

Inv. Pesq.	46 (1)	págs. 91-119	febrero, 1982
------------	--------	--------------	---------------

Estudio de los factores que afectan la asimilación y la excreción de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin en cultivos de volumen limitado *

M. MARTÍ VIUDES

Instituto de Investigaciones Pesqueras de Barcelona
Paseo Nacional, s/n. Barcelona-3
Dirección actual: Llull, 229, esc B, ático 4^a. Barcelona-5.

Palabras clave: *Phaeodactylum tricornutum*, productividad primaria, excreción, nutrientes, iluminación, pigmentos fotosintéticos.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*, primary production, excretion, illumination, nutrients, photosynthetic pigments

RESUMEN: Con el objetivo de conocer la dinámica de la productividad primaria y la excreción de la diatomea litoral *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin en cultivos de volumen limitado, se configuraron una serie de experimentos a través de los cuales se abordó el estudio de la influencia de los siguientes parámetros: abundancia o carencia de amonio, nitrato, nitrito, fosfato y carbono inorgánico; intensidad lumínica; iluminación continuada y alternancia de luz y oscuridad. Sólo uno de los experimentos se realizó en condiciones axénicas. Como complemento de los objetivos expuestos, el trabajo ha abordado también el estudio de la concentración de los pigmentos fotosintéticos, influencia del pH, influencia de catabolitos presentes en el medio de cultivo y actividad heterotrófica bacteriana.

La carencia o ínfima concentración de amonio, nitrato y fosfato, no comportan una variación apreciable en los niveles de excreción del cultivo, afectando en cambio a la productividad primaria, lo cual conduce a que el crecimiento de la población celular decaiga. En todos los experimentos se han registrado unos valores de excreción mayores durante la fase de crecimiento exponencial; esta excreción decrece posteriormente en orden inverso al crecimiento celular. Excepto para esas primeras fases de crecimiento del cultivo, todo parece indicar que existe una dinámica de excreción constante. No obstante, hemos apreciado un ligero incremento de la excreción de materia orgánica en cultivos sometidos a bajas intensidades lumínicas.

SUMMARY: FACTORS AFFECTING THE ASSIMILATION AND EXCRETION RATE ON *Phaeodactylum tricornutum* BOHLIN IN BATCH CULTURES — In order to know the primary production and the dynamics of the release of organic matter from the littoral diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin in limited volume cultures, it has been built a serie of experiments through which we have studied the influence of the following parameters: abundance or lack of ammonia, nitrate, nitrite, phosphate and inorganic carbon; light intensity; continuous illumination and alternation of light and darkness. Only one of the cultures has been axenic. Besides the objectives explained above, the work has undertook the study of photosynthetic pigments concentration, pH influence, presence of catabolites in the culture media and bacterial heterotrophic activity.

The lack or deficient concentration of ammonia, nitrate and phosphate don't give any appreciating variation in the culture excretion levels, but the primary

* Recibido el 15 de julio de 1981. Este trabajo es un resumen de la memoria que bajo el título «Balance asimilación-excreción en cultivos convencionales de *Phaeodactylum tricornutum* BOHLIN» presentó el autor para optar al grado de Doctor en Biología en la Universidad Autónoma de Barcelona

production is affected, decaying the cellular growth. In all experiments it has been noticed the highest excretion values when the exponential phase is taking place, posteriorly decreasing in an inverse order than cellular growth. Except for these first phases of the culture growth, it seems to exist a constant dynamic of excretion. Nevertheless, we have observed a slight release of organic matter enhancement in cultures under low light intensities.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día se sabe con certeza que las poblaciones fitoplanctónicas pueden liberar al medio externo una parte substancial del carbono fijado en la fotosíntesis, en forma de materia orgánica disuelta. Estos productos extracelulares pueden jugar un importante papel en el crecimiento del alga y su fisiología, así como también en las cadenas tróficas acuáticas subsidiarias. El hecho de no tener en cuenta este factor puede introducir serios errores en los estudios de productividad primaria de comunidades acuáticas.

La naturaleza de los productos liberados es muy diversa (STEWART, 1974), si bien el ácido glicólico es probablemente el mayor componente de la fracción orgánica extracelular liberada durante la fotosíntesis del fitoplancton y probablemente juega un importante papel en la transferencia de energía en los ambientes acuáticos (SHAH y FOGG, 1973).

En estudios de campo, este compuesto ha llegado a constituir el 35 % del carbono orgánico excretado (AL-HASSAN y COUGHLAN, 1976).

FOGG (1965) ha sugerido que el ácido glicólico excretado por las células es un factor que estimula el crecimiento de determinadas especies. Asimismo este producto podría actuar como reserva extracelular para ser utilizado en condiciones desfavorables para la fotosíntesis.

Si bien la pérdida de contenido celular puede ocurrir por autólisis o cualquier tipo de lisis celular, en particular durante la fase estacionaria de crecimiento, el interés de nuestro estudio se centra en la liberación de sustancias simples por parte de células sanas, que probablemente tiene lugar por difusión a través de la membrana celular.

La magnitud de la producción de compuestos extracelulares puede depender de los factores fisiológicos y ambientales que afectan a la permeabilidad de la membrana y a la concentración intracelular de metabolitos simples (GUILLARD y HELLEBUSI, 1971).

El nexo entre factores ambientales y excreción aparece claro en el caso de los nutrientes. La abundancia o carencia en el medio de uno de ellos puede provocar en mayor o menor grado la variación del metabolismo y composición intracelular (YENISCH y VACCARO, 1958; BERLAND *et al.*, 1970; HEALEY y HENDZEL, 1975; GLOVER, 1977).

Numerosos estudios de producción extracelular fitoplanctónica realizados en el medio natural, indican que tal excreción es proporcionalmente más alta

en aguas oligotróficas que en aguas eutróficas (ANDERSON y ZEUSCHEL, 1970; THOMAS, 1971; BERMAN y HOLM-HANSEN, 1974).

Son también numerosos los estudios que han pretendido validar los resultados de excreción fitoplanctónica obtenidos en la naturaleza, mediante cultivos en laboratorio. Los resultados obtenidos en uno y otro caso por los diversos autores son altamente dispares tanto en los valores cuantitativos como en los factores señalados como principales inductores de esa excreción (NALEWAJKO, 1966; RYHER *et al.*, 1971; SCHINDLER y HOLMGREN, 1971; HUNISMAN, 1972; IGNIADIS y FOOG, 1973; WILLIAMS y YENISCH, 1976; etc.). Parece claro que los estudios de laboratorio deben restringirse a cultivos monoalgales, puesto que cada especie posee un metabolismo propio y en muchos casos claramente diferenciado.

Los factores estudiados aparecen en el diagrama de flujo de la figura 1.

