

INFLUENCIA DE LA ENERGIA LUMINICA SOBRE LA
COMPOSICION PIGMENTARIA DE LA DIATOMEA
MARINA PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM BOHLIN.

INVESTIGACIONES
ORGANISMO
C.S.I.C.
BIBLIOTECA
BARCELONA
PESQUERAS

Memoria presentada para
optar al Grado de Licencia
do en Ciencias, Sección Bio
lógicas, por la Universidad
Autónoma de Barcelona por,

Anton-Genís Torres Bargalló

VQBO

El Director de la Tesina

~~Dr. Antonio Ballester Nolla~~

~~Instituto de Investigaciones Pesqueras
Barcelona~~

vopce

Dr. Jaume Terrades Serra
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Barcelona

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Se suelen distinguir en el fitoplancton marino formas adaptadas a vivir bajo intensidades lumínicas elevadas y formas que viven en condiciones de escasez lumínica. Las primeras, denominadas heliofílicas, corresponden a especies que tienen su máximo crecimiento en verano, mientras que las segundas, ó umbrofílicas, lo presentan en invierno.

Steeman Nielsen (1934) describe especies de dinoflagelados del género *Ceratium*, que viven en aguas profundas (alrededor de los cien metros), mientras que otras se encuentran únicamente en la superficie. Estas especies parecen corresponder a formas umbrofílicas y heliofílicas, adaptadas a vivir en microecosistemas de condiciones muy distintas de luz y de temperatura. En general se considera a las algas verdes como heliofílicas, a los dinoflagelados como umbrofílicos y a las diatomeas como formas intermedias.

Estudios realizados "in situ" mostraron que la concentración de clorofila a al aumentar la profundidad presentaba distintas variaciones en invierno y verano (fig. 1). En invierno, cuando existe mezcla vertical de las aguas, la concentración de clorofila a, permanece constante al aumentar la profundidad. En cambio, en verano, cuando el agua se encuentra estratificada, la concentración de clorofila a aumenta con la profundidad.

Estos resultados sugirieron diferencias fisiológicas entre las formas heliofílicas y umbrofílicas.

El comportamiento bajo distintas condiciones de estas formas, ha sido estudiado durante la segunda mitad de este siglo, en cultivos de laboratorio. La evolución del nivel de fotosíntesis a distintas intensidades lumínicas y temperaturas ha sido objeto de los estudios más profundos.

En 1957, Talling introdujo el concepto de I_k (intensidad lumínica para la cual la fotosíntesis alcanza la saturación). En 1959, Steeman Nielsen y Hansen estudian las curvas intensidad lumínica-fotosíntesis en poblaciones fitoplanctónicas naturales, hallando que el valor de I_k para el plancton de aguas profundas es menor que para el plancton de superficie.

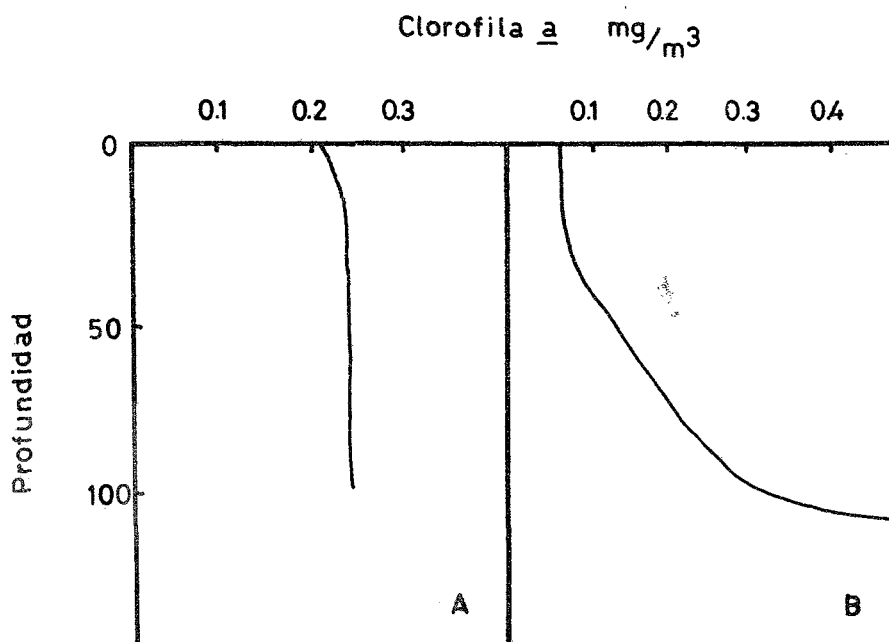


Figura 1. Variación de la concentración de clorofila a al aumentar la profundidad en invierno (A) y en verano (B).

Más tarde, en 1968, Steeman Nielsen y Jørgensen, experimentando con cultivos de *Chlorella pyrenoidosa*, postulan un aumento en el contenido celular de clorofila a al cultivar a intensidades lumínicas por debajo del óptimo. Así, la tasa fotosintética por célula, es mayor en los individuos que han crecido a baja intensidad lumínica. O sea, que una intensidad subóptima no aumenta la eficiencia con la que ésta es utilizada por parte de la clorofila, pero sí aumenta la tasa fotosintética por célula, al aumentar su contenido en clorofila a. Estos autores fueron los primeros en sugerir una adaptación a intensidades lumínicas reducidas.

Sin embargo, no todos estos cambios adaptativos, son debidos a un aumento del contenido celular de clorofila a. En *Cyclotella meneghiniana*, por ejemplo, se produce el mismo efecto al cambiar el nivel de actuación de los enzimas de la fase oscura de la fotosíntesis. Por otra parte, algunos autores dudan que se produzcan estos cambios en la actividad enzimática.

Beardall y Morris, en 1976, sugieren que el valor de p_{max} (valor máximo de la fotosíntesis en la saturación) adquiere mayor importancia que el valor de I_k . Según estos autores la principal característica de la adaptación a bajas intensidades lumínicas consiste en una reducción de la capacidad del alga de utilizar intensidades saturantes. Dan evidencia también de un leve aumento de la tasa fotosintética por unidad de clorofila. Este aumento, sin embargo, no se traduce en un incremento de la tasa de crecimiento. Observan asimismo un decremento de la actividad enzimática por célula, pero no por unidad de clorofila.

Efectos parecidos fueron encontrados por Morris y Glover en 1974 al estudiar la influencia de la temperatura. El crecimiento a bajas temperaturas reduce el contenido celular de clorofila a. La tasa fotosintética por célula aumenta al disminuir la temperatura, pero dicha tasa por unidad de clorofila se mantiene aproximadamente constante. Se observa un aumento de la masa celular (volumen, peso seco o contenido de carbono) respecto al contenido de clorofila a. El crecimiento a temperaturas por debajo del óptimo reduce la capacidad del alga de fotosintetizar a temperaturas elevadas.

También existen datos en la bibliografía sobre la variación de la tasa de crecimiento como respuesta a distintas intensidades lumínicas y temperaturas. Según Jitts, McAllister, Stephens y Strickland (1964), a temperaturas óptimas, el crecimiento a bajas intensidades lumínicas no presenta inhibición, pero la respuesta a la intensidad lumínica es distinta a temperaturas extremas ó en condiciones de deficiencia de nutrientes.

Foy, Gibson y Smith estudian la variación de la tasa de crecimiento respecto al fotoperiodo, encontrando una proporcionalidad entre aquella y la duración del periodo de luz efectiva.

También se han citado variaciones en el contenido celular de pigmentos al variar la longitud de onda de la luz de cultivo. Jeffrey (1975) al cultivar la diatomea *Stephanopyxis turris* a bajas intensidades de luz azul, encuentra un incremento del 80 al 100 % en los pigmentos fotosintéticos. Este se centra en un aumento del número de cloroplastos y del número de tilacoides por plasto. Variaciones de tal calibre sólo se han encontrado en diatomeas. Esto explica la capacidad de estos organismos de vivir tanto en aguas profundas como en superficiales.

Parsons (1961) cita un aumento del contenido celular de clorofila c, ligado a elevada intensidad lumínica, baja temperatura y deficiencia de nutrientes.

McAllister, Shah y Strickland (1964) observan cambios en las concentraciones de clorofilas y carotenoides en distintas condiciones de crecimiento, pero no cuantifican los resultados.

En este trabajo se intenta cuantificar los cambios producidos en una diatomea marina por las distintas condiciones de su microentorno (luz y temperatura). Hemos intentado asociar estas dos variables de forma parecida a como pueden encontrarse en el medio marino, o sea ligar elevada intensidad lumínica con elevada temperatura y viceversa.

Se estudia asimismo la dinámica de crecimiento de un cultivo y se deduce un modelo matemático para el cálculo de las tasas de crecimiento a partir de las densidades ópticas del cultivo.

Deseo agradecer la ayuda prestada por el Dr. Antonio Ballesster Nolla del Instituto de Investigaciones Pesqueras de Barcelona y por el Dr. Jaume Terrades Serra de la Universidad Autónoma de Barcelona, así como la de todos aquellos que en mayor ó menor grado han hecho posible la realización de este trabajo.

**II. MATERIAL
Y
METODOS**

II. MATERIAL Y METODOS

II.1. Phaeodactylum tricornutum Bohlin

Hemos elegido este alga fitoplanctónica para realizar el presente trabajo debido a que crece con bastante facilidad y con elevadas constantes de crecimiento en cultivos monoalgales de laboratorio.

Es un alga unicelular que puede formar pequeñas cadenas y presentarse en tres estados: oval, fusiforme y trirradiado (estos dos últimos sin valvas). Presenta generalmente dos cromatóforos. Suele tener en uno de los extremos un corpúsculo refringente constituido por material de reserva.

Las formas oval y fusiforme son las más usuales en este organismo. La oval aparece tras prolongados cultivos en agar enriquecido con medio marino. En cultivo líquido adopta principalmente la fusiforme y en pequeña proporción la trirradiada. En nuestros cultivos encontramos estas dos últimas formas. El tamaño medio del alga ha sido de 25 μ de longitud por 3,4 de amplitud.

II.2. Cultivos

Los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 250 ml, con teniendo alrededor de 75 ml de cultivo, dispuestos en el interior de un recipiente ortoédrico provisto de cinco fluorescentes de luz blanca. Los cambios de intensidad lumínica se regularon variando el número y la posición de los tubos encendidos. La temperatura varió proporcionalmente a la intensidad de la luz, oscilando entre los 15,5 y los 25 grados centígrados.

El medio de cultivo consistió el agua de mar enriquecida con nutrientes según la siguiente fórmula:

Agua de mar	1 ml
Na NO ₃	1 ml
Na H ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1 ml
NH ₄ Cl	1 ml
Na SiO ₃ ·9 H ₂ O	1 ml
Solución de trazas de metales	1 ml
Solución tampón	4 ml

Al cultivar sin solución tampón el pH aumentaba desde un valor inicial de 8,5 hasta 9,8 al cabo de tres días.

Todos los cultivos fueron sembrados a partir de una cepa mantenida en condiciones constantes de luz y temperatura, para evitar posibles condicionantes de tipo genético en los resultados.

La densidad óptica de cada cultivo fue medida inmediatamente después de cada siembra, y en el momento de la extracción, para determinar la tasa de crecimiento. La densidad óptica inicial no excedió de 0,081 y la final no fue inferior a 0,26.

Todas las extracciones fueron realizadas durante la fase de crecimiento exponencial.

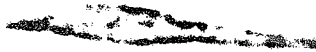


Figura 2. Fotografía al microscopio óptico del alga cultivada (x 2000).

Los cultivos fueron sometidos a un ciclo de 17 horas de luz por 7 de oscuridad. Todos ellos crecieron en condiciones no axénicas.

II.3. Análisis cualitativo del aparato fotosintetizador

Para la separación e identificación de los pigmentos del alga cultivada utilizamos el método de cromatografía en capa fina sobre gel de sílice propuesto por Riley y Wilson (1965).

La extracción de los pigmentos del cultivo se realiza por filtración de un volumen determinado de cultivo a través de un filtro de fibra de vidrio Watman GF/C, de paso lo suficientemente pequeño para retener todas las células. Este filtro es colocado en 5-10 cc de alcohol metílico absoluto, y es mantenido durante 24 horas en una cámara oscura a 0°C. Se ha probado que el metanol es mejor extractor que la acetona, pero en cambio produce mayores alteraciones en los pigmentos. Transcurrido este tiempo el extracto es purificado en un embudo de decantación. Se echa la muestra disuelta en 10 cc de metanol en un embudo que contiene 5 cc de éter dietílico, 5 cc de éter de petróleo y de 20 a 30 cc de solución salina al 15 %. Mediante este tratamiento conseguimos la separación de compuestos, principalmente lipídicos, que podrían dificultar la resolución de los pigmentos en la cromatografía. Seguidamente se evapora la fase que contiene los pigmentos utilizando un rotovapor y se obtiene un extracto seco que es recogido y depositado sobre la placa cromatográfica por una mezcla de éter de petróleo y dietil éter (v/v). Las placas son desarrolladas utilizando el eluyente propuesto por Ballester (1973) compuesto por éter de petróleo (p.e. 60-80°C.: acetato de etilo : dietil amina : n-propanol (66:14:14:6, v/v). Todo el proceso se realiza bajo luz atenuada para evitar la fotooxidación de los pigmentos.

Se utilizaron placas Merckx con un espesor de silicagel de 0,25 .

Para obtener los extractos puros de los pigmentos se rasca la mancha correspondiente a cada uno de ellos y se vuelve a extraer

el pigmento con metanol durante 24 horas en las mismas condiciones anteriores. Los extractos metanólicos son secados en el rotovapor y cada pigmento es disuelto en el disolvente más adecuado para realizar su espectro de absorción. Este se realiza en continuo desde 750 nm hasta 350 nm. Las xantofilas y el β -caroteno son disueltos en hexano, y la clorofila a es disuelta en acetona.

