

**INFLUÈNCIA DEL NITROGEN EN EL MEDI
SOBRE LES FORMES DE CREIXEMENT DE NOSTOC**

Comunicació presentada el dia 18 de maig de 1972 pel doctor

FERRAN VALLESPINÓS i RIERA

Departament d'Ecologia de la Facultat de Ciències
de la Universitat de Barcelona

INTRODUCCIÓ

Les cianofícies, dins el món viu, tenen una posició molt peculiar, puix que, per la seva estructura procariota, produir toxines, alliberar al medi composts orgànics —àdhuc la vitamina B₁₂—, la capacitat d'infecció pels virus anomenats cianòfags (PADAN, 1969; ¹¹ SHILO, 1971; ¹³ SAFFERMAN, 1972), ¹² fa que tinguin fortes semblances amb els bacteris. I dins les cianofícies, la fixació de nitrogen, fora d'algunes excepcions encara poc clares, només ha estat descrita en les espècies que tenen heterocists (FOGG, 1955; ⁵ STEWART, 1967).¹⁴

Com una prova de la capacitat de les cianofícies d'adaptar-se als canvis del medi, en el present treball han estat estudiades les modificacions produïdes en una soca de *Nostoc muscorum* en variar les seves fonts de nitrogen, emprant unes vegades el nitrogen atmosfèric i les altres uns gradients amb diverses concentracions de nitrogen combinat.

Els resultats obtinguts fan sospitar que el paper de les cianofícies en els cicles del carboni, del nitrogen i potser fins i tot del sofre dins les aigües continentals ha d'ésser important, i més si tenim en compte el procés de distròfia a què tendeixen moltes d'elles.

MATERIAL I MÈTODES

Tots els estudis han estat fets amb una soca de *Nostoc muscorum* isolada en el laboratori a partir d'una colònia que sorgí en un cultiu sobre medi sòlid d'una mostra d'aigua dolça.

L'obtenció de cultius unialgals no és pas gens senzilla, i menys en les algues filamentoses en les quals amb molta freqüència hi ha un gran nombre d'epífits. Però és possible de seleccionar les cianofícies per la temperatura ja que M. ALLEN i R. STANIER (1968)¹ demostraren que totes les soques de cianofícies provades per ells creixeren bé a 35° C, i un parell fins i tot a 45° C. Hem comprovat que la temperatura és un bon mitjà de selecció per a eliminar les algues eucariotes: espècies de *Nostoc* i *Anabaena* es desenvolupen bé a 35° C encara que *Oscillatoria* no hi creix. Així, doncs, el creixement a 35° C és un bon mètode per a con-

servar unialgals els cultius de *Nostoc muscorum*. Fins ara no hem provat d'obtenir cultius purs eliminant els bacteris.

Hom fa créixer la soca en el medi de HUGHES, GORHAN i ZEHAR (1955),⁸ a 35° C, il·luminada contínuament amb llum blanca de fluorescent.

NOMBRE DE CÈL·LULES ENTRE HETEROCISTS

Nostoc muscorum

TAULA I. — Variació en el nombre de cèl·lules entre els heterocists, en les diverses concentracions i al llarg dels dies. Hom pot veure com a la concentració de 100 mg/l de nitrat, on inicialment no hi havia heterocists, comencen a sortir-ne al cap de tres setmanes.

	0	5	10	20	30	100	1500 *
14/III/72	11,8 ± 0,7	6,6 ± 2,8	11,6 ± 0,7	16,3 ± 0,4	17,5 ± 0,8	—	—
17/III/72	11,6 ± 0,6	12,6 ± 0,4	15,6 ± 0,6	16,3 ± 0,7	16,3 ± 0,4	—	—
22/III/72	11,8 ± 0,6	13,6 ± 0,6	17,5 ± 0,9	—	17,8 ± 0,8	—	—
4/IV/72	—	—	11,6 ± 0,5	—	14,1 ± 0,4	12,2 ± 0,4	—
24/IV/72	—	—	—	—	17,8 ± 1,2	16,3 ± 1,1	—

* Concentracions en mil·ligrams de nitrat per litre.

El medi conté els components següents: K_2HPO_4 (0,039 gr/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,075 gr/l), Na_2CO_3 (0,020 gr/l), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,027 gr/l), $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ (0,058 gr/l), EDTA (0,001 gr/l), àcid cítric (0,006 gr/l), citrat fèrric (0,006 gr/l). A més hom hi afegeix 1 ml de microelements per litre de medi: $MnCl_2$ (1,81 gr/l), $MoNH_4$ (0,017 gr/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,079 gr/l), H_3BO_3 (2,86 gr/l), $Zn \cdot SO_4 \cdot 7H_2O$ (0,222 gr/l). El pH inicial és 7,84.