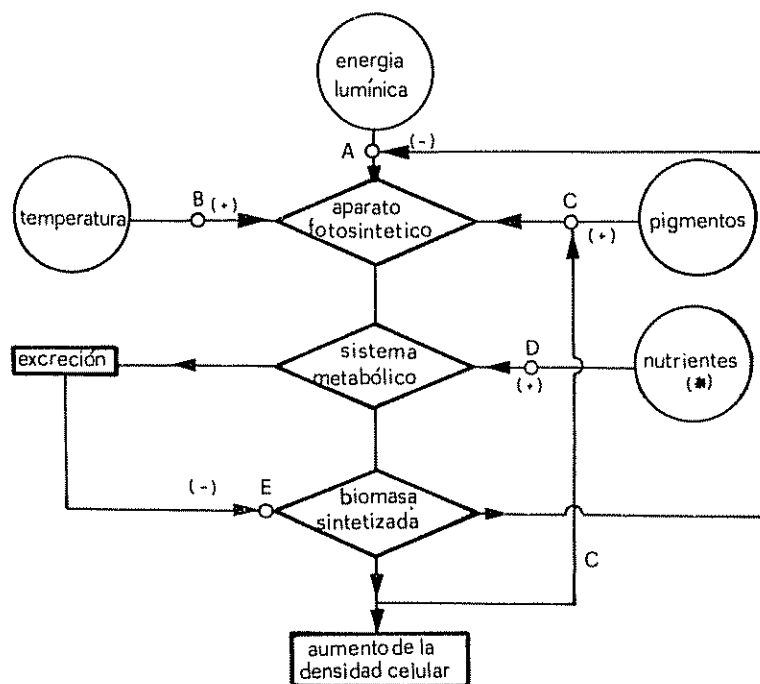


FIG. 1. — Diagrama de flujo Esquema de los diferentes parámetros objeto de estudio, implicados en el desarrollo de *Phaeodactylum tricornutum*. Puntos de Control: A: Luz, cantidad de energía lumínica que llega al sistema fotosintético. B: Temperatura, influyendo sobre el rendimiento del sistema fotosintético. C: Pigmentos, como elementos traductores de la energía. D: Nutrientes: silicato, fosfato, amonio, nitrato, carbono, para la construcción de biomasa y biosíntesis pigmentaria. E: Excreción, sustancias catabolizadas que pueden influir en el crecimiento. (*) Un factor no representado es el pH, cuya variación depende de la actividad biológica, de la concentración iónica del medio, de la de carbono inorgánico y de la tamponación. Las variaciones de pH pueden influir sobre el crecimiento del organismo.

Para ello han sido diseñados varios experimentos que se han configurado en función de los parámetros objeto de estudio. La elección de *Phaeodactylum tricorutum* para realizar esta experimentación ha sido motivada por el hecho de que, aun siendo un organismo muy estudiado, existe escasa información respecto a los procesos de excreción, además de que su desarrollo en cultivos de volumen limitado es regular.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa utilizada fue aislada de una muestra procedente del puerto de Barcelona. Como medios de cultivo han sido usados un medio indefinido basado en el propuesto por GUILLARD y RYHER (1962), si bien modificado por BLASCO (1971) y otro definido, el S-36 propuesto por DROOP (1965).

Los cultivos han sido mantenidos en una cámara isotérmica a temperatura constante de 15,5°C, sometidos a una iluminación de 4000-4500 lux (fluorescentes Mazda tipo «luz de día»). Dicha intensidad está próxima al nivel de saturación de la especie, en las condiciones de nuestros experimentos (5000 lux). En distintos experimentos se ha utilizado un ciclo partido de 16 h de luz y 8 de oscuridad. Otra modificación la constituyó la utilización de luz atenuada.

Algunos cultivos han sido axénicos; éstos se obtuvieron mediante resiembras sucesivas sobre medio sólido y también utilizando antibióticos según el proceso expuesto por GUILLARD (STEIN, 1973).

En varios experimentos se utilizaron medios de cultivo (no tamponados), con el objeto de no enmascarar los valores de carbono orgánico disuelto. En este caso el pH ha sido diariamente restituido a su valor original, añadiendo HCl (0,1 N) directamente al medio de cultivo. Dichas adiciones parecen no afectar el normal desarrollo de cultivo.

La determinación de los iones nitrato, nitrito y fosfato se efectuó mediante autoanalizador Technicon A-II, según los métodos descritos por SIRICKLAND y PARSONS (1968). El ion amonio fue determinado según el método de KOROLEFF (1970).

El carbono inorgánico y el carbono orgánico disuelto fueron determinados mediante análisis cromatográfico (monitor de carbono total «Carlo Erba» — Series 400 TCM). Las determinaciones del carbono inorgánico se han realizado poco después de tomar la muestra, para evitar la incorporación de CO₂ en muestras infrasaturadas.

Hemos considerado como materia orgánica disuelta toda aquella que no es retenida por filtros Whatman GF/C (diámetro 1,2 µm). A pesar de que la fracción filtrada pueda contener bacterias (ya que la mayoría de nuestros cultivos no han sido axénicos), hemos considerado estas bacterias como materia orgánica disuelta que se ha particulado.

La determinación de la productividad primaria se efectuó según el método introducido por STEEMAN NIELSEN (1952) basado en la incorporación de ¹⁴C,

posteriormente modificado por STRICKLAND y PARSONS (1968). La radiactividad incorporada a las células se determinó con un contador de centelleo líquido Beckman LS-150. La duración de las incubaciones ha sido de una hora, y el número de células retenidas en el filtro ha oscilado siempre alrededor de 10^6 (ya que reteniendo un número de células superior pueden aparecer problemas de autoabsorción). Para determinar la excreción se utilizó el método propuesto por SCHINDLER y NIGHSWANDER (1970) y SCHINDLER y HOLMGREN (1971). En ambas determinaciones se utilizó líquido de centelleo Unisolve I (Koch Light Laboratories Ltd).

El análisis cualitativo de clorofilas y carotenoides se realizó con un espectrofotómetro UV-visible de doble haz, Varian Techtron, a partir de extractos acetónicos totales, utilizando ecuaciones di y tricromáticas: clorofilas *a* y *c* (JEFFREY y HUMPHREY, 1975); carotenoides totales (RICHARDS y THOMPSON, 1952, modificado posteriormente por PARSONS y STRICKLAND, 1963).

Para la determinación del ^{14}C incorporado a los pigmentos fotosintéticos de cultivos marcados, se ha procedido a la separación cromatográfica de extractos pigmentarios totales, sobre capa fina de gel de sílice. Una vez individualizados los pigmentos, se ha procedido a su valoración mediante contador de centelleo líquido. Nuestras evaluaciones han quedado restringidas a la clorofila *a*, β -caroteno y xantofilas, quedando excluida la clorofila *c*, ya que ésta se sitúa en $R_F = 0$, zona del cromatograma en la que quedan retenidos compuestos lipídicos fuertemente marcados (BALLESIER, 1973).

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

El primer experimento fue diseñado con el fin de observar la dinámica de crecimiento y de nutrición de *Phaeodactylum tricornutum* en un cultivo de volumen limitado. Las condiciones aplicadas y los resultados obtenidos aparecen en la figura 2.