La identificación se llevó a cabo principalmente por el espectro de absorción de cada pigmento, basándonos en sus máximos característicos, aunque como factor secundario también nos ha sido útil su R_F (cociente entre la distancia recorrida por el pigmento y la recorrida por el eluyente en la cromatografía).

Hemos de puntualizar que no conseguimos separar cromatográficamente la clorofila c, ya que es un pigmento polar que queda próximo al $R_F=0$ junto a clorofilidas y otros pigmentos de características parecidas.

También hemos de decir que en este trabajo no se han tenido en cuenta pigmentos que se encuentran en bajas concentraciones, como clorofila a, feoforbidos y clorofilidas, algunos de los cuales pueden ser originados por manipulaciones durante el proceso de extracción y separación.

II.4 Análisis cuantitativo del aparato fotosintetizador

La extracción de los pigmentos de 50 cc de cultivo se efectuó según el procedimiento descrito en el apartado II.3. El extracto metanólico es filtrado para eliminar posibles residuos del filtro, secado en el rotovapor y diluido posteriormente en 10 cc de acetona al 90 %.

La absorbancia a las longitudes de onda de 430, 480, 630, 664 y 665 nm es medida en un espectrofotómetro Varian Techtron modelo 635.

II.4.1. Cálculo de las concentraciones de clorofilas y carotenoides

Las ecuaciones que permiten el cálculo de las concentraciones de los pigmentos fitoplanctónicos, a partir de la densidad óptica a longitudes de onda seleccionadas están basadas en los coeficientes de extinción de McKinney (1941), Smith y Benitez (1955) para las clorofilas a y b, y Jeffrey (1963) para la clorofila c.

Richards y Thompson (1952) desarrollan unas ecuaciones espectrofotométricas que permiten el cálculo de las concentraciones de clorofilas y carotenoides (vegetales y animales) a partir de extractos acetónicos. Estas ecuaciones, modificadas por Creitz y Richards (1955), presentan algunas discrepancias con las desarrolladas posteriormente por Parsons y Strickland (1963). Son las siguientes:

- 1.- Los coeficientes específicos de absorción empleados por Richards y Thompson son demasiado bajos.
- 2.- Los valores de clorofila c obtenidos en muestras de agua de mar pueden llevar a la conclusión de que esta clorofila es la que se encuentra en mayor proporción en algunas partes de los océanos.
- 3.- La unidad asumida por Richards para la determinación de los carotenoides totales, SPU ("specified pigment unit"), es probablemente mucho mayor que un gramo.

Así, empleando las ecuaciones de Richards y Thompson se tiende a obtener unos valores demasiado altos de clorofila a y demasiado bajos de carotenoides.

Jeffrey (1968, 1969) descubrió que la clorofila c es una mezcla de dos componentes (c_1 y c_2), que polimerizan al ser purificados, dando coeficientes de extinción más bajos. Posteriormente (1972) consiguió cristalizar cuidadosamente estos dos componentes para evitar la polimerización, y calculó sus coeficientes de extinción. Con las nuevas ecuaciones los valores de clorofila c obtenidos son aproximadamente la mitad de los logrados con las viejas ecuaciones. Utilizando el mismo método de cristalización, Jeffrey determina también nuevos coeficientes de extinción para las clorofilas a y b, que son idénticos a los obtenidos por Strain y colaboradores (tabla I). Estos coeficientes son aproximadamente un 5 %

más bajos que los valores primitivos. A partir de estos coeficientes de extinción, Jeffrey y Humphrey (1975) desarrollan las nuevas ecuaciones para el cálculo de las concentraciones de los pigmentos fitoplanctónicos, que son las utilizadas en este trabajo.

Tabla I. Nuevos coeficientes de extinción utilizados por Jeffrey.

	Dietil éter	Acetona 100 %	Acetona 90 %
Clorofila <u>a</u>	98,07 (660,7 nm)	88,15 (662,7 nm)	87,67 (664,3 nm)
Clorofila <u>b</u>	62,00 (643,3 nm)		51,36 (648,8 nm)
Clorofila <u>c₁</u>		39,2 (629,1 nm)	44,8 (630,6 nm)
Clorofila <u>c₂</u>		37,2 (629,6 nm)	40,4 (630,9 nm)

Las ecuaciones detalladas a continuación son las calculadas por Jeffrey para diatomeas y algas pardas, utilizando como disolvente acetona al 90 %.

$$\text{Clorofila } \underline{a} = 11,47 \cdot \text{DO}_{664} - 0,40 \cdot \text{DO}_{630}$$

$$\text{Clorofila } \underline{c} (\underline{c}_1 + \underline{c}_2) = 24,36 \cdot \text{DO}_{630} - 3,73 \cdot \text{DO}_{664}$$

DO_x representa la densidad óptica a la longitud de onda x.

El recorrido óptico de la cubeta utilizada es de 1 cm. El resultado de las ecuaciones viene expresado en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

En nuestras tablas los resultados son expresados en g de pigmento por célula. La conversión se realiza mediante la fórmula:

$$\mu\text{g pigmento c\acute{e}l}^{-1} = \frac{C_1 \cdot v_d}{N_c \cdot V}$$

donde

C_1 es la concentración de pigmento en g ml^{-1} ,

v_d es el volumen de dilución del pigmento en acetona al 90 %,

N_c es el número de células por mililitro y

V es el volumen de cultivo filtrado en ml.

La ecuación utilizada para el cálculo de la concentración de los carotenoides es la desarrollada por Parsons y Strickland:

$$\mu\text{SPU carotenoides ml}^{-1} (1) = \frac{D_{0.480}}{V} \cdot 10^3$$

donde

V es el volumen de cultivo filtrado en ml.

Para convertir el resultado en $\mu\text{SPU c\acute{e}l}^{-1}$ hemos utilizado la misma fórmula empleada en las clorofilas.

(1). La definición de SPU ("specified pigment unit") es la siguiente:

El SPU es un peso de pigmento, específico pero indeterminado que equivale aproximadamente a un gramo. Es la cantidad de pigmento que disuelto en un litro de acetona al 90 % absorbe aproximadamente un valor igual al coeficiente de absorción específico, a la longitud de onda en la que presenta el máximo de absorción.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

III.1. Análisis cualitativo del aparato fotosintetizador

La figura 3 nos muestra el espectro de absorción de un extracto total en acetona al 90 %. Los espectros de absorción de los pigmentos separados e identificados están representados en las figuras 4, 5, 6, y 7. Estos son β -caroteno, clorofila a, fucoxantina y diadinoxantina.

Los máximos de absorción de los carotenoides, no concuerdan exactamente con los hallados en la bibliografía; suelen presentar un pequeño desplazamiento. Sin embargo, la total concordancia de nuestras conclusiones con los datos existentes sobre *Phaeodactylum tricornutum* ha solventado las posibles dudas sobre la identificación de las xantofilas.

Tabla II. Máximos de absorción de los pigmentos identificados (según Parsons, 1961).

Clorofila <u>a</u> (acetona 90 %)	430, 663
β -caroteno (hexano)	425, 450, 478
Diadinoxantina (hexano)	448, 477
Fucoxantina (hexano)	450, 480

Los pigmentos que quedaban en $R_F=0$ no han sido valorados (excepto la clorofila c). En la tabla III están representados los R_F de los pigmentos así como sus características en la cromatografía (color y fosforescencia al ultravioleta).



Figura 3. Espectro de absorción de un extracto total en acetona al 90 %.

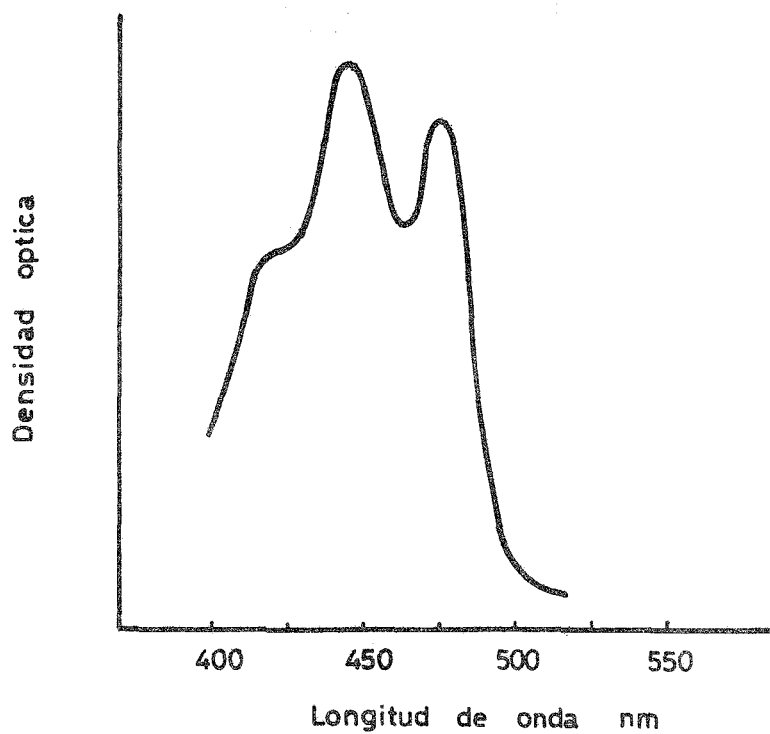


Figura 4. Espectro de absorción de la diadinoxantina en hexano.

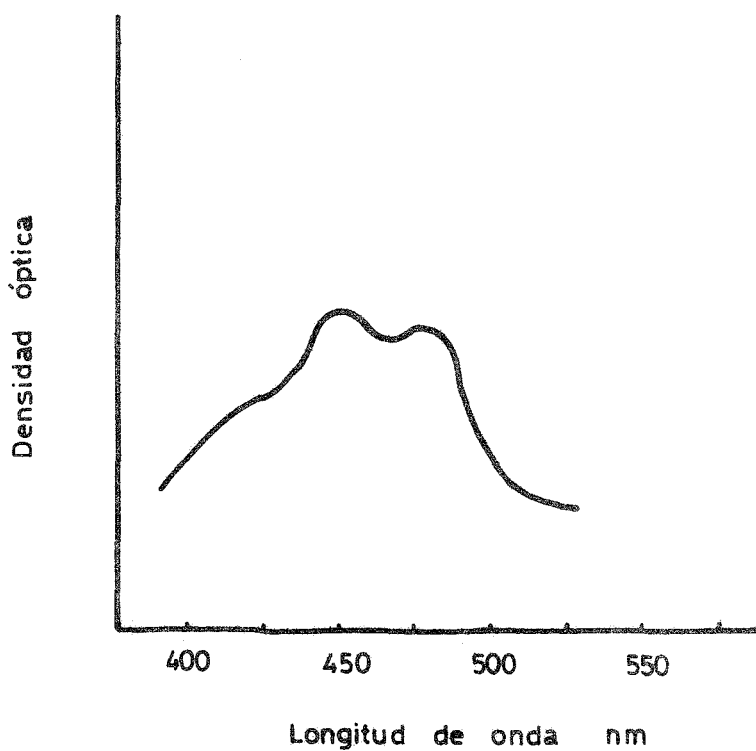


Figura 5. Espectro de absorción del β -caroteno en hexano.

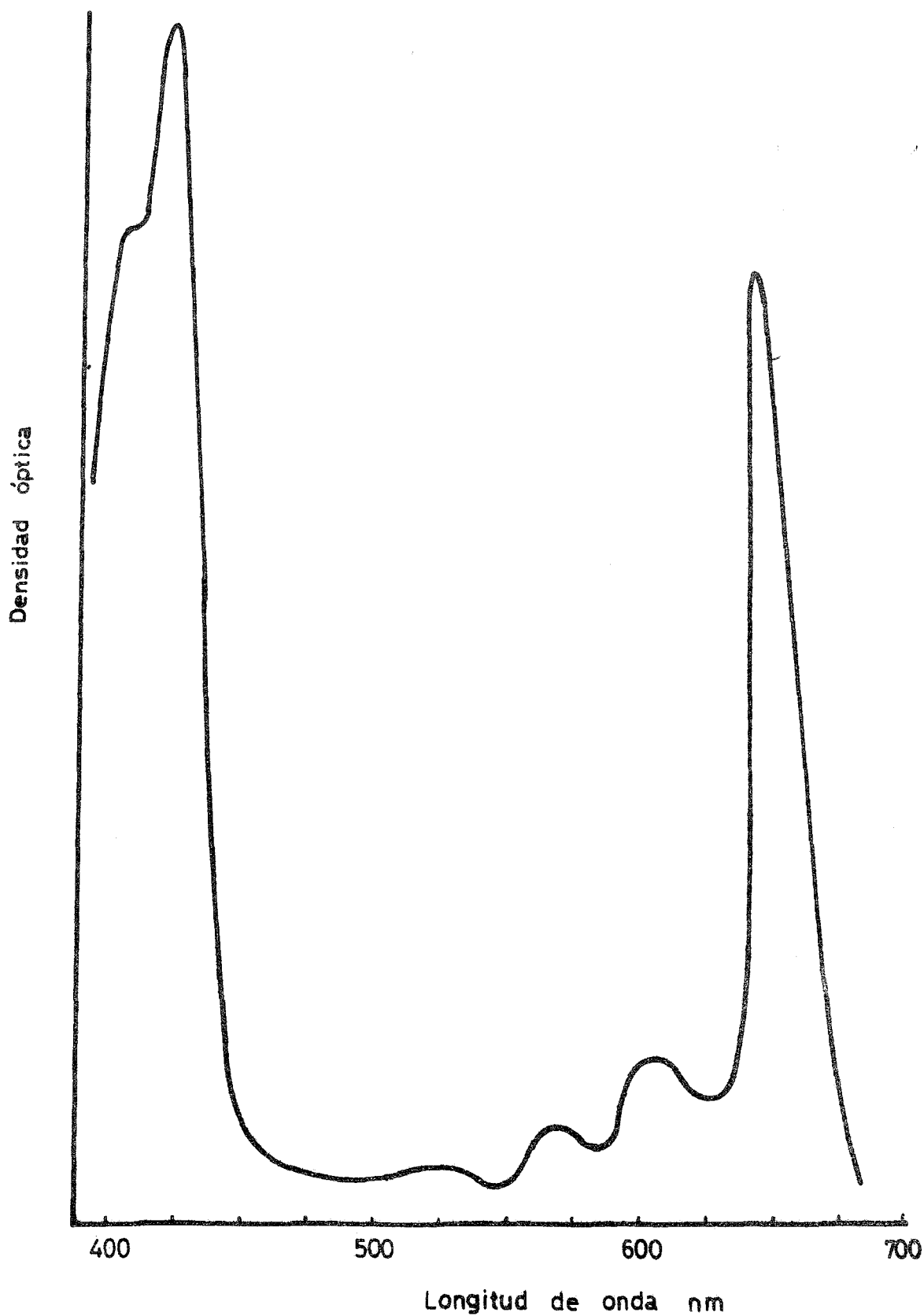


Figura 6. Espectro de absorción de la clorofila a en acetona al 90 %.

