0,00**	**38,28 ±3,29**
Liberação NOD (µM)	**NS**	**36.85 ±5,21**	**NS**	**26,33 ±0,80**	NS	NS	**36,23 ±3,52**	**81,42 ±3,79**	**91,64 ±4,69**	**109,75 ±3,47**

Discussão

As porcentagens máximas de remoção de nitrato das linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. foram muito altas e maiores do que as porcentagens de remoção apresentadas por espécies de macroalgas cultivadas em sistemas integrados para avaliação do seu potencial de biofiltro (tabela 4.6). O mesmo foi observado para as porcentagens máximas de remoção de nitrito e fosfato. Entretanto, é importante ressaltar que os experimentos realizados com as linhagens VC e MA de *H. musciformis* foram realizados em laboratório, utilizando-se as condições ótimas, enquanto que os cultivos das espécies citadas na tabela foram realizados em tanques e/ou campo, o que pode explicar as maiores porcentagens de remoção apresentadas pelas linhagens VC e MA. Mas isso não descarta o potencial dessas linhagens para serem utilizadas em sistemas de cultivo integrado. Dessa forma, um aspecto de interesse para estudos futuros seria o cultivo das linhagens VC e MA de *H. musciformis* em tanques ou em campo com sistemas integrados, para constatar, além do potencial como biofiltro, as taxas de crescimento e a qualidade e o teor de carragenanas.

A porcentagem máxima de remoção de amônio das linhagens estudadas foi menor do que aquelas apresentadas pelas espécies citadas na tabela 4.6. Além disso, em muitos tratamentos testados, a remoção de amônio foi nula e, algumas vezes, observou-se o aumento da concentração desse nutriente no meio. Esse resultado não foi observado para *Hypnea musciformis* (Haines & Wheeler 1978), uma vez que a taxa de captação de amônio não foi saturada em altas concentrações. De fato, para muitas macroalgas a taxa de captação de amônio excede a de nitrato, uma vez que sua assimilação requer gastos energéticos menores do que a do nitrato e nitrito. Porém, em altas concentrações (>30-50 μM), o amônio pode ser tóxico (Lobban & Harrison 1994). Martins & Yokoya (2004) observaram que as linhagens VC e MA de *H. musciformis* apresentaram uma relação inversamente proporcional entre concentração de amônio e taxa de crescimento, e, após um mês, concentrações maiores e iguais a 15 μM foram letais para essas linhagens.

Tabela 4.6. Porcentagens de remoção de nutrientes (valores máximos) por algas atuando como biofiltros em cultivos integrados com diversos animais marinhos, segundo diferentes autores (apud Hayashi 2007)

Espécie	Tipo de cultivo	% remoção de nutrientes	Autores
Linhagem VC de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour.	Laboratório	99,98% de nitrato 93,92% de nitrito 38,88% de amônio 99,31% de fosfato	Presente estudo
Linhagem MA de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour.	Laboratório	99,98% de nitrato 94,89% de nitrito 44,16% de amônio 98,33% de fosfato	Presente estudo
Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty ex P.C. Silva	Integrado com peixes	18,20% de nitrato 50,84% de nitrito 70,54% de amônio 26,76% de fosfato	Hayashi (2007)
Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty ex P. C. Silva	Integrado com ostras	66,0% de nitrato 83,4% de nitrito 79,8% de amônio	Qian *et al.* (1996)
Gracilariopsis longíssima (S.G.Gmelin) M. Steentoft L.M. Irvine & W.F. Farnham	Integrado com peixes	60% de amônio 19,4% de fosfato	Hernández *et al.* (2005)
Enteromorpha intestinalis Linnaeus (Chlorophyta)	Integrado com peixes	81,1% de amônio 91,6% fosfato	Hernández *et al.* (2002) Martinnez-Aragon *et al.* (2002)
Ulva rotundata Bliding	Integrado com peixes	83,4% de amônio 96,2% de fosfato	Hernández *et al.* (2002) Martinnez-Aragon *et al.* (2002)

Nas condições experimentais adotadas no presente estudo, houve um incremento linear na taxa de captação do nitrato pelas linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis*. Entretanto, para a maioria das macroalgas, a captação do nitrato segue uma cinética de saturação, como foi observado para *Hypnea musciformis* e *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (Haines & Wheeler 1978), *Laurencia brongniartii* J. Agardh (Nishihara *et al.* 2005) *e Laminaria abyssalis* Joly et Oliveira Filho (Braga & Yoneshigue-Valentin 1996). As concentrações testadas no presente estudo variaram de zero a 100 µM de nitrato. Talvez em concentrações maiores a essa, a saturação ocorra.