Per fer els gradients de nitrats hom hi posa la quantitat convenient de NO_3Na . Ha estat provat també amb NO_3K .

Els nitrats foren determinats pel mètode de SHINN.

Hem cregut oportú de comptar les cèl·lules entre els heterocists en lloc del nombre d'heterocists per unitat de llargada del filament, puix que aquest darrer mètode no és recomanable pel fet que variacions en les mides de les cèl·lules vegetatives poden afectar els valors obtinguts.

La producció primària és mesurada pel mètode del C^{14} , fent, però, una modificació: tenint en compte que el volum de mostra filtrada pot ésser molt poc significatiu per tal com els filaments formen grumolls, hem preferit de referir-nos a unitats de pes fresc. A fi de reglar les unitats, ho donem en tants per cent.

L'extracció de la clorofil·la ha estat feta amb metanol i en fred.

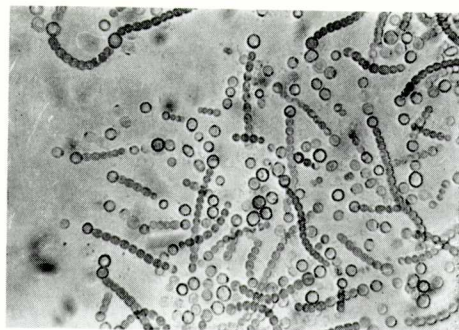


FIG. 1. — Inòcul crescut en el medi sense nitrogen combinat. Hom pot apreciar-hi els heterocists.

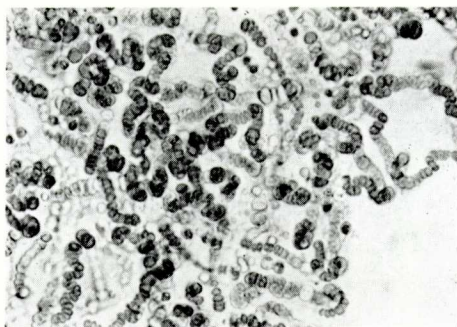


FIG. 2. — Inòcul crescut en 1500 mg/l de nitrat sòdic: no hi ha heterocists i els filaments estan molt modificats.

RESULTATS

Inicialment, hom provà de fer créixer *Nostoc muscorum* en dos medis diferents: l'un en absència de nitrogen combinat i l'altre amb 1500 mg de nitrat sòdic per litre. Al cap d'una setmana, l'inòcul crescut en el tub sense nitrogen combinat presentava una morfologia que podríem dir normal, amb abundància d'heterocists, mentre que en el tub amb 1500 mg/l de nitrat no sols faltaven els heterocists —com calia esperar d'acord amb el que sabem sobre el paper dels heterocists en la fixació de nitrogen (FAY, STEWART, WALSBY i FOGG, 1968; ⁴ FOGG, 1969; ⁵ GORKOM i DONZE, 1971 ⁶)— sinó que, a més, els filaments de cèl·lules estaven completament deformats, amb cargolaments estranys, com pot ésser apreciat en les figures 1 i 2. Això es repetí cada vegada.

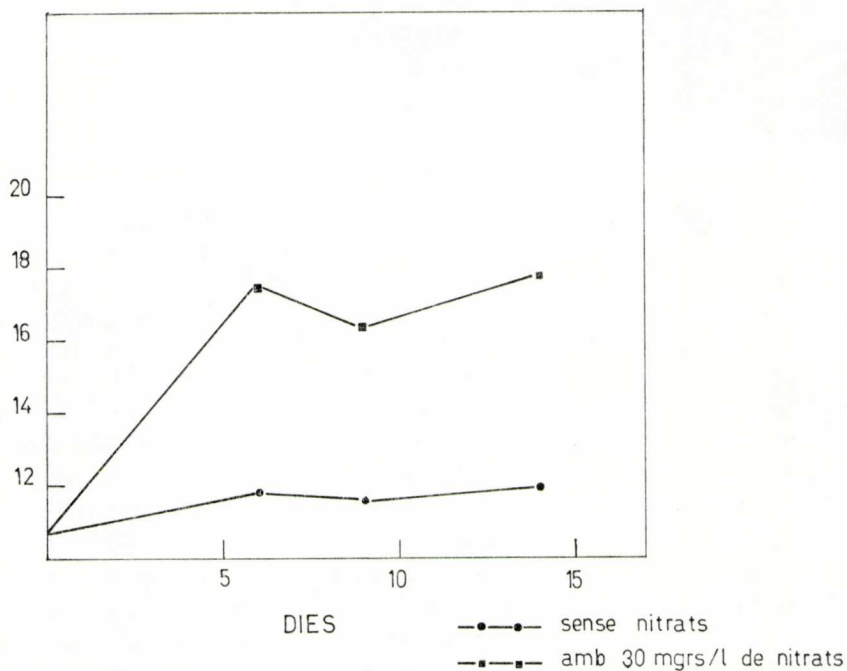
Com a dada complementària, en fer un comptatge de bacteris sobre placa d'agar fou trobada una diferència que pot ésser significativa: en el medi amb 1500 mg de nitrat poden ésser comptats deu vegades més bacteris que en el medi sense nitrogen combinat. Hom pot afegir que tots són bacils gramnegatius, i fins ara no ha estat intentat de determinar-los.