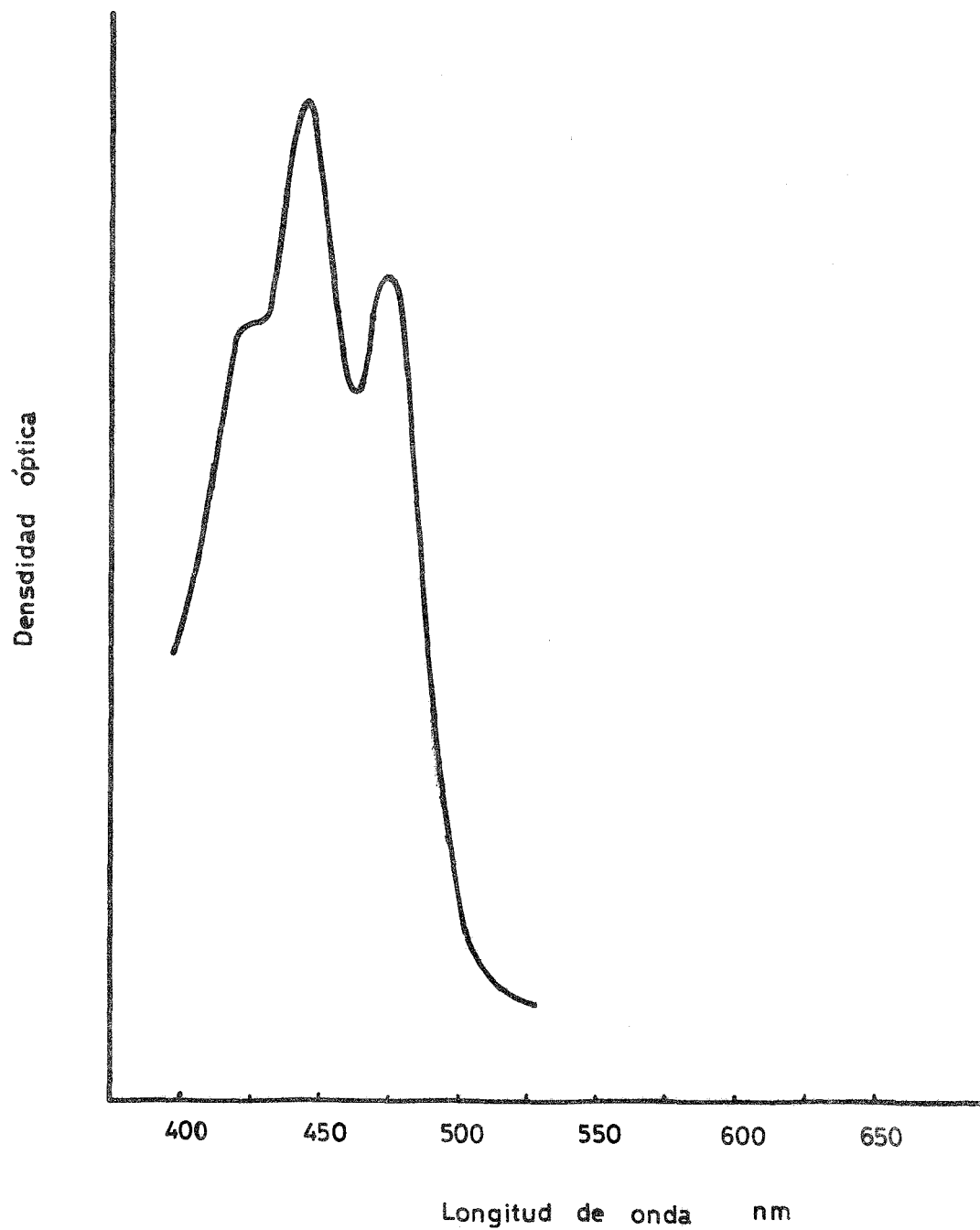


Figura 7. Espectro de absorción de la fucoxantina en hexano.

Tabla III. Principales características de los pigmentos identificados en la cromatografía y máximos de absorción (la clorofila a disuelta en acetona al 90 % y los carotenoides en hexano).

Pigmento	R _F	Color	Fosforescencia al ultravioleta	Máximos de absorción
Clorofila <u>a</u>	0,61	verde oscuro	rojo	429 nm 662 nm
β -caroteno	0,76	amarillo pálido	-	425 nm 450 nm 477 nm
Fucoxantina	0,42	anaranjado	pardo	477 nm 449 nm
Diadinoxantina	0,32	amarillo	-	476 nm 446 nm

III.2. Estudio del crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin en cultivo de laboratorio

El intento de regular, ó al menos de conocer en cada instante las constantes que caracterizan el crecimiento ó, mejor dicho, el desarrollo de la diatomea cultivada, nos impulsó a intentar delimitar su dinámica de crecimiento. Entendemos por dinámica de crecimiento la imagen conjunta de las variaciones de las constantes que pueden caracterizar la fisiología de un alga. Esta dinámica de crecimiento está enfocada únicamente hacia las constantes que nosotros pretendemos estudiar y que pueden servirnos de fijadores de distintos estadios fisiológicos. Los aspectos estudiados son los siguientes:

- Crecimiento (curva de crecimiento y tasa de crecimiento)
- Evolución del índice DO_{430}/DO_{665}
- Evolución de las concentraciones de pigmentos por célula
- Relaciones interpigmentarias

El conocimiento exhaustivo de las características del cultivo en todos sus estadios de crecimiento ha permitido una mejor interpretación de los resultados, así como explicar algunos datos que en un principio parecían contradictorios.

Los resultados concernientes a este apartado están comprendidos en las tablas IV y V.

III.2.1. Crecimiento

La curva de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivo de laboratorio durante 17 días está dibujada en la figura 9. Podemos observar que a una fase estacionaria, que se produce alrededor de la semana de crecimiento, sigue una nueva fase de rápida división que se estabiliza definitivamente.

Ya que nuestros cultivos a distintas energías lumínicas no han crecido más de tres días, la parte de la curva de crecimiento que nos interesa es la correspondiente a los primeros siete días.

Tabla IV. Cantidades absolutas y relativas de pigmentos en los distintos tiempos de crecimiento. Las clorofilas están expresadas en μg en 10^6 cél., y los carotenoides en μSPU en 10^6 cél.

Días de crecimiento	0	1	3	6	7	8
Clorofila <u>a</u>	1,5585	2,2910	3,5965	3,9278	3,7240	3,0025
Clorofila <u>c</u>	0,4073	1,1187	0,5979	0,6266	0,4460	0,4178
Carotenoides totales	2,1094	0,1238	0,6808	0,8475	1,3520	1,0961
<u>Clorofila a</u> <u>Clorofila c</u>	3,82	2,04	6,01	6,26	8,34	7,18
<u>Carotenoides</u> <u>Clorofilas</u>	1,07	0,30	0,16	0,15	0,32	0,31

Tabla V. Relación de las tasas de crecimiento, densidad óptica y número de células por mililitro, en los distintos tiempos de crecimiento.

Días de crecimiento	0	1	3	6	7	8
Tasa de crecimiento		-	0,450	0,383	0,360	0,340
Densidad óptica	0,024	-	0,083	0,305	0,350	0,393
Número de células/ml	-	19760	82250	356333	450352	627632
$\frac{DO_{430}}{DO_{665}}$	-	-	2,30	2,27	2,30	2,30

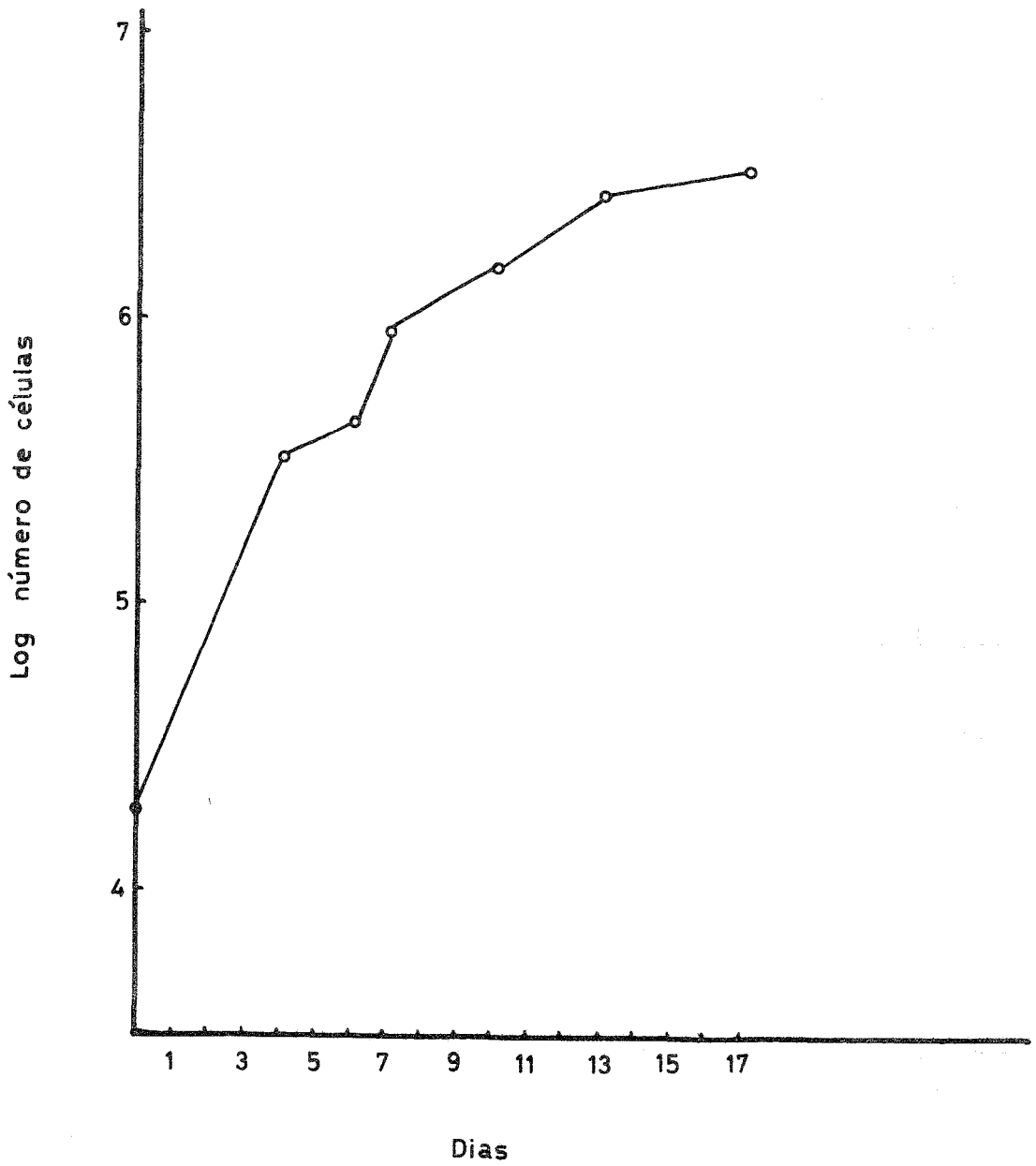


Figura 9. Curva de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* durante 17 días.

Las tasas de crecimiento fueron halladas mediante la fórmula:

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

siendo

r la tasa de crecimiento,

N_0 el número de células inicial y

N_t el número de células al cabo de un tiempo t.

La representación gráfica de las tasas de crecimiento de los siete primeros días (fig. 10) nos muestra que éstas disminuyen de forma practicamente lineal.

En este punto nos preguntamos si podríamos hallar una fórmula que nos permitiese calcular las tasas de crecimiento a partir de las densidades ópticas, parecida a las ya utilizadas en otro tipo de algas (Foy, Gibson y Smith, 1976).

Este método sustituiría el engorroso trabajo de tener que realizar contajes celulares por una rápida medida espectrofotométrica.

Así pues, ensayamos modelos cuya respuesta gráfica fuese parecida a la de las tasas de crecimiento halladas. Un modelo que cumple esta condición es $\log DO_t - \log DO_0/t^2$ (fig. 11). Hallamos entonces la relación existente entre esta función y $\ln N_t - \ln N_0/t$, representada en la figura 12.

La relación de los valores de la densidad óptica y el número de células es aproximadamente lineal durante los primeros días del crecimiento, como puede deducirse de la figura 13.