El desarrollo de una población de *Phaeodactylum* en raras ocasiones presenta una fase de latencia, de tal manera que la fase exponencial comienza en el mismo momento en que se ha efectuado el inóculo. El medio de cultivo debe contener todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del organismo. Los más destacables son carbono, nitrógeno, fósforo y silicio. La escasez en el medio de alguno de estos elementos puede detener el crecimiento de la población. Los requerimientos de *Phaeodactylum* para el silicato son tan ínfimos, que el silicato que se disuelve de las paredes del recipiente de vidrio que contiene el cultivo es suficiente (LEVIN *et al.*, 1958). Por este motivo, y porque además el silicio en la naturaleza jamás es limitante, no ha constituido objeto de estudio. Si bien se ha dicho que el nitrito a concentraciones altas es tóxico (SIEWARI, 1974), no parece serlo para *Phaeodactylum*, como puede observarse en la figura 2. En ella podemos observar la evolución del cultivo.

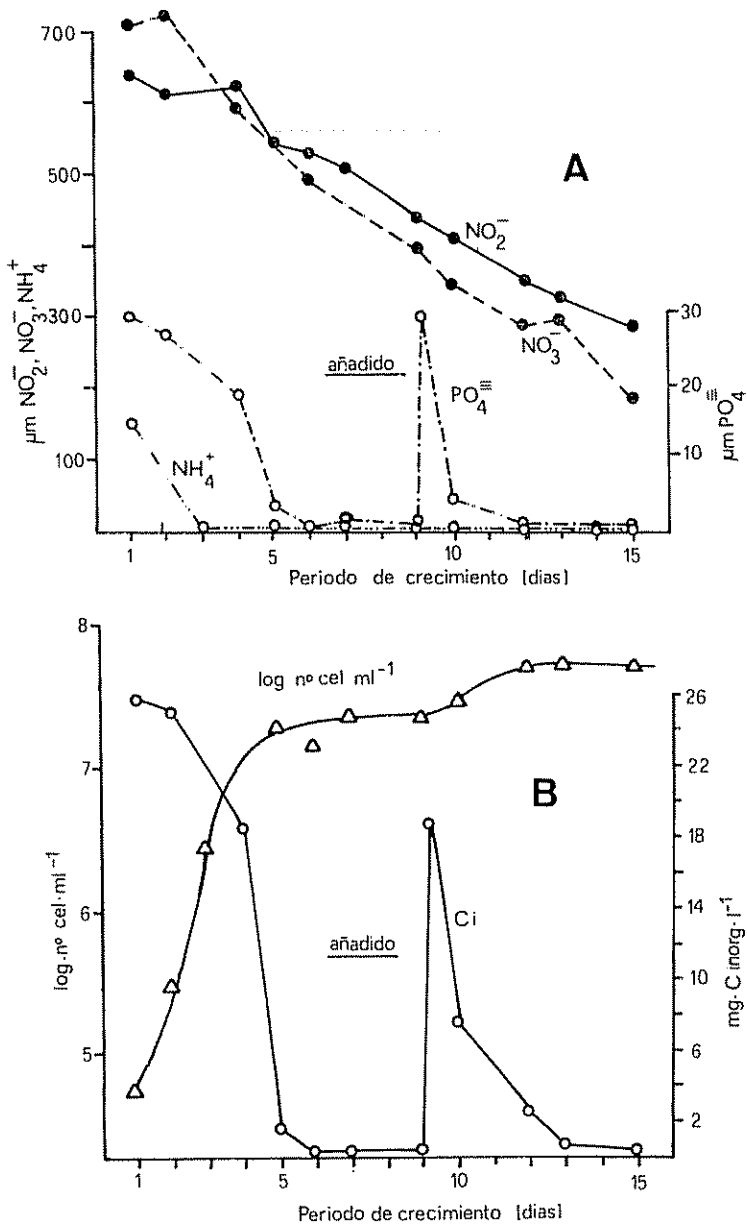


FIG. 2.— Sinopsis del crecimiento y la nutrición de *Ph. tricorutum* A: Evolución de la concentración de nutrientes, expresada en micromoles B: Evolución de la densidad de población (expresada como logaritmo del número de células/ml) y de la concentración de carbono inorgánico, Ci (expresada en mg/l).

La fase estacionaria se alcanza cuando el carbono inorgánico se vuelve limitante. El fosfato se agota al día siguiente. Una adición de $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de carbono permite que la población se duplique, estacionándose nuevamente cuando se agota el carbono. Al mismo tiempo es añadido un nuevo aporte de fosfato, que es rápidamente consumido. El consumo de nitrato y nitrito es constante y simultáneo incluso cuando la población está estabilizada.

Los diversos cultivos experimentales que a continuación se exponen, han sido diseñados de manera que los diferentes factores ambientales objeto de estudio incidan de manera distinta. De este modo, puede investigarse cuál es su relación sobre las variaciones de productividad y excreción de esta especie.

La primera serie de experimentos consistió en realizar dos cultivos en los cuales el carbono inorgánico estuvo en exceso. Uno de los cultivos estuvo sometido a un ciclo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad; el otro cultivo estaba sometido a una iluminación continua. Ambos medios eran enriquecidos diariamente con CO_2 ; esta inyección servía también para ajustar el pH (ya que eran cultivos exentos de tampón), aunque de hecho éste volvía a subir conforme se restablecía el equilibrio del ácido carbónico con bicarbonatos y carbonatos.

La evolución del cultivo sometido a iluminación discontinua (cultivo 1) aparece en la figura 3.

La toma de muestras y la medida de la productividad se realizaron en el instante en que concluía la fase de oscuridad. La concentración de amonio

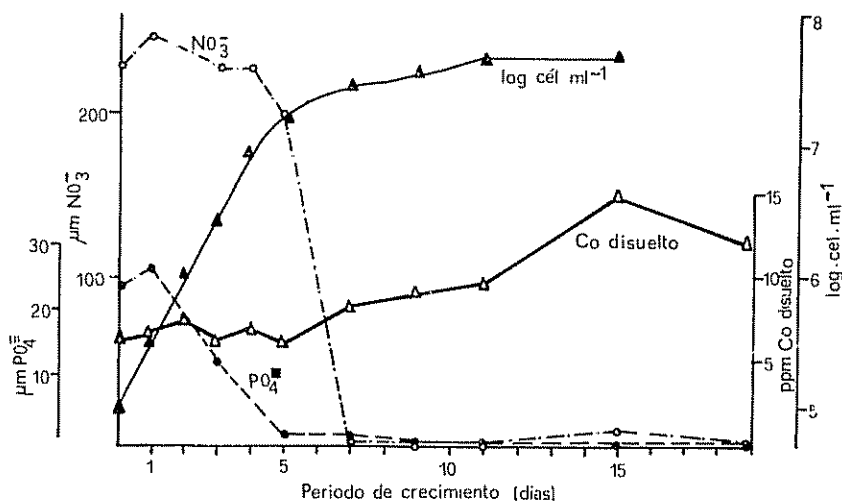


FIG. 3 — Cultivo 1. Evolución de la concentración de nutrientes, expresada en micromoles, y de carbono orgánico disuelto (Co), expresada en ppm. Al mismo tiempo se expresa la curva de la densidad de población

no aparece registrada, pero entre el 4.º y 5.º día de cultivo se agota dicha reserva, ya que comienza el consumo de nitratos. La evolución de la concentración de clorofilas y carotenoides así como de la productividad primaria aparecen en las figuras 4 y 5 respectivamente.