En fer un canvi, posant en un tub amb 1500 mg/l de nitrat l'inòcul que primer havia estat en el medi sense nitrats i al revés, tenen lloc uns canvis molt lents, puix que fins quasi dos mesos després l'inòcul deformat no retornà a la seva forma inicial, amb cèl·lules de morfologia normal i amb heterocists, mentre que l'inòcul que els presentava i havia estat passat al medi amb nitrats també restà completament deformat.

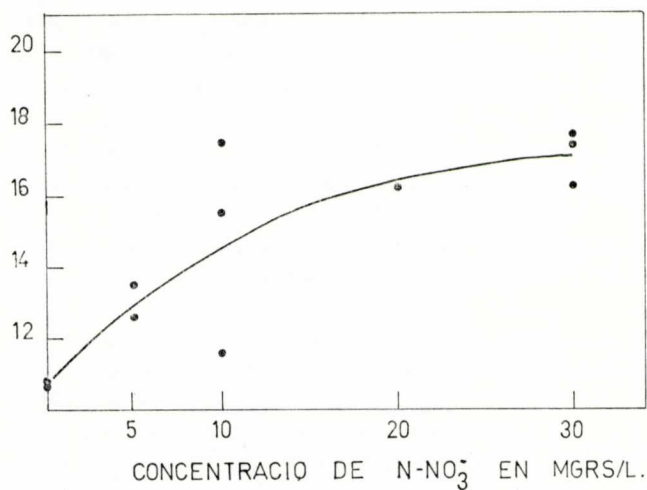
Fou preparat un primer gradient, amb concentracions des de zero a 1500 mg/l, augmentant 250 mg cada tub. L'únic on aparegueren els heterocists fou el que no tenia gens de nitrogen combinat; en tots els altres mancaven els heterocists. L'experiment fou repetit, però, amb un gradient més fi, i mai no hi aparegueren heterocists en concentracions per damunt de 100 mg/l de nitrat. Finalment, fou fet amb les concentracions següents: 0, 5, 10, 20, 30 i 100 mg/l, i els resultats obtinguts són els que exposem en les gràfiques 1 i 2.

Hom pot veure que hi ha una correlació força bona entre les diverses concentracions de nitrat en el medi i el nombre de cèl·lules que hi ha entre els heterocists. A mesura que augmenta la concentració, augmenta també la distància entre heterocists, de manera que mai no ha estat trobat al llarg dels primers dies de l'experiment que per damunt de concentracions de 30 mg de nitrat per litre hi hagi heterocists, bé que un temps de creixement prolongat fa modificar en cert sentit aquesta idea, com veurem més endavant.