Restringiéndonos a los primeros cinco días de crecimiento, encontramos la siguiente ecuación que nos permite calcular la tasa de crecimiento con bastante exactitud:

$$r = 1,116 \cdot \frac{\log DO_t - \log DO_0}{t^2} + 0,354$$

Extendiéndonos a toda la curva, encontramos también una ecuación, que es algo más inexacta que la anterior:

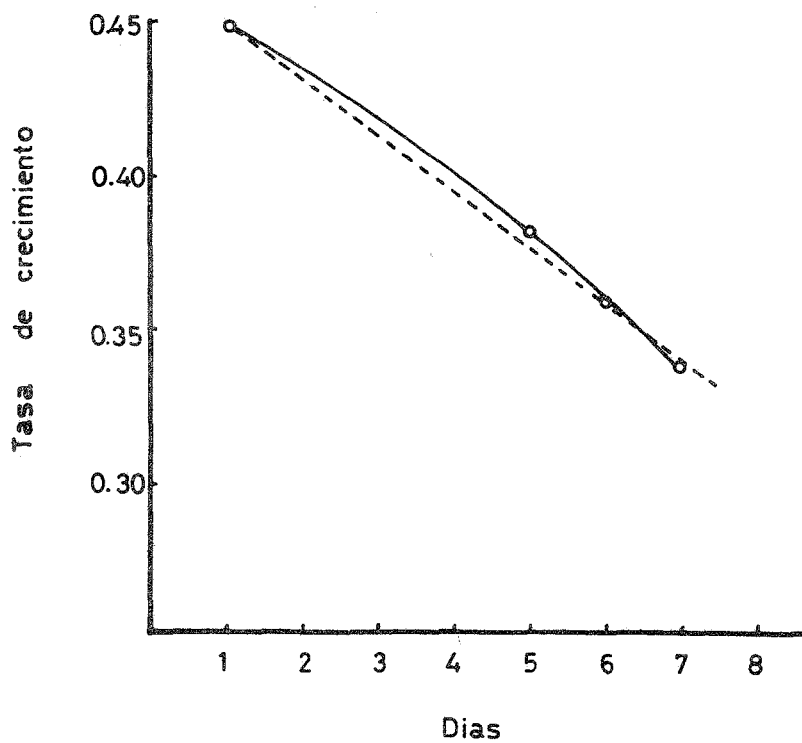


Figura 10. Evolución de la tasa de crecimiento al aumentar la edad del cultivo.

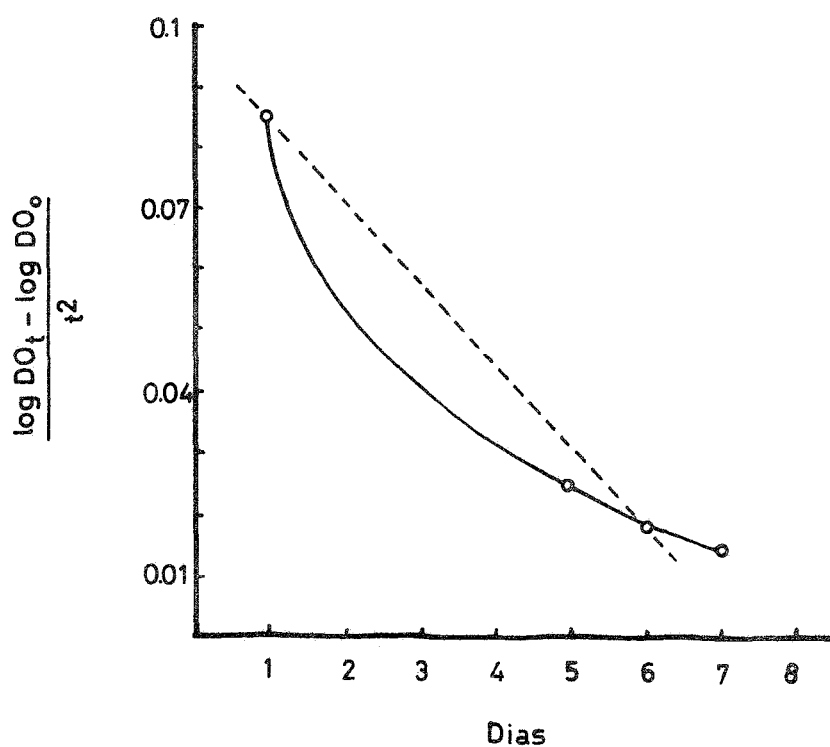


Figura 11. Evolución de la función $\log DO_t - \log DO_0/t^2$.

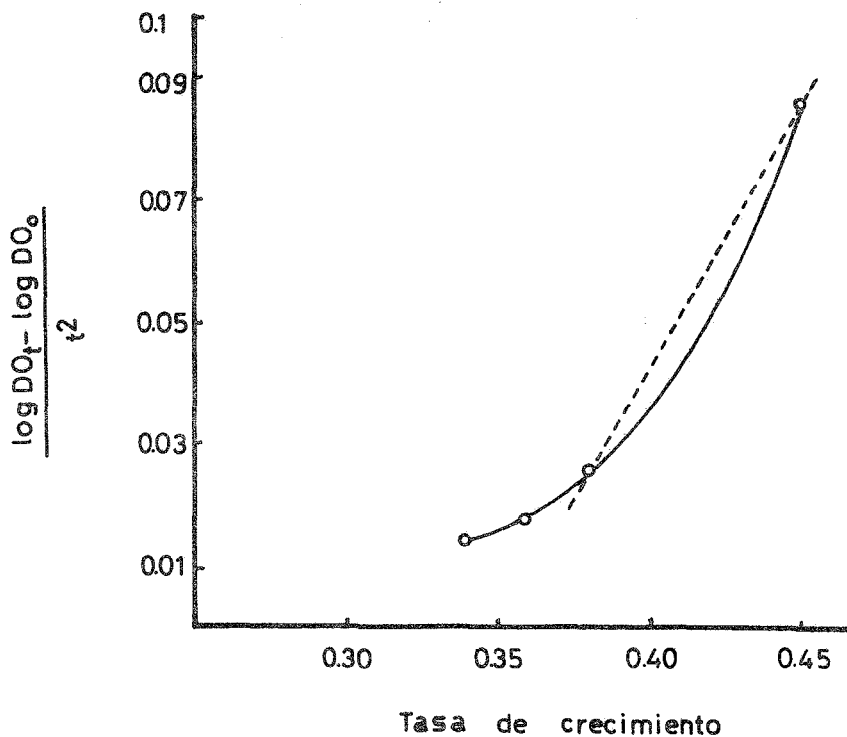


Figura 12. Relación entre la función $\log DO_t - \log DO_0/t^2$ y la tasa de crecimiento.

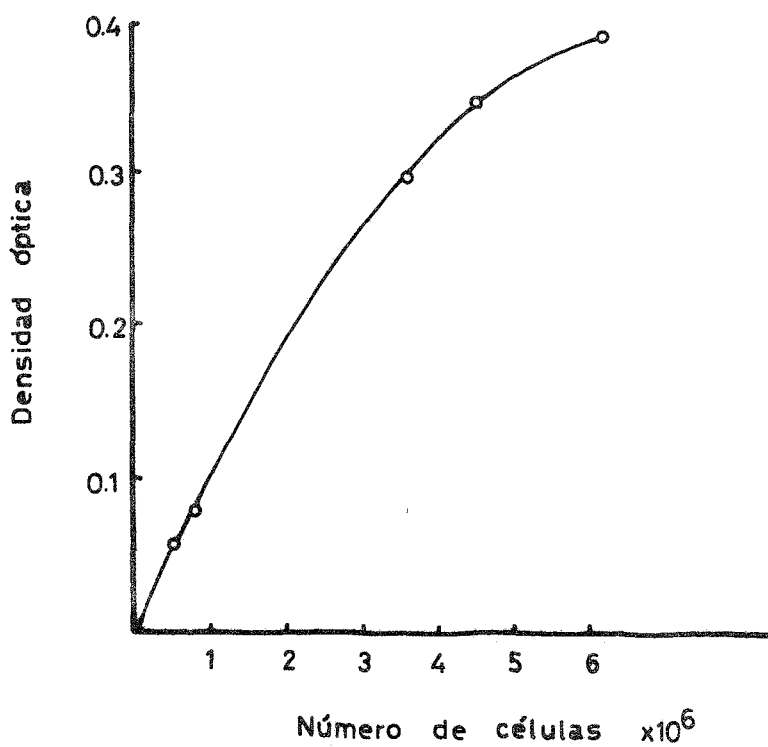


Figura 13. Relación entre la densidad óptica y el número de células por mililitro.

$$e^{17,85 \cdot r} = \frac{\log DO_t - \log DO_0}{0,000026 \cdot t^2}$$

en donde

r es la tasa de crecimiento,

DO₀ la densidad óptica inicial medida a 436 nm, y

DO_t la densidad óptica en el tiempo t medida a 436 nm.

Esta fórmula, mucho más engorrosa de manipular, tiene aplicación cuando se trabaja en la segunda parte de la curva de crecimiento.

Debido a que la iluminación a distintas energías puede producir desplazamientos de la curva de crecimiento, hemos utilizado la segunda fórmula para determinar las tasas de crecimiento de nuestros cultivos, manteniéndose así un criterio de uniformidad en todos ellos.

III.2.2. Evolución del índice DO₄₃₀/DO₆₆₅

El índice propuesto por Margalef, aumenta al envejecer el cultivo, mostrando un pequeño descenso al iniciarse la segunda fase de crecimiento.

Este descenso está de acuerdo con la idea generalizada de que el aumento del crecimiento en una población, ó en este caso de un cultivo, lleva consigo una rápida síntesis de clorofila a, aumentando más lentamente los demás pigmentos.

III.2.3. Evolución de las concentraciones de pigmentos por célula

En concordancia con lo dicho en el apartado anterior, la clorofila a muestra un aumento hasta el día seis del crecimiento, se-

guido de un descenso más o menos rápido (fig. 14).

La concentración de clorofila c por célula aumenta de forma importante en los momentos de división más rápida (tasa de crecimiento elevada), para disminuir después progresivamente (fig. 15).

Los carotenoides totales, que se sintetizan más lentamente, presentan un descenso inicial y un posterior aumento hasta llegar al máximo en el día siete, descendiendo posteriormente (fig. 16).

En general, la tendencia de un cultivo al envejecer es la de aumentar la concentración celular de carotenoides y disminuir la de clorofilas.

III.2.4. Relaciones interpigmentarias

No tiene tanta importancia el comportamiento de cada uno de los pigmentos por separado como pueden tenerlo las variaciones de las relaciones entre grupos de ellos.

La relación carotenoides totales/clorofilas totales disminuye progresivamente (debido a la síntesis activa de clorofila a) durante los primeros días del crecimiento, para aumentar a partir del sexto día, dándonos una idea de la edad del cultivo (de forma más exacta que el índice DO_{430}/DO_{665}) (fig. 17).

La relación clorofila a/clorofila c muestra un aumento progresivo durante toda la fase de crecimiento exponencial, disminuyendo al llegar a la estabilización (fig. 18).

III.3. Efecto de la energía lumínica. Variación de las cantidades absolutas y relativas de los distintos pigmentos

El primer dato que tuvimos que comprobar fue el estado fisiológico del cultivo en el momento de efectuar la extacción de los pigmentos. La energía lumínica bajo la que crece un cultivo condi-

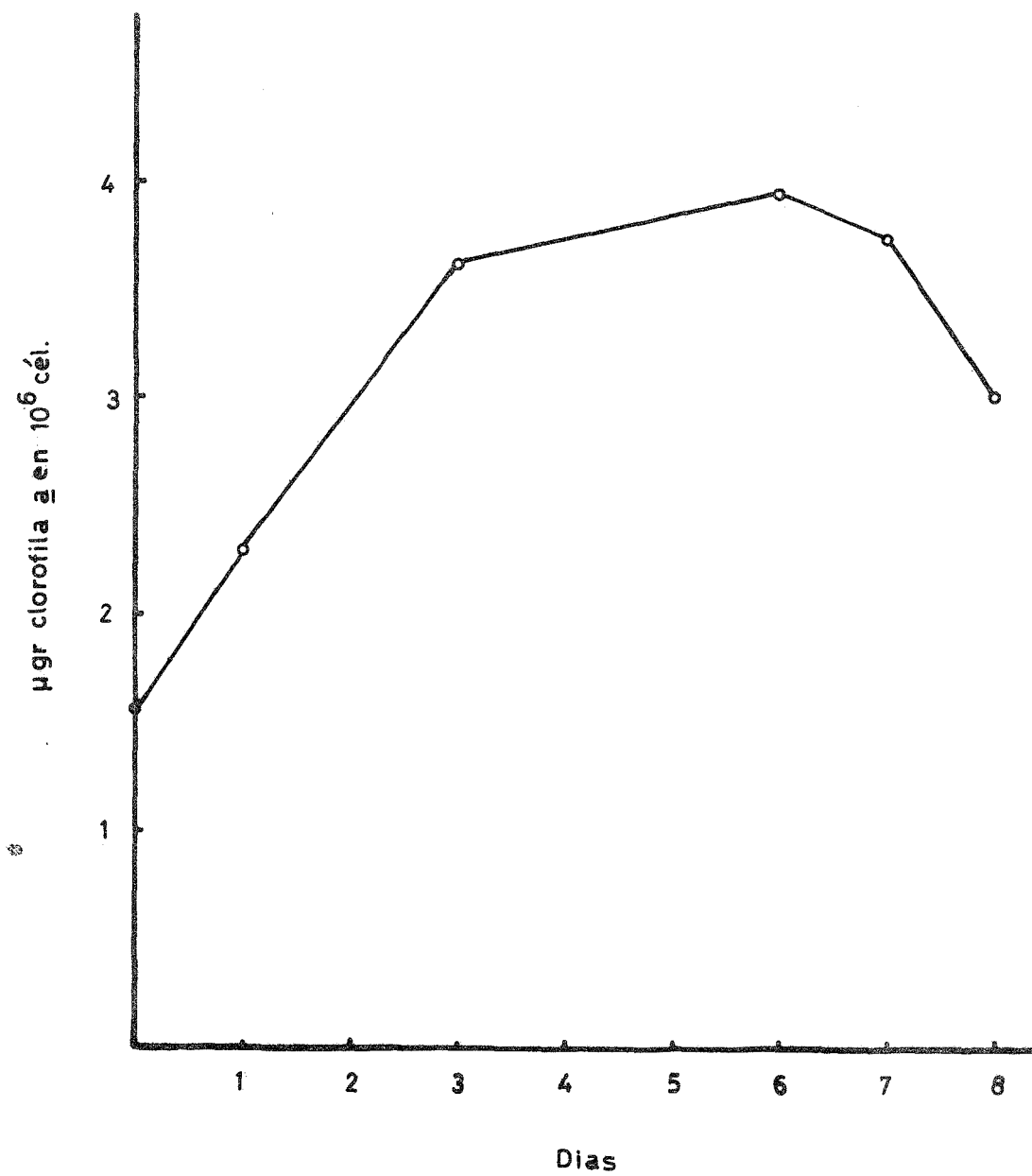


Figura 14. Evolución de la concentración de clorofila a al en vejecer el cultivo.