El cultivo 2, sometido a iluminación continua, tiene una evolución semejante. Es de señalar el agotamiento del nitrato el día 4.º, coincidiendo con el máximo de concentración intracelular de clorofila *a* y carotenoides, así como con la caída de la productividad primaria (figs. 4 y 5).

La siguiente serie de experimentos consistió en un conjunto de cultivos sometidos a una iluminación continua y saturante. Contrariamente a la serie anterior, el carbono inorgánico ha aparecido aquí en concentraciones limitantes.

En el cultivo 3, la excreción ha sido seguida mediante el uso de ^{14}C y con la medida directa del carbono orgánico disuelto. El medio de cultivo no con-

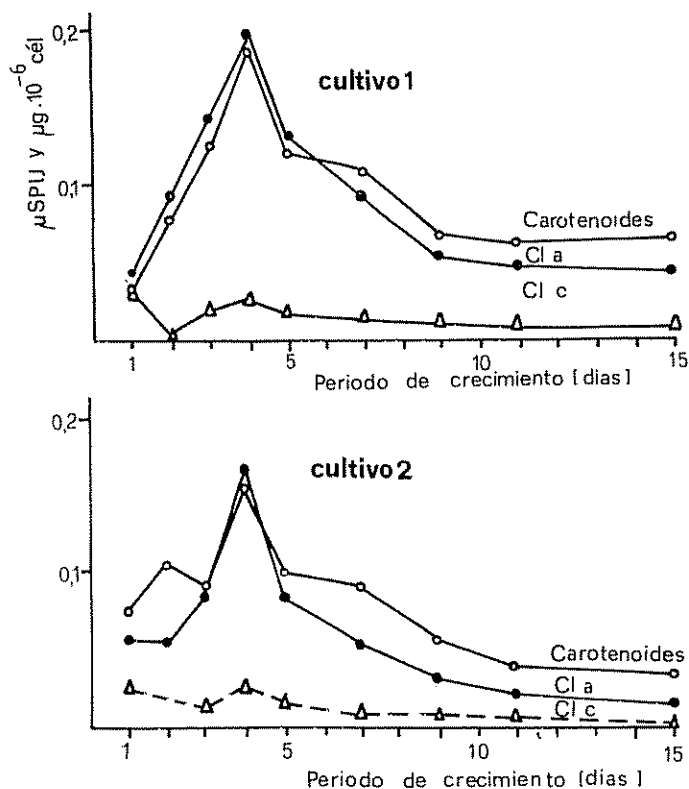


FIG. 4. — Evolución de la concentración pigmentaria intracelular de los cultivos 1 y 2. Las clorofilas *a* y *c* se expresan en microgramos/10⁶ células, mientras que los carotenoides están expresados en «microspecific pigment units» (µSPU *)/10⁶ células.

(*) Parsons & Strickland. 1963

tenía tampón y el pH se reguló con adiciones discretas de HCl 0,1 N. El experimento fue configurado para que en un momento concreto el nitrato se agotase quedando el fosfato en exceso. El medio estaba además enriquecido en amonio. Al 4.º día, el crecimiento exponencial cesa, coincidiendo con el agotamiento del carbono orgánico. El crecimiento de la población se estaciona. La velocidad de difusión del dióxido de carbono en el medio no es suficiente como para que pueda haber crecimiento, ya que la población es muy densa y la superficie de intercambio aire-agua es pequeña para esa densidad de población. El amonio es consumido totalmente el 7.º día, y a partir de ahí comienza el consumo de nitrato. El nitrito presente en el medio sufre un ligero incremento paralelo al consumo de nitratos, pero cuando el nitrato se agota, es consumido el nitrito. La evolución de estos parámetros puede observarse en el cuadro 1.

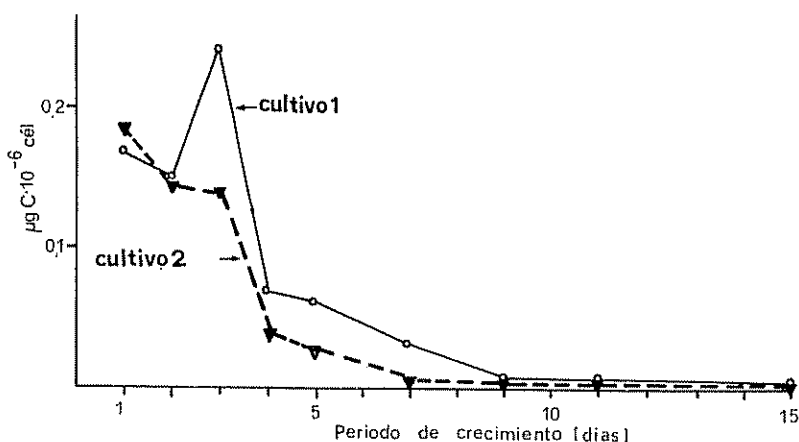


FIG 5 — Productividad primaria de los cultivos 1 y 2 expresada en microgramos de C asimilado/10⁶ células, durante 1 hora de incubación a 4500 lux de intensidad luminica

La productividad es alta hasta el 4.º día, el 5.º decae, manteniéndose estable los días subsiguientes, dentro de valores bajos. La excreción decae desde el primer día, en que se sitúa en su valor máximo (23,12 %), hasta el día 4.º, y a partir de ahí no supera el 0,5 %. Ni cuando se agotan los nitratos, ni tampoco en días posteriores en que el medio está carente de este ion, hay un aumento de la excreción.

La clorofila *a* aumenta su concentración durante el crecimiento exponencial, si bien al tercer día cesa dicho aumento y posteriormente decae, pero presentando una concentración relativamente alta, debido posiblemente a que el medio es rico en nitrato. La clorofila *c* manifiesta un pequeño pero constante aumento a lo largo del periodo de crecimiento (fig. 6).

CUADRO I

Evolución de todos los parámetros estudiados en el cultivo 3. Ci = carbono inorgánico (ppm). Co = carbono orgánico (ppm). $\mu\text{g Co}\cdot 10^{-6}$ cél. = μg de carbono orgánico liberado al medio de cultivo por cada 10^6 células. — Asimilación: $\mu\text{g C}\cdot 10^{-6}$ cél. = μg de carbono asimilado/ 10^6 células durante 1 h de incubación. $\text{cmp}\cdot \text{ml}^{-1}$ = relación de «contajes por minuto» obtenidos al filtrar 1 ml de cultivo después de incubar durante 1 h. — Excreción: $\mu\text{g C}\cdot 10^{-6}$ cél. = μg de carbono orgánico liberado al medio de cultivo/ 10^6 células, durante 1 hora de incubación. $\text{cpm}\cdot \text{ml}^{-1}$ = relación de «contajes por minuto» obtenidos en 1 ml de medio de cultivo después de incubar el cultivo durante 1 hora. %: proporción que representa la excreción respecto a la asimilación. G: tiempo medio de duplicación de la población, expresado en horas.