NOMBRE DE CÈL·LULES ENTRE HETEROCISTS



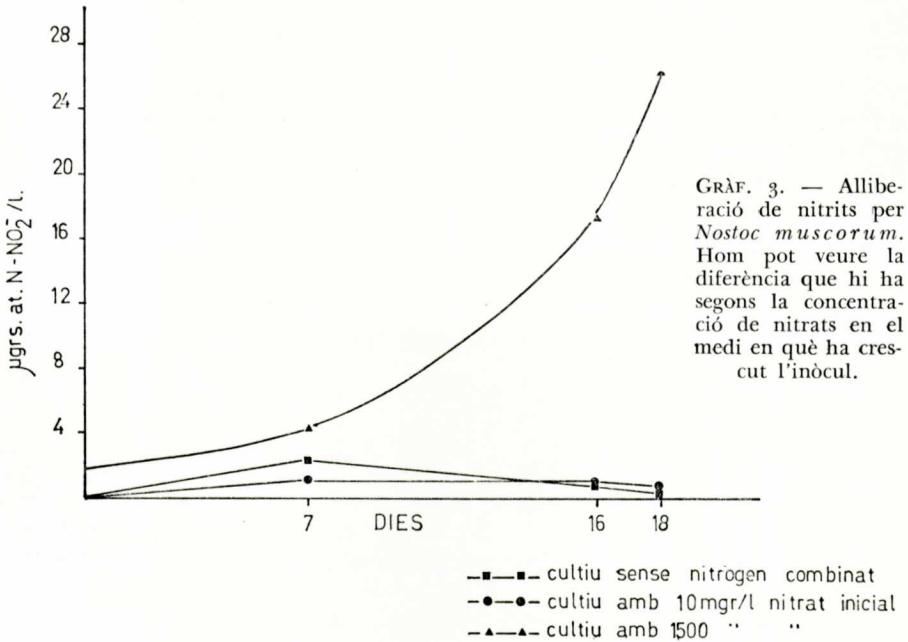
GRÀF. 1. — Diferència en el nombre de cèl·lules entre heterocists en el cas que es tracti d'un inòcul crescut en un medi sense nitrogen combinat o en un medi amb 30 mg/l de nitrat sòdic.



Nostoc muscorum

GRÀF. 2. — Correlació entre les concentracions de nitrats en el medi i el nombre de cèl·lules entre heterocists.

És significativa la diferència que hi ha en el nombre de cèl·lules entre heterocists en el cas d'un inòcul que ha crescut en un medi sense nitrogen combinat —en què la variació al llarg dels dies és mínima, amb valors al voltant de 12— o bé en el que ha crescut en un medi amb nitrats, on els valors són més alts. Aquests resultats coincideixen amb els trobats per OGAWA i CARR (1969)¹⁰ en *Anabaena variabilis*, la qual cosa fa pen-



sar que es tracta d'un fenomen general dins les cianofícies amb heterocists.

Aquestes dades són exposades d'una manera sistemàtica en la taula I, on podem veure que a mesura que passen els dies d'incubació augmenta la distància entre els heterocists, però que si aquests comencen a fer-se molt llargs (quasi un mes i mig), en la concentració amb 100 mg/l de nitrat, on abans mai no hi havia heterocists, comencen a sortir-ne. Potser hem de pensar que hi ha un esgotament del nitrogen combinat del medi i ha calgut anar a la fixació.

En mesurar el pH en finalitzar l'experiment, els tubs amb menys de 100 mg per litre de nitrat presenten un pH neutre o lleugerament àcid, mentre que en el cas de 1500 mg/l el pH és sempre francament bàsic, amb valors alts —de 8,5 a 10—, la qual cosa és prova que en aquest

darrer cas hi ha una forta reducció. Una vegada observades aquestes variacions passarem a seguir el creixement de la mateixa soca, ara, però, en un litre de medi. Com podem veure en la gràfica 3, en seguir la marxa dels cultius, al llarg del temps —a més dels canvis en la morfologia i la variació en el nombre d'heterocists, que ja hem esmentat— hom aprecia una diferència molt significativa en l'evolució dels nitrits, puix que, en el cas que es tracti del medi sense nitrogen combinat o amb només 10 mg, la concentració es troba dins uns valors comparables als inicials. Per contra, en el cas de l'inòcul crescut en el medi amb 1500 mg inicials, hom arriba a concentracions de nitrits molt elevades: fins quasi 30 µg-at de nitrits per litre. Aquest fenomen de la producció de nitrits per part de *Nostoc muscorum* havia ja estat descrit per MAGEE i BURRIS l'any 1954.⁹

La diferència de producció primària entre la mostra crescuda en el medi amb 10 mg/l de nitrats i la que ha crescut en 1500 és també significativa, puix que la fixació de carboni en aquesta darrera representa només el 50 % de la primera.

Els resultats de la quantitat de clorofil·la *a* són paral·lels als anteriors, puix que en l'inòcul de 1500 mg/l de nitrats inicial hi ha 0,102 mg de clorofil·la per litre, mentre que en el de 10 mg de nitrats inicial n'hi ha 0,258 mg, més del doble.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Aquests fets, estudiats en el laboratori, per força han d'estar relacionats amb el que s'esdevé en la natura. Per això cal discutir llurs implicacions ecològiques.