Entretanto, Nishihara *et al*. (2005) testou concentrações variando de zero a 300 μM de nitrato e a saturação ocorreu em valores menores a 100 μM.

A captação de fosfato seguiu uma cinética de saturação, sendo que para a linhagem VC de *Hypnea musciformis* houve saturação na concentração de 60:15 μM de nitrato:fosfato e para a linhagem MA em 40:10 μM de nitrato:fosfato. Em 100:25 μM de nitrato:fosfato houve um decréscimo na taxa de captação do fosfato da linhagem MA. A espécie *Laminaria abyssalis* (Braga & Yoneshigue-Valentin 1996) apresentou uma cinética de saturação na captação do fosfato, entretanto, para *Palmaria palmata* (L.) Kuntze, a captação do fósforo inorgânico (ortofosfato, de 0,23 a 36,02 μM) não apresentou uma cinética de saturação (Martinez & Rico 2004).

As linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* liberaram grandes quantidades de NOD para o meio, sendo que essa liberação foi maior nas concentrações de 80 (≅ 20 μM de NOD) e 100 (≅ 100 μM de NOD) μM de nitrato, respectivamente, nos tratamentos com e sem adição de fosfato. A adição de fosfato no meio ocasionou maior liberação de NOD na linhagem MA. Dessa forma, apesar das linhagens VC e MA terem removido todo o nitrato do meio, elas não conseguiram assimilá-lo e estocá-lo completamente, uma vez que boa parte desse nitrato removido foi devolvido ao meio na forma de NOD. Tyler & McGlathery (2004) observaram que a taxa de liberação de N de *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss correspondeu a 67% da captação bruta diária, e a liberação foi maior quando as taxas de crescimento e a disponibilidade de nutrientes estavam baixas, possivelmente devido à senescência das algas. Para o fitoplâncton, a magnitude de liberação de N é proporcional ao gradiente de concentração entre o meio (água do mar) e o interior da célula, com alta taxa de liberação estimulada por baixas concentrações de nitrogênio na coluna d'água (Flynn & Berry 1999, apud Tyler & McGlathery 2004). A liberação de substancias orgânicas também pode ser interpretada como liberação ativa do excesso de produtos acumulados da fotossíntese, quando a fixação de carbono excede a incorporação de novos materiais pelas células (Fogg 1983).

As substâncias liberadas pelas macroalgas podem ser aminoácidos livres (Naldi & Wheeler 2002) ou combinados, como peptídeos ou proteínas (Tyler & McGlatery, 2006). A liberação de substâncias orgânicas pode promover o epifitismo, por exemplo, exsudatos de *Gracilaria chilensis* promoveram o estabelecimento de propágulos de *Ulva* e *Enteromorpha* (Santelices & Varela 1993). Dessa forma, um aspecto para estudos futuros seria a realização de experimentos para verificar se o exsudato produzido pelas linhagens VC e MA de *H. musciformis* promove o crescimento de outros organismos associados, como epífitas ou algas utilizadas como substrato, como é o caso de *Sargassum*, substrato onde *H. musciformis* é frequentemente encontrada na natureza.

Dessa forma, o presente trabalho mostra que as linhagens VC e MA de *Hypnea musciformis* são eficientes em remover o nitrogênio e o fósforo da água do mar em concentrações de até 60 μM, uma vez que a partir dessa concentração grande parte do nitrato removido é liberado ao meio como NOD. Esses resultados indicam que as linhagens estudadas apresentam um grande potencial como biofiltros.

Referências Bibliográficas

Armstrong, F.A., Williams, P.M. & Strickland, J.D.H. 1966. Photooxidation of organic matter in sea water by ultraviolet radiation, analytical and other applications. Nature 211: 463-481.

Bird, K.T., Habig, C. & Debusk, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). Journal of Phycology 18: 344-348.

Braga, E.S. 2002. Bioquímica marinha: efeitos da poluição nos processos bioquímicos. 2ed. FUNDESPA, São Paulo, 108p.