Día de cultivo	Cél. ml^{-1}	Carbono(ppm)		Asimilación $\cdot \text{h}^{-1}$		Excreción $\cdot \text{h}^{-1}$		Nutrientes ($\mu\text{mol}\cdot \text{l}^{-1}$)				G(horas)		
		Ci	Co	$\mu\text{g C}\cdot 10^{-6}$	$\mu\text{g C}\cdot 10^{-6}$ cél.	$\text{cpm}\cdot \text{ml}^{-1}$	$\mu\text{g C}\cdot 10^{-6}$ cél.	%	NH $^+$ ₄	NO $^-$ ₃	NO $^-$ ₂		PO 3 ₄	
0	94 063	31.0	4.1	0.00	0.1960	31.9	0.04500	9.6	23.12	435.0	143.3	0.2	220.6	-
1	380 453	30.0	-	-	0.2487	129.3	0.00420	3.8	1.70	-	-	-	-	11.90
2	1 313 337	28.0	4.3	0.15	0.3016	1 012.3	0.00320	10.8	1.05	-	131.0	0.2	182.4	13.43
3	2 944 640	18.5	-	-	0.2798	2 959.5	0.00650	70.8	2.33	135.0	137.0	0.3	-	20.60
4	6 331 668	1.7	8.4	0.68	0.1597	42 822.0	0.00954	145.6	0.34	-	143.0	0.3	158.8	21.73
5	6 746 406	0.5	8.9	0.71	0.0337	64 654.0	0.00006	113.8	0.17	16.4	137.8	0.6	-	260.00
6	6 995 249	0.5	8.4	0.61	0.0337	36 769.0	0.00006	63.2	0.17	6.6	137.0	0.5	150.0	459.23
7	7 069 689	-	-	-	0.0390	41 469.0	0.00006	64.7	0.16	0.0	-	-	-	-
8	6 884 652	-	-	-	0.0350	37 523.0	0.00008	47.2	0.12	0.0	-	-	-	-
9	7 935 322	0.5	10.1	0.76	0.0340	36 216.0	0.00006	62.4	0.17	0.0	-	0.8	-	-
10	7 435 086	-	-	-	0.0348	36 918.0	0.00006	66.0	0.17	0.0	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	95.4	1.1	-	-
12	7 188 793	0.5	10.5	0.89	0.0336	36 571.0	0.00006	67.5	0.18	0.0	65.4	1.4	-	-
14	7 622 898	0.5	14.5	1.36	0.0290	31 392.0	0.00006	68.3	0.21	0.0	24.4	1.8	-	-
15	7 257 344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.3	-	-	-
16	7 646 215	0.5	14.0	1.29	0.0380	41 076.0	0.00013	146.0	0.35	0.0	0.8	0.2	138.0	-
17	-	-	-	-	0.0360	38 822.0	0.00010	110.0	0.28	0.0	-	-	128.0	-
19	-	0.5	14.3	-	0.0229	24 335.0	0.00006	53.4	0.26	-	-	-	0.0	122.6
21	-	-	-	-	0.0180	11 683.0	0.00007	48.6	0.41	-	-	-	106.3	-

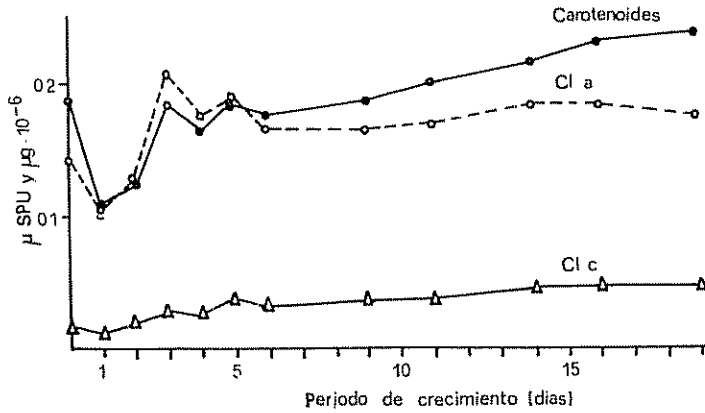


FIG. 6 — Evolución de la concentración pigmentaria en el cultivo 3. La concentración de las clorofilas *a* y *c* está expresada en $\mu\text{g}/10^6$ células. La concentración de los carotenoides se expresa en «microspecific pigment units»/ 10^6 células.

En éste y otro experimento que aquí no describimos, se ha seguido la incorporación del ^{14}C a los pigmentos fotosintéticos. En ambos se han obtenido resultados paralelos. La incorporación del isótopo de ^{14}C en % respecto al total incorporado a las células aparece en la figura 7. Podemos observar que el día 3.^o existe una relación entre la evolución de la concentración pigmentaria y la de la incorporación de ^{14}C a los pigmentos, ya que ambos parámetros experimentan un máximo. Durante la fase de crecimiento estacionario hay una mayor incorporación de ^{14}C a los carotenos; también en ese período la concentración de carotenos aumenta, tanto en valor relativo como absoluto.

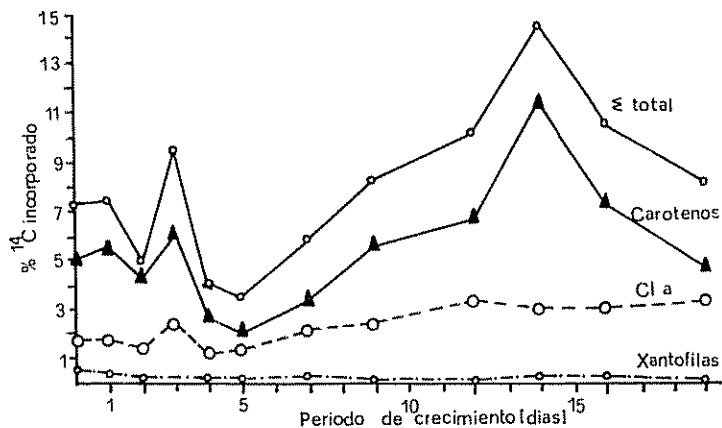


FIG. 7 — Cultivo 3. Evolución de la incorporación de ^{14}C a los pigmentos fotosintéticos, expresado en % respecto al total incorporado a las células.