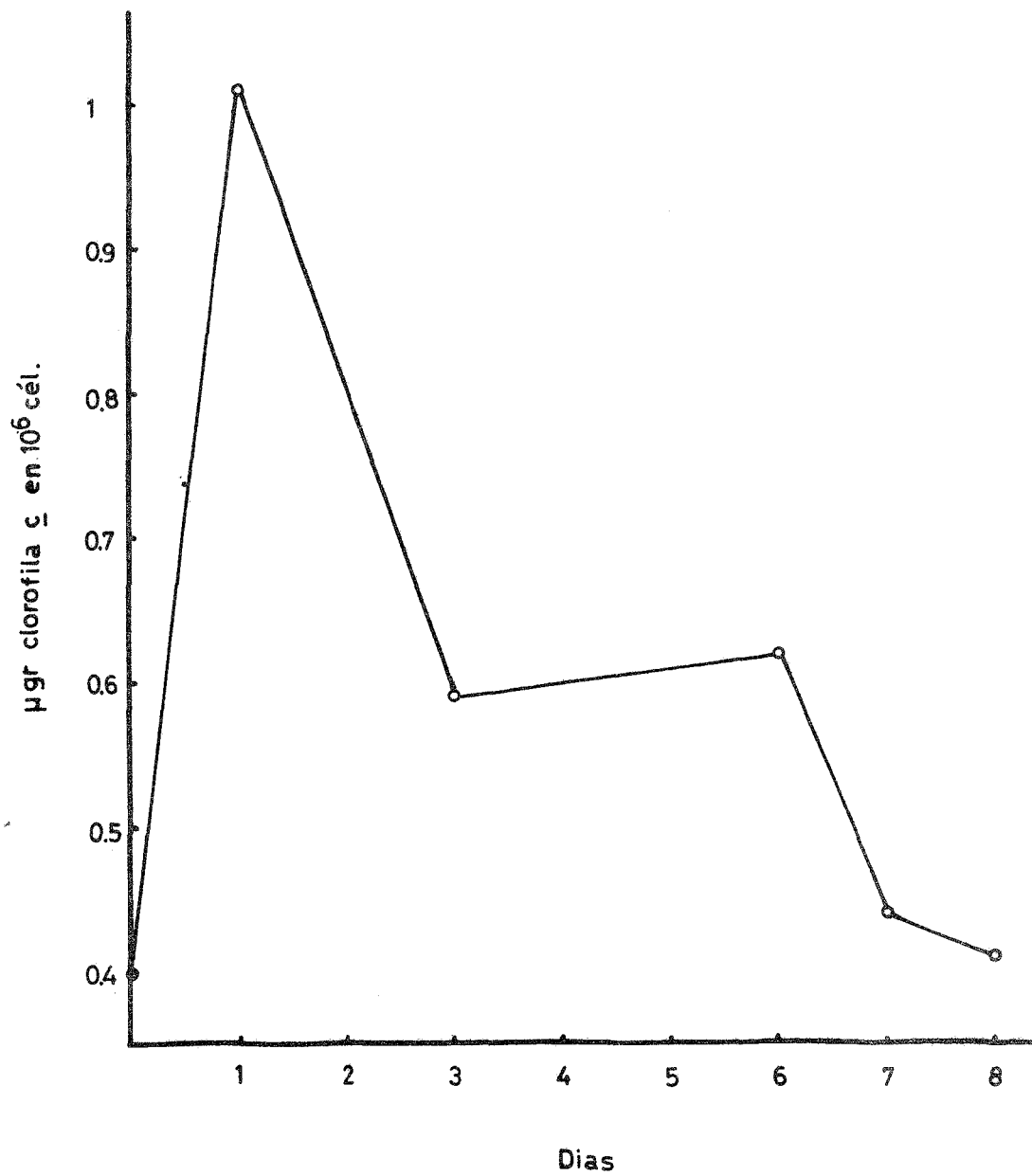


Figura 15. Evolución de la concentración de clorofila c al envejecer el cultivo.

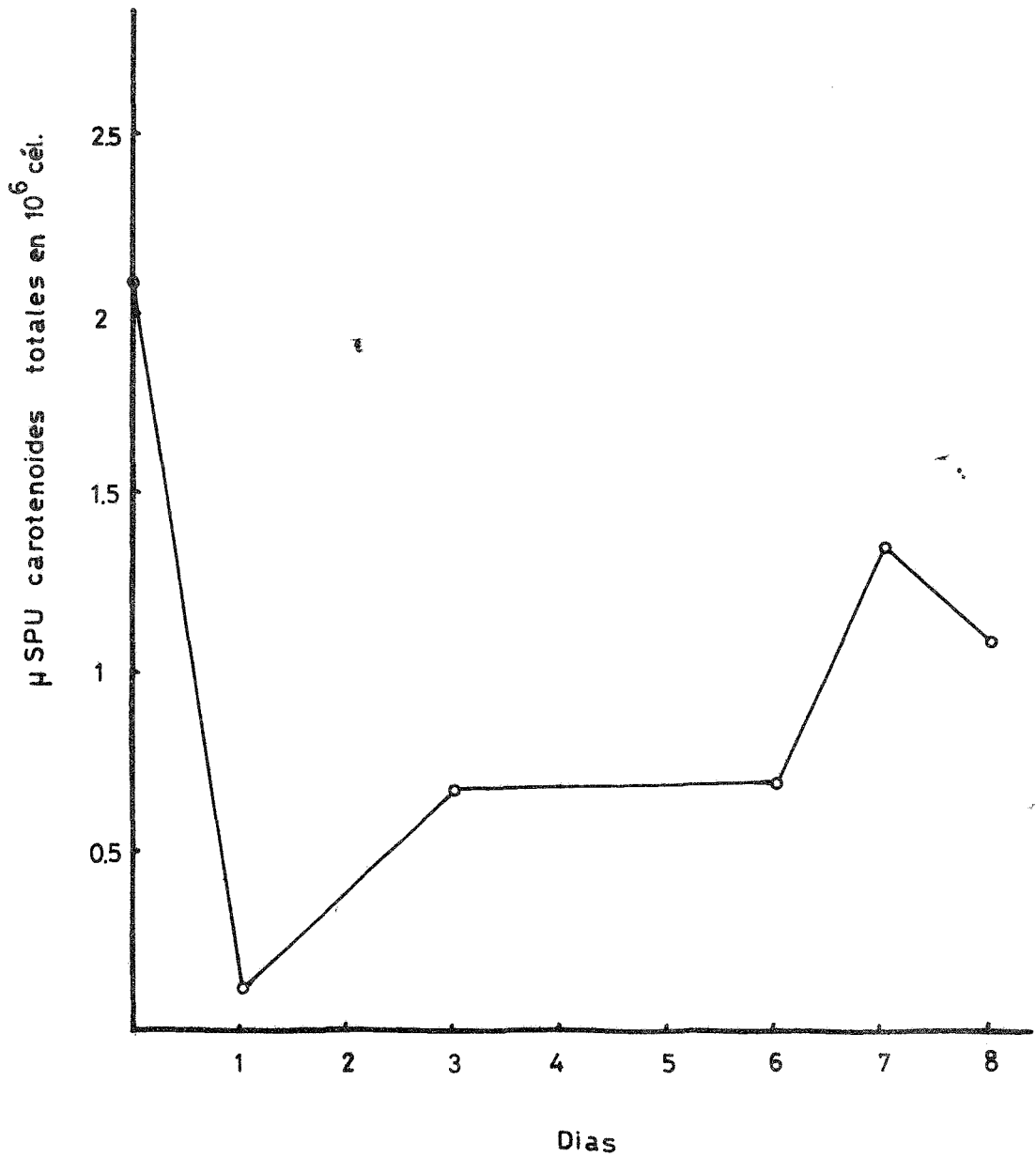


Figura 16. Evolución de la concentración de carotenoides al envejecer el cultivo.

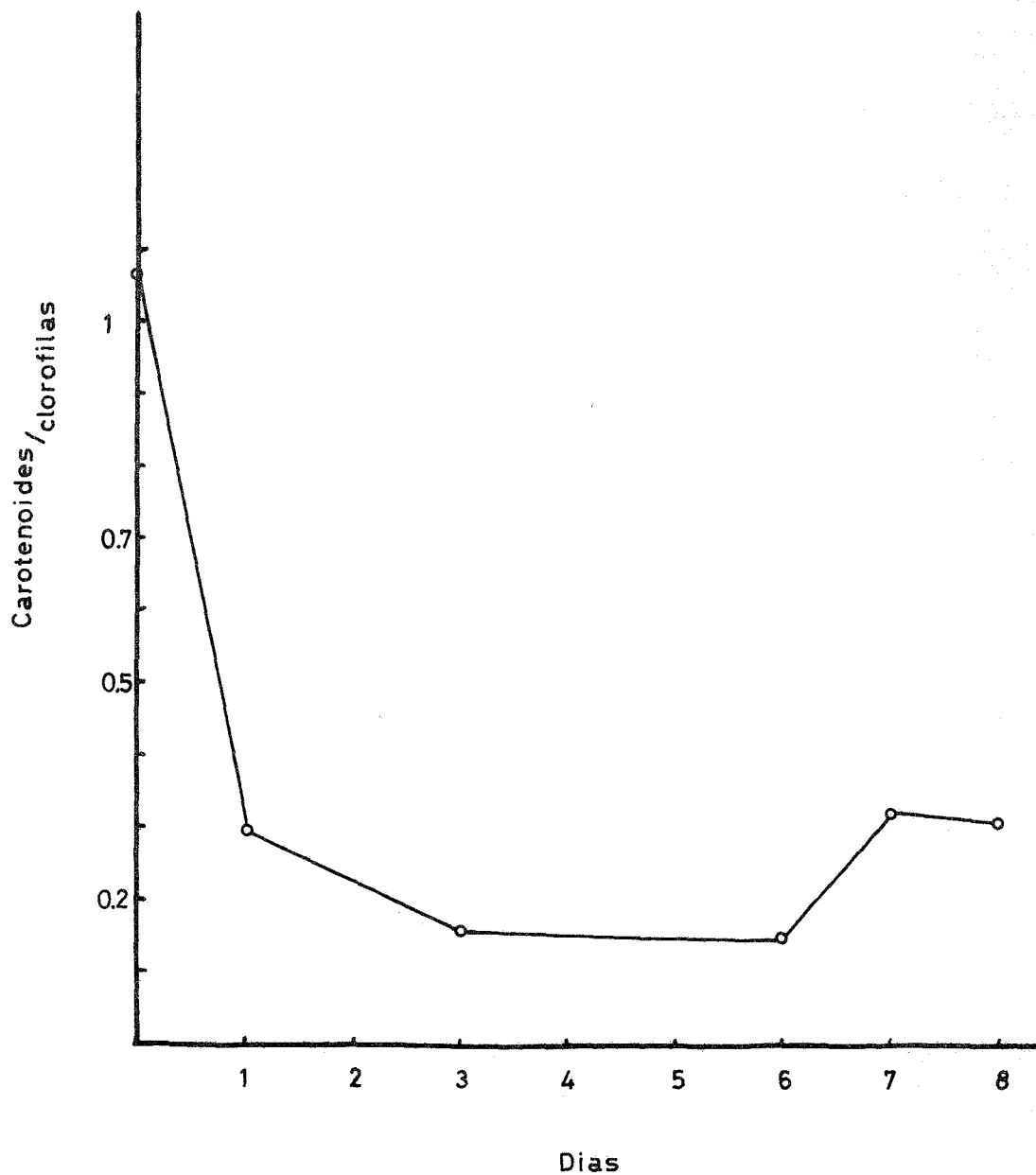


Figura 17. Evolución de la relación carotenoides/clorofilas al envejecer el cultivo.