Braga, A.C. & Yoneshigue-Valentin, Y. 1996. Nitrogen and phosphorus uptake by the Brazilian kelp *Laminaria abyssalis* (Phaeophyta) in culture. Hydrobiologia 326/327: 445-450.

Conley, D.J. 2000. Biogeochemical nutrient cycles and nutrient management strategies. Hydrobiologia 410: 87-96.

Dawes, C. J. & Koch, E.W. 1990. Physiological responses of the red algae *Gracilaria verrucosa* and *G. Tikvahiae* before and after nutrient enrichment. Bulletin of Marine Science 46: 335-344.

Deboer, J.A. 1981. Nutrients. *In:* C.S. Lobban & M.J. Wynne (eds.). The Biology of Seaweeds Blackwell Scientific, Oxford, p.91-356.

Flynn, K.J. & Berry, L.S. 1999. Te loss of organic nitrogen during marine primary production may be significantly overestimated when using N-15 substrates. Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. 266: 641-647.

Fogg, G.E. 1983. The ecological significance of extracelular products of phytoplankton photosynthesis. Botanica Marina 26: 3-14.

Grasshoff, K., Enhardt, M. & Kremling, K 1983. Methods of Sea Water Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, 419p.

Haines, K.C. & Wheeler, P.A. 1978. Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) and *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). Journal of Phycology 14: 319-324.

Hanisak, M.D. 1990. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. Hydrobiologia 204/205:79-87.

Hayashi, L. 2007. Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragenana. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 100 p.

Hernández, I., Martinez-Aragon, J.F., Tovar, A., Pérez-Lloréns, J.L. & Vergara, J.J. 2002. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters. 2. Ammonium. Journal of Applied Phycology 14: 375-384.

Hernández, I., Fernández-Engo, M.A., Pérez-Lloréns, J.L. & Vergara, J.J. 2005. Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus aurata* waste waters. Journal of Applied Phycology 17: 557-567.

Jensen, A. 1993. Present and future needs for algae and algal products. Hydrobiologia 260/261: 15-23.

Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 366 p.

Martins, A.P. & Yokoya, N.S. 2004. Influência do nitrogênio em diferentes meios de cultura no desenvolvimento de morfos pigmentares de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *In:* C.W.N., Moura (eds). X Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia: livro de resumos. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

Martinez-Aragón, J.F., Hernández, I., Pérez-Lloréns, J.L., Vásquez, R. & Vergara, J.J. 2002. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters 1. Phosphate. Journal of Applied Phycology 14: 365-374.

Martinez, B. & Rico, J.M. 2004. Inorganic nitrogen and phosphorus uptake kinetics in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). Journal of Phycology 40: 642-650.

Naldi, M. & Wheeler, P.A. 2002. N-15 measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrada* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta): comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and N-15 accumulation in algal tissue. Journal of Phycology 38: 135-144.

Nishihara, G.N., Terada, R. & Noro, T. 2005. Effect of temperature and irradiance on the uptake of ammonium and nitrate by *Laurencia brongniartii* (Rhodophyta, Ceramiales). Journal of Applied Phycology 17: 371–377.

Qian, P.Y., Wu, C.Y., Wu, M. & Xie, Y.K. 1996. Integrated cultivation of the red alga *Kappaphycus alvarezii* and the pearl oyster *Pinctada martensi*. Aquaculture 147: 21-35.

Rosenberg, G & Ramus, J. 1982. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates. Marine Biology 66: 251-259.

Santelices, B. & Varela, D. 1993. Exudates from *Gracilaria chilensis* stimulate settlement of epiphytic ulvoids. Hydrobiologia 260/261: 327-333.

Strickland J.D.H & Parsons, T.R. 1972. A pratical handbook of seawater. Fisheries Research Board, Canada, Bulletin n° 167, 311 p.

Tyler, A.C. & McGlathery, K.J. & Anderson, I. C. 2001. Macroalgal mediation of dissolved organic nitrogen fluxes in a temperate coastal lagoon. Estuarine Coastal Shelf Science 53: 155-168.

Tyler, A.C. & McGlathery, K.J. 2006. Uptake and release of nitrogen by the macroalga *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta). Journal of Phycology 42: 515-525.

Tyrrell, T. 1999. The relative influence of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. Nature 400:525-531.

Wheeler, W.N. & Weidner, M. 1983. Effects of external inorganic nitrogen concentration on metabolism, growth and activities of key carbon and nitrogen assimilating enzymes of *Laminaria saccharina* (Phaeophyceae) in culture. Journal of Phycology 19: 92-96.

DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. é um importante recurso marinho por ser a maior fonte de *k*-carragenana (Oliveira 1998), um polissacarídeo sulfatado muito utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Em 2004, o Brasil já consumia 100 toneladas de carragenana por mês e produzia 10 toneladas por mês a partir de bancos naturais de *H. musciformis* da região nordeste do país (Furtado 2004). Devido a essa crescente demanda, os bancos naturais dessa espécie estão sendo degradados, comprometendo os estoques naturais.

O estudo com variantes pigmentares é uma importante ferramenta para o conhecimento da fisiologia e biologia das macroalgas marinhas, e também nos permite selecionar linhagens com melhor crescimento e produtividade para o cultivo.

Uma vez que o conhecimento das relações entre o nitrogênio e as algas é de extrema importância para o sucesso do seu cultivo (Hanisak 1990), o presente estudo teve como objetivo geral ampliar o conhecimento sobre o metabolismo de nitrogênio em rodofíceas marinhas, avaliando o comportamento das linhagens marrom (MA) e verde-clara (VC) de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. Para tal finalidade, foram realizados experimentos visando a otimização do ensaio *in vitro* da enzima nitrato redutase para as duas linhagens; e a avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de nitrato e fosfato na assimilação do nitrogênio, nas taxas fotossintéticas, no crescimento e na captação e remoção de nitrogênio e fósforo, e liberação de nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) pelas linhagens de cor de *H. musciformis*. Além disso, foram avaliados os efeitos do estado nutricional das algas no metabolismo do nitrogênio.

Considerando que os resultados obtidos são limitados pelas condições experimentais adotadas, apresentamos, a seguir, as principais conclusões e considerações resultantes do presente estudo.

Otimização do ensaio "*in vitro*" da nitrato redutase

Considera-se que a nitrato redutase (NR) controla a taxa de assimilação do nitrato, constituindo um fator limitante para o crescimento, desenvolvimento e produção de proteínas (Solomonson & Barber 1990). Os ensaios para a otimização do ensaio da NR são fundamentais para o estudo da enzima, uma vez que os protocolos não são igualmente eficientes para medir a atividade da NR nas diferentes espécies de macroalgas marinhas (Chow *et al*. 2004). Os resultados apresentados no presente trabalho evidenciam a importância da otimização do protocolo para o ensaio *in vitro* da NR, uma vez que a NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis* apresentaram diferentes características quando comparadas com outras espécies. Por exemplo, a NR da linhagem VC de *H. musciformis* apresentou menor afinidade pelo substrato do que a enzima da linhagem MA e de outras algas. Por outro lado, a NR da linhagem MA possui maior afinidade pelo substrato do que a enzima de outras espécies citadas na literatura. Não foram encontrados, na literatura brasileira, estudos sobre a NR de *Hypnea musciformis*. Dessa forma, o presente trabalho contribui para o conhecimento da fisiologia dessa espécie, e para as duas linhagens de cor de *H. musciformis*, que são utilizadas como um modelo biológico para os estudos realizados pelo grupo de pesquisa da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica.

Efeitos da disponibilidade do nitrato e do fosfato no metabolismo do nitrogênio nas variantes pigmentares de *Hypnea musciformis*

O estudo dos efeitos da disponibilidade do nitrato e do fosfato no metabolismo do nitrogênio nas linhagens de cor de *Hypnea musciformis* ajudou a compreender alguns pontos-chave da fisiologia desses espécimes.

O nitrato e o fosfato são importantes nutrientes para o desenvolvimento das linhagens estudadas, uma vez que influenciaram, diferentemente, o metabolismo do nitrogênio. Os resultados obtidos com algas com limitação interna de nutrientes evidenciaram diferenças entre as linhagens de cor de *H. musciformis* quanto ao metabolismo de assimilação do nitrogênio: com a adição de

nitrato, a linhagem VC armazenou nitrogênio principalmente na forma de proteínas e a linhagem MA na forma de proteínas e de pigmentos (FC e FE). Com adição de N:P, a linhagem VC também armazenou o nitrogênio na forma de pigmentos (AFC, FC e Cl*a*) e a linhagem MA na forma de Cl*a*. Além disso, a respiração da linhagem VC aumentou com o incremento de nitrato no meio enquanto que a linhagem MA apresentou aumento na fotossíntese. Os espécimes sem limitação interna de nitrogênio apresentaram maiores valores de TC e de conteúdo de proteínas do que os espécimes com limitação interna de nitrogênio, indicando que as linhagens cultivadas por duas semanas em água do mar sem adição de nutrientes não conseguem restabelecer seu estoque interno de nitrogênio e os seus processos fisiológicos, mesmo após serem cultivadas por um mês em meio enriquecido com nitrato.