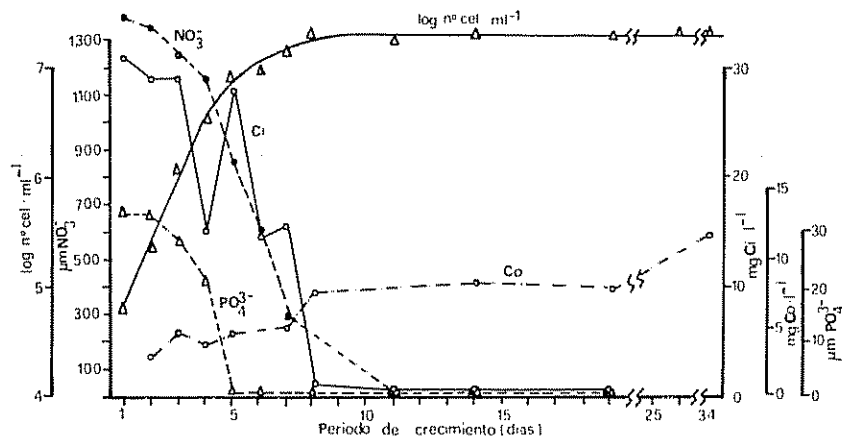


FIG. 8. — Evolución del cultivo 4. Co = carbono orgánico, expresado en mg/l. Ci = carbono inorgánico, expresado en mg/l. Los días 5.º y 7.º se incrementó artificialmente su concentración con el objetivo de evitar su agotamiento.

El cultivo 4 fue diseñado con el fin de obtener un agotamiento del ion fosfato en un medio rico en nitrato y en el que el C inorgánico se mantenía en exceso. El crecimiento es exponencial hasta el 5.º día, coincidiendo con el agotamiento del fosfato. En el día 8.º se agotan el nitrato y el carbono inorgánico, produciendo una estabilización de la población (fig. 8).

La productividad primaria se mantiene dentro de valores altos hasta el día 7.º, decreciendo y estabilizándose a partir del día 8.º. La excreción presenta un máximo al principio y el día 6.º, si bien estos máximos no se traducen en incrementos cuantitativamente importantes del C orgánico disuelto. La evolución de ambos parámetros puede ser observada en la figura 9.

En cuanto a la concentración pigmentaria, se observa un decrecimiento en la fase inicial del crecimiento exponencial, observado también en otros experimentos, lo cual parece indicar que en un primer momento la división celular (velocidad de crecimiento) es superior a la síntesis pigmentaria; ello comporta que la tasa de asimilación alcance sus valores más altos para que el organismo trabaje con el máximo rendimiento. Este fenómeno podría ser corroborado por el hecho observado en el cultivo 3 (fig. 7), en el cual la biosíntesis pigmentaria se mantiene e incluso baja en la primera fase del crecimiento exponencial, experimentando un aumento después, coincidente con el aumento de la concentración de los pigmentos. En la figura 10-A puede observarse la evolución de la concentración pigmentaria de este cultivo, mientras que en la figura 10-B observamos lo mismo pero perteneciente a un cultivo (5) en el que el nitrógeno del medio (ion amonio en este caso) se agota el día 6.º y que el crecimiento de la población se estaciona el día 8.º. La evolución en

ambos cultivos es prácticamente la misma, si bien en este segundo caso la clorofila *a* presenta una concentración inferior, ya que hay un mayor crecimiento debido a una mayor disponibilidad de C inorgánico, mientras que las disponibilidades de nitrógeno son las mismas en ambos cultivos.

El objetivo del siguiente experimento lo constituyó la medida de los procesos heterotróficos debidos a la actividad bacteriana. Para ello se diseñó el cultivo 6, que era mantenido en un ciclo de 16 horas de iluminación y 8 horas de oscuridad. Las tomas de muestras y la incubación para la medida de productividad se efectuaban al concluir la fase de oscuridad. Otro objetivo de este experimento lo constituyó la medida de la productividad y la excreción después de incubar un volumen de cultivo con $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ durante 1 hora bajo iluminación saturante y después someterlo a 3 horas de oscuridad. El cultivo tuvo un desarrollo semejante a los anteriores y señalamos el hecho de que la población se estabiliza el día 10.^o, día en que se agota el C inorgánico, estando en exceso los iones nitrato y fosfato.

La medida de la actividad heterotrófica se basa en el método puesto a punto por CASIELLÍ (1975, 1977). Un volumen de cultivo es introducido en una botella que cierra herméticamente. Introducida la muestra, se le añade una cantidad de glucosa marcada con ^{14}C que permita seguir el proceso pero que no suponga un enriquecimiento energético significativo del sistema. Después del periodo de incubación (3 horas en la oscuridad), se acidifica el sistema con H_3PO_4 (1 ml en 50 de muestra), sin abrir el frasco. Este último

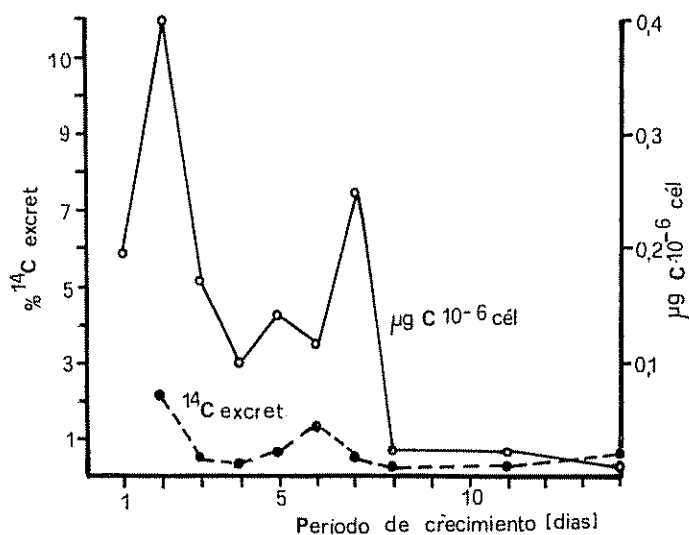


FIG. 9 — Dinámica de la asimilación y de la excreción en el cultivo 4. Los valores de asimilación corresponden a 1 hora de incubación a 4500 lux. Los valores de excreción están representados en % respecto al total del ^{14}C incorporado a las células durante la incubación.