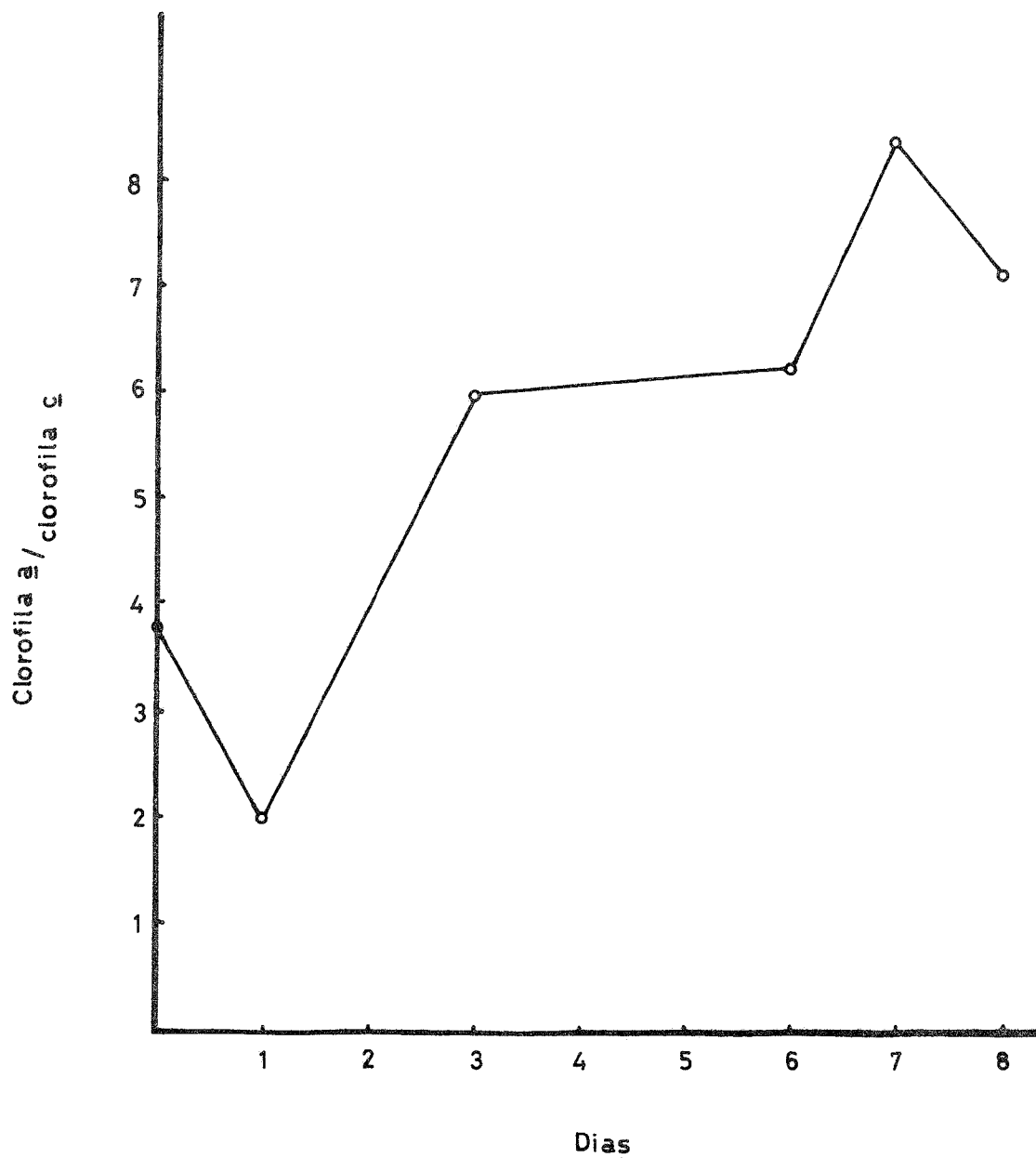


Figura 18. Evolución de la relación clorofila a/clorofila c al envejecer el cultivo.

ciona con certeza la amplitud de las curvas obtenidas en el apartado anterior. Debíamos evitar, pues, caer en el error de intentar comparar datos no comparables, puesto que el número de días de crecimiento no determina la verdadera edad del cultivo. Para controlar el estado fisiológico de los cultivos hemos utilizado la relación carotenoides totales/clorofilas totales, que varía en los cultivos estudiados entre 0,16 y 0,18, haciendo comparables los resultados obtenidos (fig. 19).

Estos resultados están resumidos en las tablas VI y VII.

Tanto la clorofila a como los carotenoides totales disminuyen al aumentar la energía lumínica (figs. 20 y 21).

La clorofila c, en cambio, vuelve a aumentar al cultivar a valores de energía elevados (fig. 22).

La relación clorofila a/clorofila c disminuye a energías elevadas, adquiriendo mayor importancia en éstas el papel de la clorofila c (fig. 23).

Las constantes de crecimiento de los distintos cultivos no muestran grandes variaciones a las distintas intensidades lumínicas y temperaturas. La relación de estas variables está expresada en la figura 24.

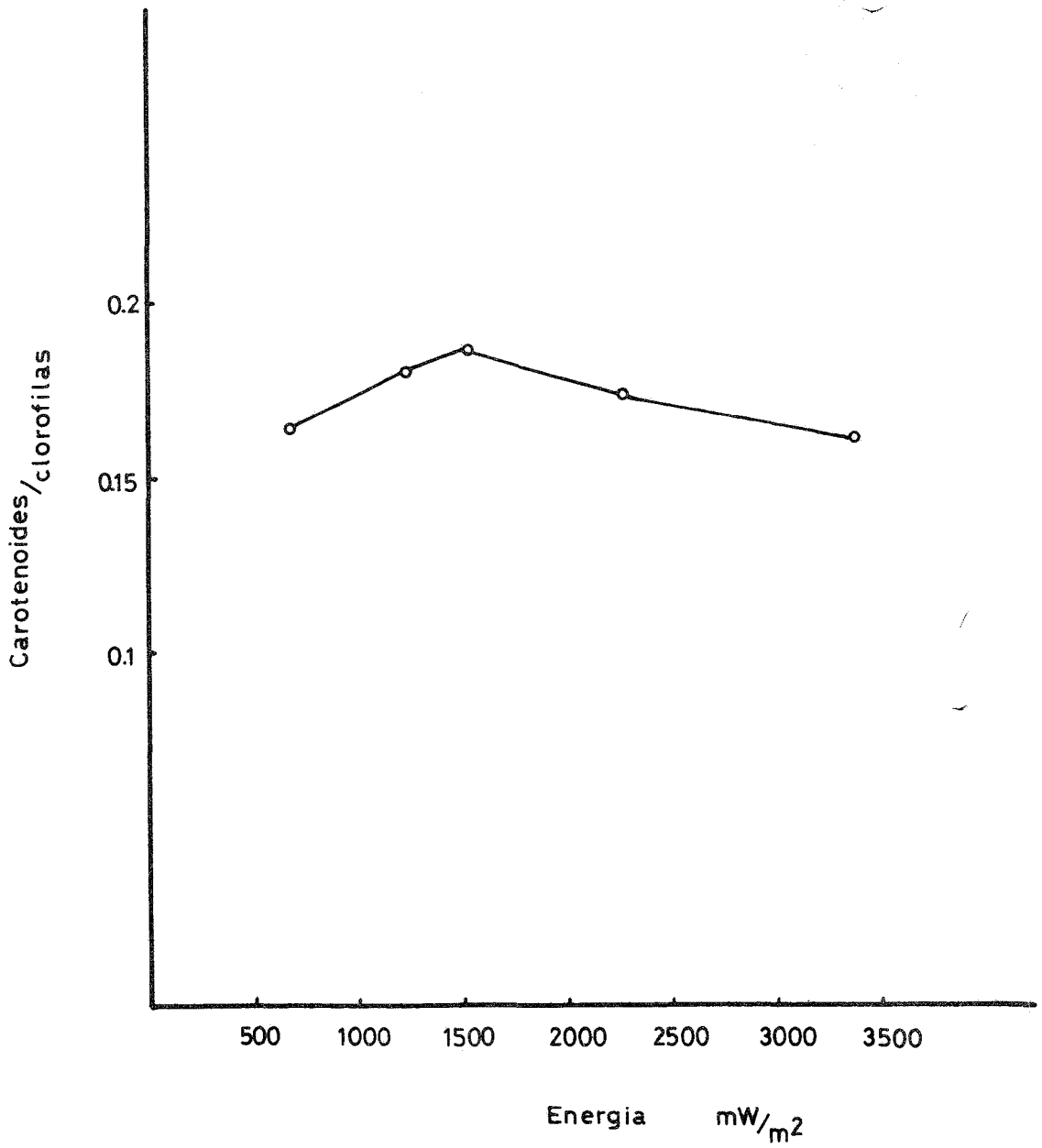


Figura 19. Variación de la relación carotenoides/clorofilas al aumentar la energía lumínica.

Tabla VI. Concentraciones de clorofilas y carotenoides a las distintas energías lumínicas y temperaturas. Las clorofilas están expresadas en μg de pigmento en 10^6 cél. y los carotenoides en μSPU en 10^6 cél.

Energía mW/m^2	3400	2300	1550	1280	690
Temperatura	25°C	21°C	20°C	19°C	16°C
Clorofila <u>a</u>	1,2623	1,6045	1,7863	2,1328	5,9208
Clorofila <u>c</u>	0,5553	0,3330	0,2715	0,3433	0,8377
Carotenoides totales	0,2967	0,3392	0,3870	0,4507	1,1203

Tabla VII. Relaciones interpigmentarias y constantes de crecimiento a las distintas energías lumínicas y temperaturas.

Energía mW/m ²	3400	2300	1550	1280	690
Temperatura	25°C	21°C	20°C	19°C	16°C
<u>Clorofila a</u> <u>Clorofila c</u>	2,2732	4,8177	6,5782	6,2122	7,0677
<u>Carotenoides</u> <u>Clorofilas</u>	0,1632	0,1750	0,1880	0,1804	0,1657
Constante de crecimiento	0,5054	0,4591	0,4700	0,4527	0,4855

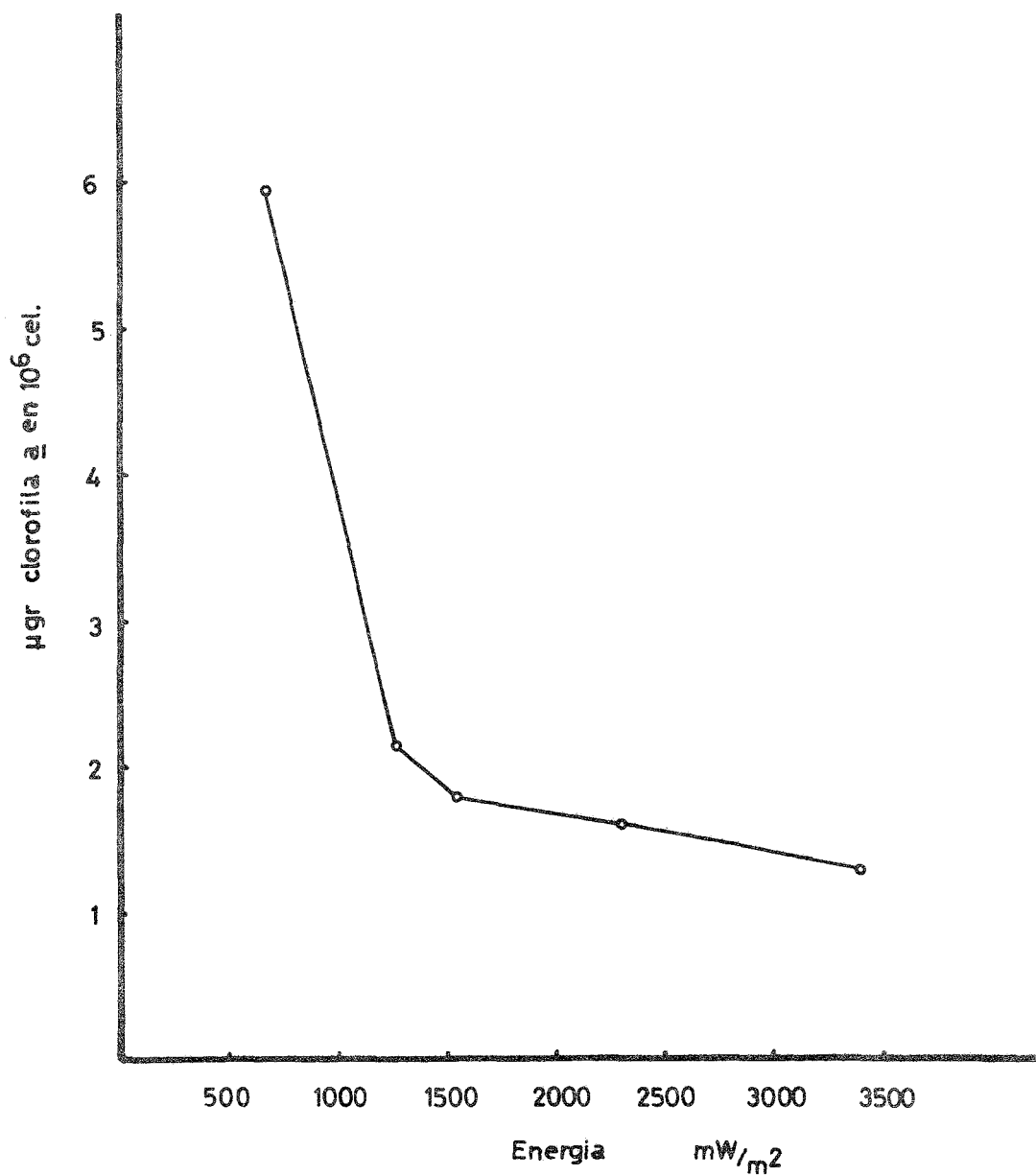


Figura 20. Variación de la concentración de clorofila a al aumentar la energía lumínica.