As diferenças metabólicas entre as linhagens estudadas quanto à assimilação do nitrato também estão relacionados à enzima nitrato redutase da linhagem VC, uma variante deficiente em ficoeritrina. Ao passar por um período de limitação de nitrogênio, a NR da linhagem VC é estimulada quando este nutriente se torna disponível, sugerindo que essa variante possui mecanismos que possibilitam absorver rapidamente os nutrientes, quando estes se tornam disponíveis. Os resultados do presente estudo também corroboram a hipótese de que fosfato estimula a atividade da NR (Nicholas & Scawin 1956, Huber *et al*. 1994). Os resultados referentes à respiração e à fotossíntese sugerem que as linhagens VC e MA de *H. musciformis* apresentam diferenças quanto à origem da fonte de carbono necessária para a assimilação do nitrogênio, sendo que a fonte de carbono da linhagem VC provém da respiração, e a da linhagem MA da fotossíntese. Esses dados indicam que a linhagem MA pode fixar mais carbono fotossintético do que a linhagem VC.

Ao estudar a remoção e liberação de nitrogênio na água do mar, observou-se que a linhagem MA libera grandes quantidades de nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) quando cultivada com altas concentrações de nitrato (80 e 100 µM de nitrato, com e sem adição de fosfato, respectivamente). A fotossíntese dessa linhagem também foi maior nesses tratamentos. Para o

fitoplâncton marinho, a liberação de substâncias orgânicas também pode ser interpretada como liberação ativa do excesso de produtos da fotossíntese acumulados, quando a fixação de carbono excede a incorporação de novos materiais pelas células (Fogg 1983). Esses dados corroboram a hipótese de que a linhagem MA de *H. musciformis* fixa mais carbono fotossintético do que a linhagem VC. Porém, o presente trabalho não contemplou o estudo do metabolismo do carbono. Entretanto, como os resultados indicam que as linhagens estudadas possuem diferenças quanto ao metabolismo do carbono, um aspecto interessante para estudos futuros seria a avaliação dessas diferenças para ajudar na compreensão dos processos metabólicos como um todo.

As linhagens VC e MA de *H. musciformis* foram eficientes na remoção de nitrogênio e de fósforo da água do mar. Essas respostas também merecem estudos mais amplos, com cultivos em tanques ou em campo com sistemas integrados, para avaliar o potencial dessas linhagens como biofiltro, bem como as taxas de crescimento e a qualidade e teor de carragenanas produzidas por essas linhagens.

No Brasil, o estudo da liberação de NOD por uma macroalga marinha é pioneiro, e os resultados mostram a sua importância na compreensão do metabolismo do nitrogênio, uma vez que, em determinadas condições, as algas não conseguem armazenar e converter em produtos de reserva todo o nitrogênio que absorvem do meio. A liberação de NOD por macroalgas marinhas merece estudos mais detalhados, primeiramente, quanto à sua ocorrência, aos fatores que influenciam a sua liberação e quanto à identificação dos compostos nitrogenados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berchez, F.A.S. & Oliveira, E.C. 1989. Maricultural essays with the carrageenophyte *Hypnea musciformis* in São Paulo, Brazil. *In*: E.C. Oliveira & N. Kautsky (eds.). Cultivation of Seaweeds in Latin America. Universidade de São Paulo, São Paulo, pp.89-94.

Berchez, F.A.S., Pereira, R.T.L. & Kamiya, N.F. 1993. Culture of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta - Gigartinales) on artificial substrates attached to linear ropes. Hydrobiologia 260/261:415-420.

Berges, J.A. 1997. Algal nitrate reductases. European Journal of Phycology 32: 3-8.

Bird, K.T., Habig, C. & Debusk, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). Journal of Phycology 18: 344-348.

Chiang, Y-M. & Lin, J-L. 1989. Nitrate uptake by nitrogen-starved plants of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. Liui. Japanese Journal of Phycology 37: 187-193.