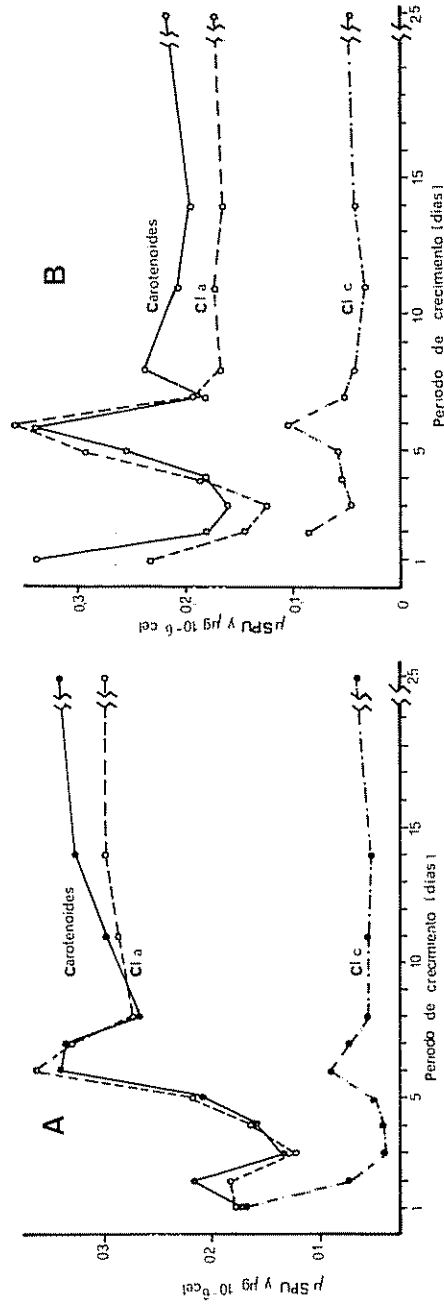


Fig. 10.— Dinámica de la concentración de los pigmentos. Clorofilas *a* y *c* expresadas en $\mu\text{g}/10^6$ células. Carotenoides expresados en «microspecific pigment units»/ 10^6 células. A: cultivo 4. B: cultivo 5.

paso se efectúa mediante inyección a través del tapón. Seguidamente se procede a la evacuación del CO_2 que ha quedado libre, haciendo pasar una corriente de aire exento de CO_2 a través de la muestra. El aire saliente, enriquecido con el $^{14}\text{CO}_2$ formado, se burbujea en una solución saturada de hidróxido bórico.

Este tratamiento tiene una duración de 1 hora. El $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ formado se recoge sobre un filtro que se lava y seca. La medida de la radiactividad del precipitado se realiza con el contador de centelleo líquido. Esto nos dará la medida de la respiración. Una vez desalojado el CO_2 de la botella de incubación, ésta se abre y un volumen de su contenido se filtra a través de un filtro de membrana ($0,45 \mu\text{m}$ de poro). De la medida de la radiactividad se deduce la glucosa asimilada.

El cálculo de la asimilación heterotrófica se hace mediante la fórmula dada por PARSONS y STRICKLAND (1961), con una salvedad, ya que estos autores adicionan sustrato no lábil además de la glucosa, y nosotros no. De los valores obtenidos, lo que nos interesa es la proporción que representa la glucosa asimilada y respirada.

Estos resultados aparecen en el cuadro 2.

La actividad heterotrófica será la suma de la asimilación y la respiración. Paralelamente, el día que se inició el cultivo se tomó un volumen (B) de 100 ml y se le añadió glucosa radiactiva de una actividad de 1 830 400 cpm. En

CUADRO 2

Cálculo de la asimilación y respiración heterotróficas realizado por la población fitoplanctónica del cultivo 6. La actividad heterotrófica es la suma de la asimilación y la respiración. Junto a los valores cuantitativos aparece la proporción que éstos representan respecto al sustrato total disponible. Los valores están expresados en mg de glucosa/m³, asimilados o respirados por hora de incubación

Día	Asimilación heterotrófica		Respiración heterotrófica		Actividad heterotrófica	
	mg glucosa · m ⁻³ · h ⁻¹	%	mg glucosa · m ⁻³ · h ⁻¹	%	mg glucosa · m ⁻³ · h ⁻¹	%
1	0,1865	16,0	0,0150	1,3	0,2015	17,4
2	0,1828	15,8	0,0086	0,8	0,1924	16,6
3	0,0403	3,5	0,0093	0,8	0,0496	4,3
4	0,1501	12,9	0,0148	1,3	0,1649	14,2
5	0,1718	14,8	0,0284	2,4	0,2002	17,2
6	0,0958	8,2	0,0455	3,9	0,1641	12,2
8	0,2980	25,7	0,0086	0,7	0,6883	26,4
10	0,3665	31,6	0,0078	0,7	0,3743	32,3
13	0,3526	30,7	0,0045	0,4	0,3571	30,7
15	0,4810	41,5	0,0058	0,5	0,4868	41,9
18	0,6990	60,3	0,0170	1,5	0,7160	61,7

CUADRO 3

Evolución de la asimilación y respiración heterotróficas en un duplicado del cultivo 6(B). El sustrato asimilable (glucosa marcada con ^{14}C) fue añadido al inicio del cultivo. Los resultados se expresan en contajes por minuto (cpm). En la columna central aparece la actividad de la glucosa disuelta en el medio.

<i>Día</i>	<i>Asimilado</i> (cpm)	<i>%</i>	<i>Disuelto</i> (cpm)	<i>%</i>	<i>Respirado</i> (% teórico) <i>Inicial-mues-</i> <i>tra periódica</i> (cpm)	<i>%</i>
0	0	0	1 830 400	100,0	0	0
4	1 117 880	61,0	135 780	7,4	576 740	31,5
15	1 013 880	55,4	182 480	10,0	634 040	34,6
18	1 058 250	57,8	204 880	11,2	567 270	31,0
28	1 135 420	62,0	281 660	15,4	413 320	22,6

dicho volumen el cultivo se desarrolló paralelamente al que era objeto del experimento. Los días 0, 4, 15, 18 y 28 fue realizada la medida de la glucosa asimilada y disuelta en el medio. La respirada se calculó por diferencia. Los resultados aparecen en el cuadro 3.

Al final del proceso, los valores de la glucosa teóricamente respirada oscilaban entre el 22 % y el 31 %; la glucosa asimilada, entre el 55 y el 62 %.

La medida que nos interesa es la respiración, ya que representaría la pérdida de materia orgánica del sistema. Esta pérdida no parece tener gran importancia en nuestras condiciones de trabajo, pues si en el cultivo B la respiración oscila entre el 22 % y el 31 %, es cierto que partimos de una cantidad inicial que no es aumentada en ningún momento; en cambio, en nuestros cultivos hemos podido comprobar que la excreción es constante y por lo tanto el sustrato teóricamente asimilable y respirable va aumentando progresivamente. Son más indicativas las medidas tomadas tras 3 horas de incubación del cultivo con glucosa marcada. En aquéllas la respiración oscila entre 0,4 y 3,9 %.

Un hecho que debe ser tenido en cuenta es que *Phaeodactylum tricornutum* puede desarrollar actividad heterotrófica. COOKSEY (1974) registra la incorporación de acetato por dicha especie tanto bajo iluminación como en la oscuridad. LEWIN (1960) estudia 43 diatomeas litorales pennaes (entre las cuales no se encuentra *Phaeodactylum*), de ellas 26 son capaces de crecer heterotróficamente usando glucosa; asimismo, la glucosa es uno de los sustratos más usados. WILLIAMS y YENISCH (1976) estudian la producción, la excreción y la utilización heterotrófica de los compuestos orgánicos disueltos en una región de las Bahamas; confirman los hallazgos de otros autores de que la mayor parte del material incorporado por la población heterotrófica es retenida por

las células. Registran que, de la glucosa incorporada por las bacterias, un 25 % de promedio es respirada. Los procesos heterotróficos consumen del 10 al 20 % del material excretado.