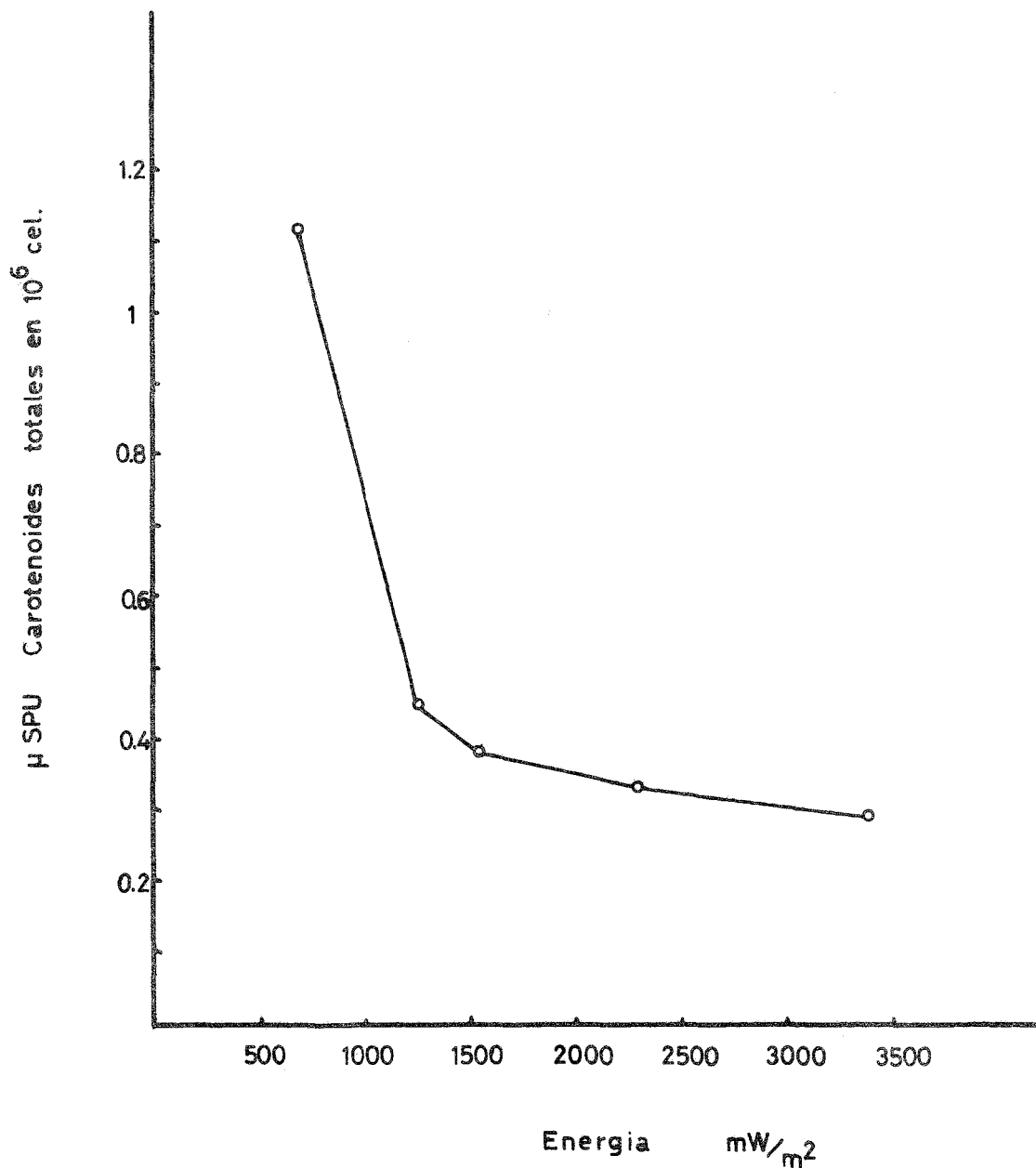


Figura 21. Variación de la concentración de carotenoides al aumentar la energía lumínica.

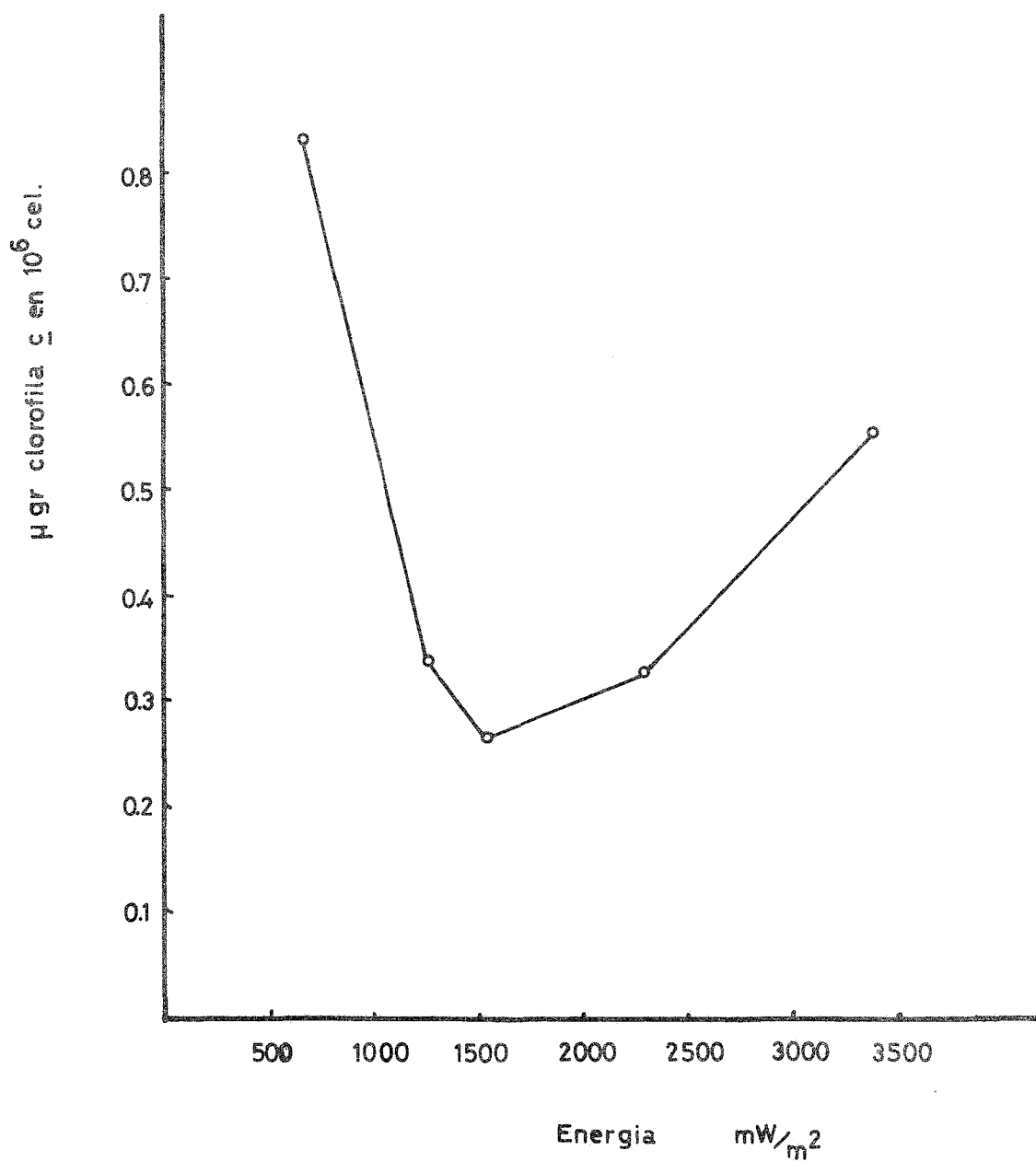


Figura 22. Variación de la concentración de clorofila c al aumentar la energía luminica.

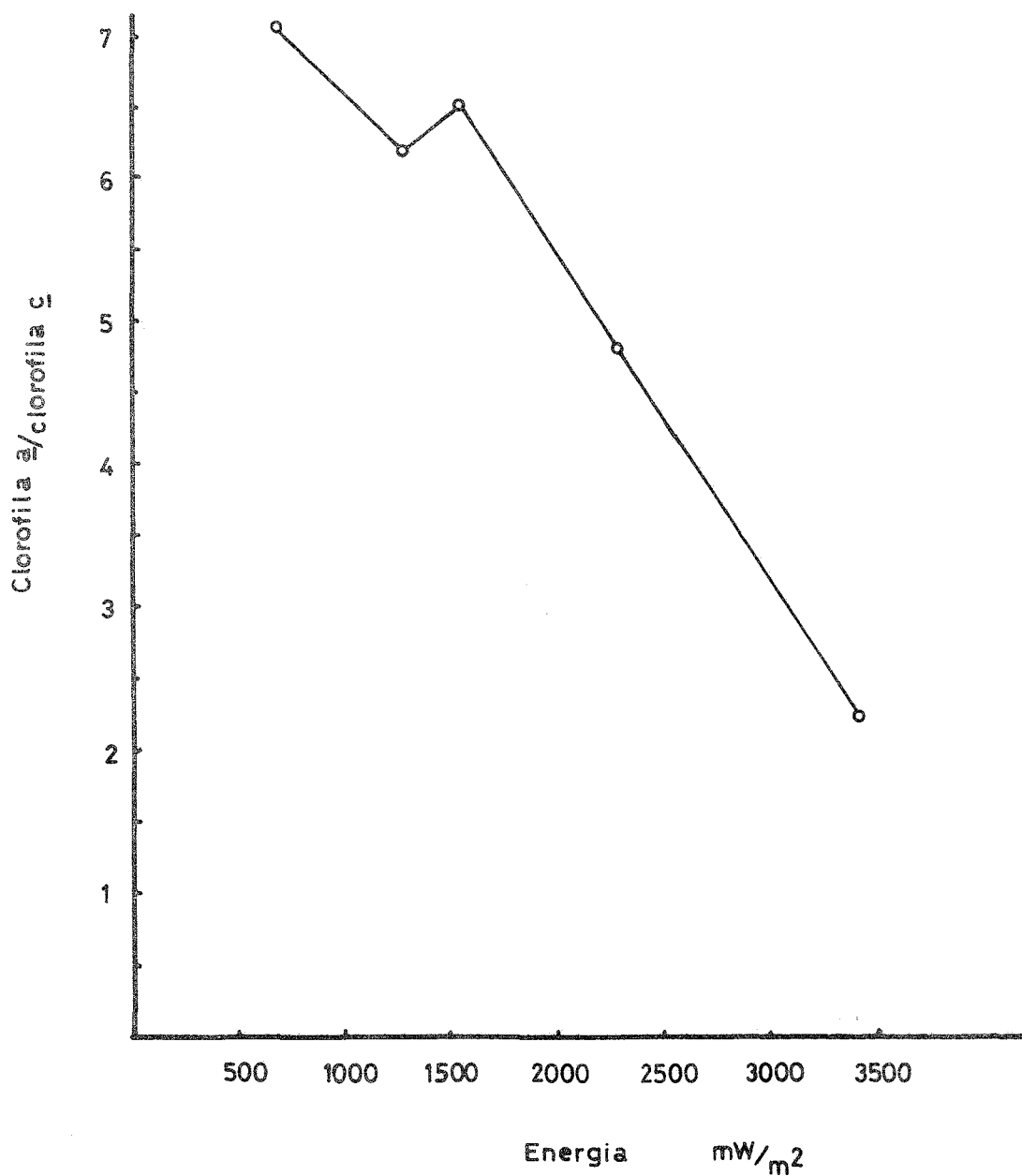


Figura 23. Variación de la relación clorofila a/clorofila c al aumentar la energía lumínica.

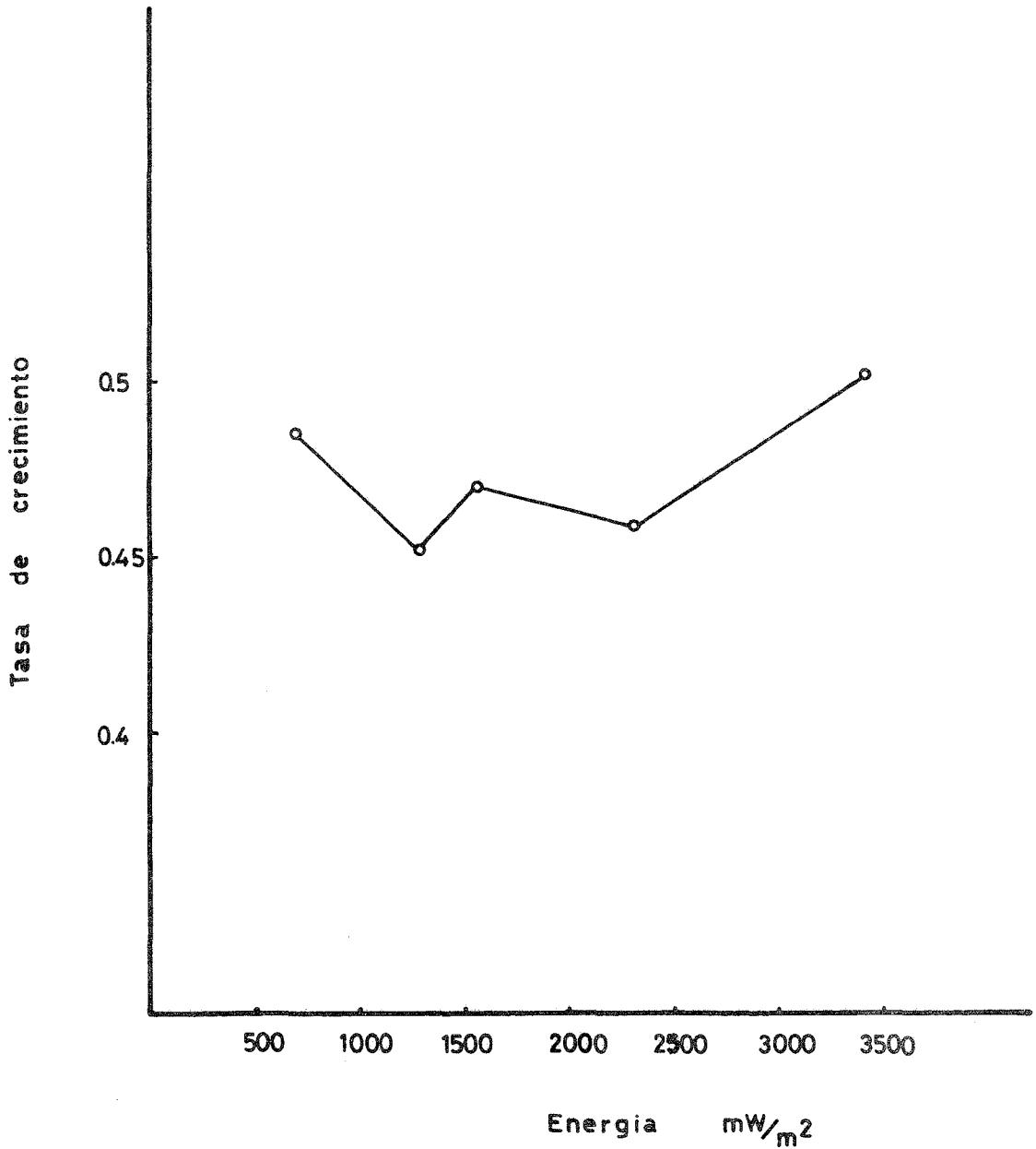


Figura 24. Variación de la tasa de crecimiento al aumentar la energía lumínica.