Chopin, T., Gallant, T. & Davison, I. 1995. Phosphorus and nitrogen nutrition in *Chondrus crispus* (Rhodophyta): Effects on total phosphorus and nitrogen content, carrageenan production and photosynthetic pigments. Journal of Phycology 31: 283-293.

Chopin, T. & Wagey, B.T. 1999. Factorial study of the effects of phosphorus and nitrogen enrichments on nutrient and carrageenan content in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and on residual nutrient concentration in seawater. Botanica Marina 42: 23-31.

Chow, F.F. 2002. Atividade *in vitro* e regulação da enzima nitrato redutase na alga vermelha *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 136 p.

Chow, F.F., Oliveira, M.C. & Pedersen, M. 2004. *In vitro* assay and light regulation of nitrate reductase in the red alga *Gracilaria chilensis*. Journal of Plant Physiology 161: 769–776.

Deboer, J.A. 1981. Nutrients. *In:* C.S. Lobban & M.J. Wynne (eds.). The Biology of Seaweeds. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 91-356.

D'Elia, C.F. & Deboer, J.A. 1978. Nutritional studies of two red algae. II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake. Journal of Phycology 14: 226-272.

Edwards, P. 1970. Illustrated guide to the seaweeds and seagrass in the vicinity of Porto Aransas, Texas. Contributions to Marine Science, University of Texas, Austin 15: 1-228.

Faccini, A.L. & Berchez, F. 2000. Management of natural beds and standing stock evaluation of *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta) in south-eastern Brazil. Journal of Applied Phycology 12: 101–103.

Fogg, G.E. 1983. The ecological significance of extracelular products of phytoplankton photosynthesis. Botanica Marina 26: 3-14.

Friedlander, M. & Levy, I. 1995. Cultivation of *Gracilaria* in outdoor tanks and ponds. Journal of Applied Phycology 7: 315–324.

Fujita, R.M. 1985. The role of nitrogen status in regulating transient ammonium uptake and nitrogen storage by macroalgae. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 92: 283-301.

Furtado, M.R. 1999. Alta lucratividade atrai investimento – Hidrocolóides. Química e Derivados 377: 20-29.

Furtado, M.R. 2004. Desequilíbrio climático abre mercado para novos hidrocolóides. Química e Derivados 430: 1-4.

Gerung, G.S. & Ohno, M. 1997. Growth rates of *Eucheuma denticulatum* (Burman) Collins et Harvey and *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty under different conditions in warm waters of Southern Japan. Journal of Applied Phycology 9: 413-415.

Hanisak, M.D. 1990. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. Hydrobiologia 204/205: 79-87.

Harrison, P.J., Druehl, L.D., Lloyd, K.E. & Thompson, P.A. 1986. Nitrogen uptake kinetics in three year-classes of *Laminaria groelandica* (Laminariales: Phaeophyta). Marine Biology 93: 29-35.

Huber, S.C., Huber, J.L. & Kaiser, W.M. 1994. Differential response of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase-activation to inorganic and organic salts, in vitro and in situ. Physiologia Plantarum 92: 302-310.

Kursar, T.A., Van Der Meer, J. & Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. Plant Physiology 73: 353-360.

Lavery, P.S. & Mccomb, A.J. 1991. The nutritional eco-physiology of *Chaetomorpha linum* and *Ulva rigida* in Peel Inlet, Western Australia. Botanica Marina 34: 251-260.

Lea, P.J. 1993. Nitrogen Metabolism. *In*: P.J. Lea & R.C. Leegood (eds.). Plant biochemestry and molecular biology. John Wiley & Sons Ltd, pp. 155-180.

Lobban, C.S. & Harrison, P.J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 366p.

Masuda, M., Yamagishi, Y., Chiang, Y.M., Lewmanomont, K. & Xi, B. 1997. Overview of *Hypnea* (Rhodophyta, Hypneaceae). *In:* I.A. Abbott (ed.). Taxonomy of Economic Seaweeds. California Sea Grant College System, La Jolla, v. 6, pp. 127-133.

Mackintosh, C. 1998. Regulation of plant nitrate assimilation: from ecophysiology to brain proteins. New Phytologist 139: 153-159.

Mercado, J.M., Javier, F., Gordillo, L., Niell, F.X. & Figueroa, F.L. 1999. Effects of different levels of CO_2 on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticta.* Journal of Applied Phycology 11: 455–461.