Hem vist l'efecte que l'addició de nitrogen combinat té en la variació del nombre dels heterocists i també en la morfologia del filament; i que alhora repercuteix en la producció primària, quantitat de clorofil·la i alliberament de nitrits al medi. Tot això fa pensar en una inhibició de la fixació quan hi ha nitrats presents, i dóna unes possibilitats d'adaptació a canvis en el medi en les cianofícies, possibilitats que ja no tenen les plantes superiors. De fet, pels treballs de DUGDALE i DUGDALE (1962),³ BILLAUD (1968),² OGAWA i CARR (1969),¹⁰ HORNE i FOGG (1970)⁷ resta clar que els màxims de cianofícies amb heterocists als llacs estan relacionats amb les concentracions menys baixes de nitrats que hom troba durant tot l'any.

A la vegada, les cianofícies amb heterocists tenen una veritable especialització en llurs cèl·lules, amb unes cèl·lules dedicades a la reducció del nitrogen atmosfèric i les vegetatives que fixen el carboni. Però també és interessant de pensar de quina manera una cèl·lula vegetativa pot

arribar a ésser un heterocist. Les dades exposades anteriorment ens diuen que això ha d'ocórrer.

Finalment, com deiem ja al començament i tenint en compte que malauradament un bon nombre de les aigües continentals estan condemnades a processos de distròfia, cal pensar que el paper de les cianofícies —i també dels bacteris— en aquestes aigües pot ésser cada vegada més fonamental.

Per tot això, creiem que aquests estudis sobre la fixació del nitrogen i llur inhibició per part del nitrogen combinat, una vegada hagin estat engegades les tècniques adients, han de portar a l'esbrinament de mecanismes importants dins l'economia del nitrogen en els ecosistemes aquàtics.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, M., i STANIER, R. Y. — *Selective isolation of blue-green algae from water and soil.* «J. Gen. Microbiol.», 51, 203 (1968).
2. BILLAUD, V. A. — *Nitrogen fixation and the utilization of other inorganic nitrogen sources in a subarctic lake.* «J. Fish. Res. Bd. Can.», 25, 2101 (1968).
3. DUGDALE, V. A., i DUGDALE, R. C. — *Nitrogen metabolism in lakes. II: Role of nitrogen fixation in Sanctuary Lake, Pennsylvania.* «Limnol. Oceanogr.», 7, 170 (1962).
4. FAY, P.; STEWART, W. D. P.; WALSBY, A. E., i FOGG, G. E. — *Is the heterocyst the site of nitrogen fixation in blue-green algae?* «Nature», 220, 810 (1968).
5. FOGG, G. E. — *Recent studies on gas vacuoles and heterocysts.* «Ver. Internat. Verein. Limnol.», 17, 761 (1969).
6. GORKOM, H., i DONZE, M. — *Localization of nitrogen fixation in «Anabaena».* «Nature», 234, 231 (1971).
7. HORNE, A., i FOGG, G. E. — *Nitrogen fixation in some English lakes.* «Proc. Roy. Soc. Lond. B», 175, 351 (1970).
8. HUGHES, E. O.; GORHAM, P., i ZEHNDER, A. — *Toxicity of a unialgal culture of «Microcystis aeruginosa».* «Can. J. Microbiol.», 4, 225 (1958).
9. MAGEE, W., i BURRIS, R. H. — *Fixation of N₂ and utilization of combined nitrogen by «Nostoc muscorum».* «Amer. J. of Botany», 41, 777 (1954).
10. OGAWA, R., i CARR, J. F. — *The influence of nitrogen on heterocyst production in blue-green algae.* «Limnol. Oceanogr.», 14, 342 (1969).
11. PADAN, E., i SHILO, M. — *Distribution of cyanophages in natural habitats.* «Verh. Internat. Verein. Limnol.», 17, 747 (1969).
12. SAFFERMAN, R. S.; DIENER, T. O.; DESJARDINS, P. R., i HARRIS, M. E. — *Isolation and characterization of AS-1, a phycovirus infecting the blue-green algae, «Anacystis nidulans» and «Synechococcus cedorum».* «Virology», 47, 105 (1972).
13. SHILO, M. — *Biological agents which cause lysis of blue-green algae.* «Mitt. Internat. Verein. Limnol.», 19, 206 (1971).
14. STEWART, W. D. P. — *Nitrogen fixing plants.* «Science», 158, 1426 (1967).