IV. DISCUSSION

IV. DISCUSION

La curva de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, no concuerda exactamente con el modelo típico. Además las variaciones no se registran en la curva de densidades ópticas. Cabe dentro de lo posible que, debido al fotoperiodo impuesto, hayamos inducido cierta sincronía en el crecimiento del cultivo. Esta afirmación explicaría probablemente los resultados obtenidos. Sin embargo, esta posibilidad no resta valor a los resultados, ya que todos los experimentos se han desarrollado bajo el mismo fotoperiodo.

El decremento de clorofila a al aumentar la energía lumínica está de acuerdo con los resultados obtenidos en cultivos (Beardall y Morris, 1976) y en formas de fitoplancton marino adaptadas a vivir en distintas profundidades (Ryther y Menzel, 1959) entre otros.

Esta respuesta adaptativa de la célula posibilita el mantenimiento del valor máximo de la tasa fotosintética a intensidades saturantes ($p_{m\acute{a}x}$), dentro de unos límites poco variables, en poblaciones que viven a distintas intensidades lumínicas. La escasez lumínica de los organismos que crecen a profundidades elevadas se ve compensada por un aumento del número de unidades de clorofila por célula, alcanzando así valores de $p_{m\acute{a}x}$ incluso superiores a los de organismos que disponen de cantidades óptimas de luz.

Los carotenoides, considerados como auxiliares de la clorofila a en la misión de captar energía, demuestran estar muy ligados a ésta. Su variación con la energía lumínica es paralela a la de la clorofila a. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este trabajo hemos variado únicamente la cantidad de luz que es utilizada por las algas, pero no su calidad. Así, un organismo que habite a una determinada profundidad recibirá un espectro lumínico distinto al de un alga de superficie, debido al efecto filtrador del agua de mar. En estas condiciones, será la distinta capacidad de los pigmentos de absorber en mayor ó menor grado las distintas longitudes de onda la que condicionará las relaciones interpigmentarias en la célula. Cabe suponer, pues, que la relación carotenoides/clorofilas en el ecosistema propio del alga sea distinta a la hallada por noso

tros.

Los valores de clorofila c hallados al variar la energía lumínica son distintos a los hallados para la clorofila a y los carotenoides. Mientras en la primera mitad de la curva las variaciones son más ó menos similares (al aumento de la energía lumínica corresponde un decremento de la cantidad de clorofila c por célula), en la segunda parte los resultados son muy distintos. A partir de un cierto valor de la energía, la cantidad de clorofila c por célula vuelve a aumentar.

Si bien Parsons (1961), cita un aumento de la cantidad de clorofila c bajo ciertas condiciones (elevada intensidad lumínica, baja temperatura y deficiencia de nutrientes), no se tenían datos que cuantificaran este aumento y lo relacionasen con los demás pigmentos. A la vista de estos datos, parece ser que la clorofila c aumenta cuando el organismo se encuentra frente a condiciones de vida dificultosas. Esta idea concuerda con los datos obtenidos en cultivos muy jóvenes, en los que la relación clorofila a/clorofila c es muy pequeña (el inicio de la colonización de un nuevo medio siempre es una situación dificultosa).

Es posible que el aumento de la temperatura por encima del óptimo en los cultivos crecidos a mayor energía lumínica sea también un factor condicionante de la concentración de la clorofila c por célula.

Si comparamos los espectros de absorción de la clorofila a y de la clorofila c vemos que ésta absorbe fuertemente en la banda solet, pero que apenas absorbe en la zona del rojo (fig. 25). Esta diferencia es lógica si tenemos en cuenta que la clorofila c no es propiamente una clorofila, sino que es un pigmento ácido más próximo al grupo de las clorofilidas (grupo que en nuestras cromatografías se mantiene en $R_F=0$). Vemos pues que la clorofila c puede constituir una gran ayuda a la clorofila a en condiciones extremas, difíciles para el crecimiento. Sin embargo, la clorofila c adquiere mayor importancia en condiciones de elevada energía lumínica. Esto puede ser debido a una mayor resistencia de este pigmento a la fotooxidación. Posiblemente, la aparición de la clorofila b en los clorófitos, y posteriormente en las plantas superiores, responde a la necesidad en estos organismos, que generalmente viven cerca de la superficie, de un pigmento que sea mucho más resistente a la fo-

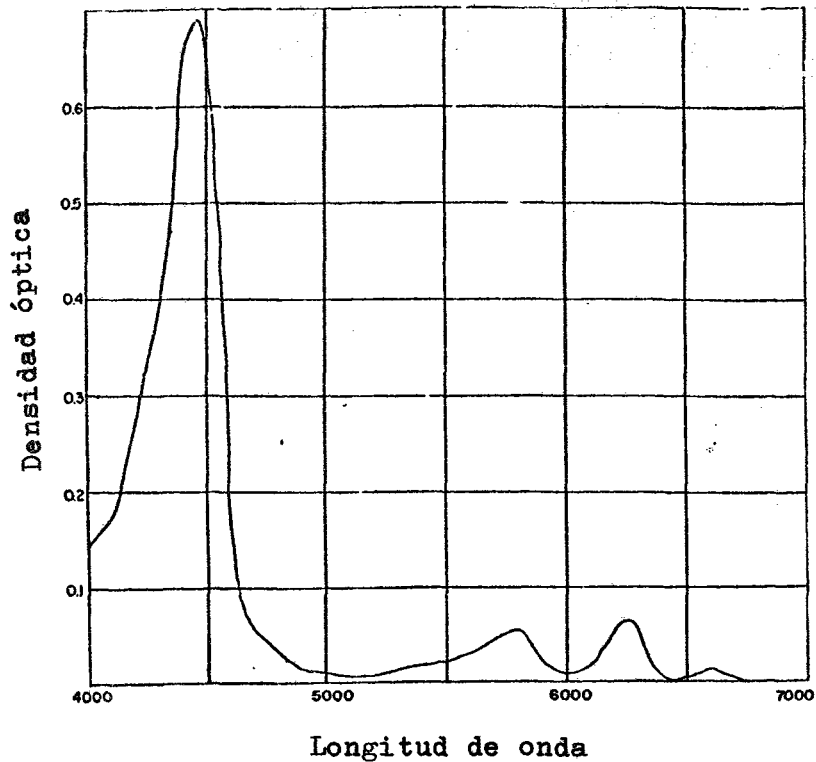


Figura 25. Espectro de absorción de la clorofila c en éter (según Parsons).

tooxidación, condición que cumple la clorofila b (es muy difícil que aparezca feofitina b al manipular los pigmentos, mientras que la clorofila a se feofitinizaba rápidamente). La clorofila b, tiene además la propiedad de tener un espectro de absorción más parecido al de la clorofila a, aunque también absorbe menos en la zona del rojo, pero tiene mayor absorción que ésta en la banda solet.

La importancia de la clorofila c en el cultivo puede ser seguida mediante el índice clorofila a/clorofila c, representado en la figura 23. Podemos observar que tiene un máximo a energías intermedias (menor importancia de la clorofila c) y que disminuye a energías elevadas.

Las tasas de crecimiento muestran escasa variación con la variable luz-temperatura. El cultivo crecido a mayor energía lumínica tiene una tasa más elevada, debido a que su extracción se realizó a un tiempo menor que en los demás cultivos. Posiblemente este valor sería más parecido a los otros de haberse realizado la extracción a igual tiempo.

Creemos que este estudio completa los datos conocidos sobre las formas de fitoplancton adaptado a vivir en distintas profundidades.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

En este apartado exponemos de forma escueta las principales conclusiones que se infieren como resultado del trabajo. Son las siguientes:

1. La relación densidad óptica-número de células no es lineal. A partir de un cierto valor del número de células por mililitro, a repetidos aumentos de éste corresponden incrementos de densidad óptica gradualmente menores.
2. Es posible deducir una ecuación que permite calcular la tasa de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin en cultivo de laboratorio a partir de la densidad óptica.
3. La tasa de crecimiento disminuye progresivamente al envejecer el cultivo (la disminución durante los primeros siete días es prácticamente lineal).
4. La concentración de clorofila c por célula aumenta al comienzo de la fase de crecimiento exponencial y disminuye posteriormente.
5. Cuando el cultivo es joven se caracteriza por una síntesis activa de clorofilas; al envejecer aumenta la síntesis de carotenoides. El periodo de síntesis activa de clorofila c tiene menor duración que el de clorofila a. Mientras dura este periodo la relación clorofila a/clorofila c alcanza su menor valor.
6. La tasa de crecimiento muestra escasa variación con la variable luz-temperatura.
7. La concentración de clorofila c por célula aumenta a energías lumínicas elevadas. La relación clorofila a/clorofila c disminuye al aumentar la energía lumínica. Este hecho maximiza la importancia de la clorofila c como auxiliar de la clorofila a en condiciones de vida dificultosas.

8. La adaptación del fitoplancton marino a ambientes profundos (con escasa energía luminosa), repercute en un aumento global de la concentración de los pigmentos que constituyen el aparato fotosintetizador, como se ha puesto de manifiesto en experiencias realizadas con *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

VI. RESUMEN

VI. RESUMEN

El nacimiento del concepto de especies umbrofilicas y heliofílicas trajo consigo un profundo estudio de estos dos tipos, encaminado a determinar sus características diferenciales. Los estudios realizados intentan comprender el mecanismo a través del cual el fitoplancton puede adaptarse a hábitats de distintas condiciones lumínicas. Así se han estudiado las variaciones de la tasa fotosintética máxima a intensidades saturantes ($p_{máx}$) bajo los distintos valores de las variables luz y temperatura.

El objetivo de este trabajo es el de cuantificar las variaciones absolutas y relativas de los distintos componentes del sistema pigmentario de una diatomea marina cultivada a distintos valores de la variable luz-temperatura.

La técnica de cromatografía en capa fina nos ha permitido separar los pigmentos fotosintetizadores, que han sido identificados a partir de sus espectros de absorción. Asimismo mediante experimentos realizados bajo condiciones constantes hemos conocido su dinámica de crecimiento. Estos experimentos han posibilitado el desarrollo de una ecuación para calcular las tasas de crecimiento a partir de las densidades ópticas del cultivo.

Como conclusión principal se enfatiza el papel de la clorofila c en condiciones adversas y su importancia como pigmento resistente a la fotooxidación.

- BIBLIOGRAFIA -

- BALLESTER, A.- 1966. Crítica de los métodos espectrofotométrico y cromatográfico en el estudio de los pigmentos del plancton. Investigación Pesquera, 30: 613-630.
- BALLESTER, A.- 1973. Regularidad y heterogeneidad en los pigmentos fotosintetizadores. Investigación Pesquera, 37(2): 245-293.
- BEARDALL, J. y I. MORRIS.- 1976. The concept of light intensity adaptation in marine phytoplankton: some experiments with *Phaeodactylum tricornutum*. Mar. Biol., 37: 377-387.
- FOY, R.H., C.E. GIBSON y R.V. SMITH.- 1976. The influence of day-length, light intensity and temperature on the growth rates of planktonic blue-green algae. Br. Phycol. J., 11: 151-163.
- INGRAM, N.- 1964. An introductory account of the smaller algae of british coastal waters. Part IV, Bacillariophyceae, 269-270.
- JEFFREY, S.W.- 1968. Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. Biochem. Biophys. Acta, 162: 271-285.
- JEFFREY, S.W.-1974. The effect of blue light on photosynthetic pigments and chloroplast ultrastructure in the marine diatom *Stephanopyxis turris*. Mar. Biochem. Unit, Annual Report, 1973-1974, July 1-June 30: 17-21.

- JEFFREY, S.W.- 1974. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in algae, phytoplankton and higher plants. Mar. Biochem. Unit, Annual Report, 1973-1974, July 1-June 30: 6-8.
- JITTS, H.R., C.D. McALLISTER, K. STEPHENS y J.D.H. STRICKLAND.- 1964. The cell division rates of some marine phytoplankters as a function of light and temperature. J. Fish. Res. Bd. Canada, 21(1): 139-157.
- LEWIN, J.C., R.A. LEWIN y D.E. PHILPOTT.- 1958. Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. J. Gen. Microbiol., 18: 418-426.
- MADGWICK, J.C.- 1966. Chromatographic determination of chlorophylls in algal cultures and phytoplankton. Deep-Sea Res., 13: 459-466.
- MARGALEF, R.- 1974. Ecologia. Omega, 951 pp.
- McALLISTER, C.D., N. SHAH y J.D.H. STRICKLAND.- 1964. Marine phytoplankton photosynthesis as a function of light intensity: a comparison of methods. J. Fish. Res. Bd. Canada, 21(1): 159-181.
- MORRIS, I. y H.E. GLOVER.- 1974. Questions on the mechanisms of temperature adaptation in marine phytoplankton. Mar. Biol., 24: 147-154.
- PARSONS, T.R.- 1961. On the pigment composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada, 18(6): 1017-1025.
- PARSONS, T.R. y J.D.H. STRICKLAND.- 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. J. Mar. Res., 21(3): 155-163.

- RICHARDS, F.A. y T.G. THOMPSON.- 1952. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. J. Mar. Res., 11(2): 156-172.
- RILEY, J.P. y T.R.S. WILSON.- 1965. The use of thin-layer chromatography for the separation and identification of phytoplankton pigments. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 45: 583-591.
- RYTHER, J.H. y D.W. MENZEL.- 1959. Light adaptation by marine phytoplankton. Limnol. Oceanograph., 4: 492-497.
- STRICKLAND, J.D.H. y T.R. PARSONS.- 1960. A manual of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Canada, n^o 125, 185 pp.