Nagano, C.S., Moreno, F.B.M.B., Bloch, C., Prates, M.V., Calvete, J.J., Saker-Sampaio, S., Farias, W.R.L., Tavares, T.D., Nascimento, K.S., Grangeiro, T.B., Cavada, B.S. & Sampaio, A.H. 2002. Purification and characterization of lectins from the red marine alga *Hypnea musciformis*. Protein and Peptide Letters 9: 159-165.

Navarro-Ângulo, L. & Robledo, D. 1999. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. Hydrobiologia 398/399: 315–320.

Neushul, M. 1990. Antiviral carbohydrates from marine red algae. Hidrobiologia 204/205: 99-104.

Nicholas, D.J.D & Scawin, J.H. 1956. A phosphate requirement for nitrate reductase from *Neurospora crassa*. Nature 178: 1474-1475.

Nishihara, G.N., Terada, R. & Noro, T. 2005. Effect of temperature and irradiance on the uptake of ammonium and nitrate by *Laurencia brongniartii* (Rhodophyta, Ceramiales). Journal of Applied Phycology 17: 371–377.

Nunes, J.M.C. 2005. Rodofíceas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 410p.

Oliveira, E.C. 1998. The seaweed resources of Brazil. *In*: A.T. Crithcley & M. Ohno (eds.). Seaweeds Resources of the World. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, pp. 366-371.

Plastino, E.M. 2004. Diversidade intraespecífica em algas gracilarióides. Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo. 48p.

Phillips, J.C. & Hurd, C.L. 2004. Kinetcs of nitrate, ammoniun, and urea uptake by four intertidal seaweeds from New Zealand. Journal of Phycology 40: 534-545.

Ramos, M.B., Alves, J.P. & Yokoya, N.S. 2006. Variação temporal da biomassa, do teor de carragenana e da flora associada a populações de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) da Praia da Enseada das Garças, Fundão, ES. *In*: Livro de resumos do XI Congresso Brasileiro de Ficologia, Sociedade Brasileira de Ficologia, Salvador, pp. 204.

Reis, R.P., Leal, M.C.R., Yoneshigue-Valentin, Y. & Belluco, R. 2003. Efeito de fatores bióticos no crescimento de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta - Gigartinales). Acta Botanica Brasilica 17: 279-286.

Rosenberg, G. & Ramus, J. 1982. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates. Marine Biology 66: 251-259.

Schenkman, R.P.F. 1986. Cultura de *Hypnea* (Rhodophyta) *in vitro* como subsídio para estudos morfológicos, reprodutivos e taxonômicos. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 81p.

Schenkman, R.P.F. 1989. *Hypnea musciformis* (Rhodophyta): ecological influence on growth. Journal of Phycology 25: 192-196.

Smit, A.J. 2002. Nitrogen uptake by *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta): Adaptations to a temporally variable nitrogen environment. Botanica Marina 45: 196–209.

Solomonson, L. P. & Barber, M. J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41: 225-253.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.

Thomas, T.E., Harrison, P.J. & Turpin, D.H. 1987. Adaptations of *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) to nitrogen procurement at different intertidal locations. Marine Biology 93: 569-580.

Turpin, D.H. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. Journal of Phycology 27: 14-20.

Tyrrell, T. 1999. The relative influence of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. Nature 400: 525-531.

Yokoya, N.S. 1996. Controle do desenvolvimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodofíceas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 202p.

Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C. 1992a. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. Journal of Applied Phycology 4: 339-345.

Yokoya, N.S. & Oliveira, E.C. 1992b. Effects of salinity on the growth rate, morpholog and water content of some Brazilian red algae of economic importance. Ciencias Marina 18: 49-64.

Yokoya, N.S., Plastino, E.M. & Artel, R. 2003. Physiological responses and pigment characterization of two colour strains of the carrageenophyte *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *In*: A.R.O. Chapman, R.J. Anderson, V.J. Vreeland & I.R. Dawison (eds.). Proceedings of the XVIIth International Seaweed Symposium. Oxford University Press Inc., New York, pp. 425-433.

Wheeler, W.N. & Weidner, M. 1983. Effects of external inorganic nitrogen concentration on metabolism, growth and activities of key carbon and nitrogen assimilating enzymes of *Laminaria saccharina* (Phaeophyceae) in culture. Journal of Phycology 19: 92-96.