Los resultados obtenidos en la medida de la actividad heterotrófica bacteriana permiten afirmar que en nuestras condiciones de trabajo, la respiración representa una pérdida pequeña de materia orgánica disuelta (0,4-3,9 %) y que, por lo tanto, la concentración de carbono orgánico disuelto, así como la proporción de ^{14}C excretado, son medidas válidas y generalizables, a pesar de trabajar con cultivos no axénicos. Las dos medidas de la productividad primaria presentan algunas diferencias. Ello puede observarse en la figura 11. Prácticamente evolucionan de la misma manera aunque cuando los valores de productividad son altos, éstos son mayores hasta el 5.º día en la muestra que se ha incubado 3 horas en la oscuridad. Cuando la productividad decae (a causa del agotamiento del C inorgánico), se presentan prácticamente los mismos valores. La excreción (figura 12) es inversamente proporcional en ambas muestras, es decir, que comparándolas encontramos que a mayor incorporación hay menor excreción y viceversa. Cabe destacar que a partir del 5.º día los valores de excreción de la muestra sometida a 3 horas de oscuridad son mayores (más del doble). Esta excreción durante la oscuridad parece indicar la existencia de una dinámica de excreción constante. La excreción alcanza su máximo el día 1.º (14,8 %), decayendo en los días subsiguientes y estabilizándose a partir del día 6.º y 4.º respectivamente.

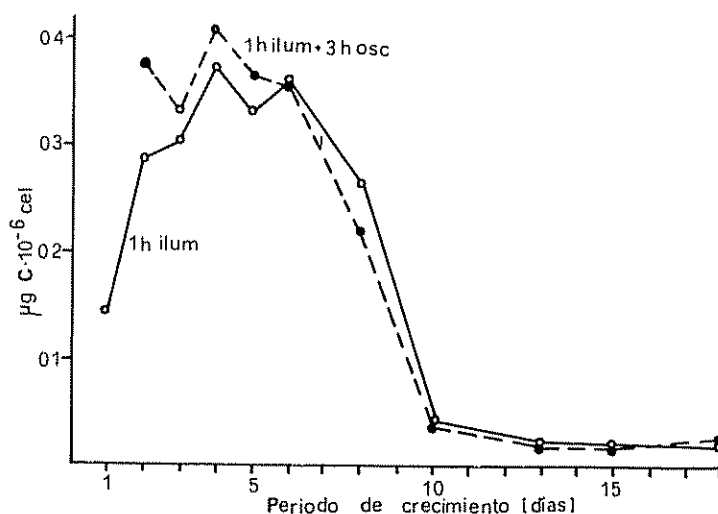


FIG. 11. — Evolución de la productividad primaria en el cultivo 6. En trazo continuo están representados los valores obtenidos tras 1 hora de incubación a 4500 lux. En trazo discontinuo se representan los valores obtenidos en muestras del cultivo incubadas durante 1 hora a 4500 lux más 3 horas de oscuridad.

La concentración pigmentaria evoluciona como en los experimentos anteriores. La concentración de clorofila *a* en la fase estacionaria es alta, coincidiendo con la abundancia de nitrato en el medio. En dicha fase, la concentración relativa de carotenoides aumenta.

Con el fin de observar la influencia de niveles de luz limitante (inferiores al valor de saturación) sobre la productividad primaria y la excreción, se realizaron dos cultivos (7 y 8) en los que los matraces que los contenían estaban envueltos con dos hojas de papel de filtro. El primero de los cultivos se diseñó de manera que se agotase el ion nitrato en el medio, quedando en exceso el ion fosfato. Este hecho se produjo el día 7.^o; el cultivo siguió creciendo hasta estacionarse el día 9.^o, a consecuencia del agotamiento del C inorgánico. La concentración de clorofilas *a* y *c* y carotenoides decae durante la primera parte de la fase de crecimiento exponencial, volviendo a aumentar después hasta el día séptimo, en que se agota el nitrato. A partir de aquí hay un descenso en la concentración de todos ellos, aumentando los carotenoides su concentración relativa. El día 13.^o, cuando también se había agotado el ion fosfato, se añadió al matraz de cultivo dos nuevas hojas de papel de filtro, con el fin de atenuar todavía más luz; al mismo tiempo se enriqueció el cultivo en fosfato y nitrato, si bien al día siguiente este último ya se había agotado. También se enriqueció el medio en C inorgánico.

La productividad se mantiene en el margen de valores altos hasta que el C inorgánico se vuelve limitante. A partir del día 13.^o, los valores de productividad aumentan ligeramente, pero son tan bajos que no permiten que haya

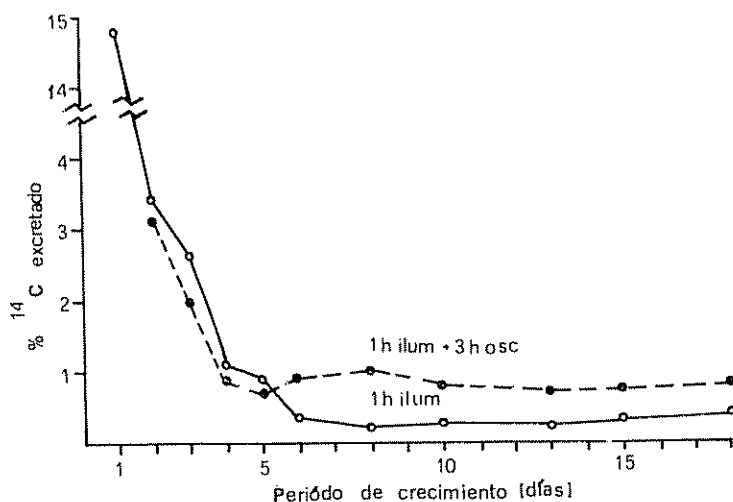


FIG. 12 — Evolución de la excreción en el cultivo 6. Los valores están expresados en cpm y representan el % respecto al total de ¹⁴C incorporado a las células durante la incubación. En trazo continuo, valores obtenidos tras 1 hora de incubación a 4500 lux. En trazo discontinuo, valores obtenidos tras 1 hora de incubación a 4500 lux más 3 horas de oscuridad.

crecimiento En esta fase, la concentración de pigmentos aumenta de nuevo, como consecuencia del nuevo enriquecimiento del medio en nitrógeno, pero produciéndose una disminución de la concentración relativa de carotenoides. La excreción en la primera fase del experimento manifiesta el mismo comportamiento que en experimentos anteriores, alcanzado su valor máximo el primer día de cultivo, decreciendo después y estabilizándose dentro de un margen de valores inferiores al 0,6 %. En la segunda fase (a partir del día 13.^o), la excreción aumenta hasta 1,19 %, si bien este valor está dentro del margen de valores bajos. El segundo cultivo (8), a diferencia del anterior, el ion fosfato, se agota (día 7.^o), quedando en el medio nitrato en exceso. La evolución de la concentración pigmentaria es similar a la del anterior cultivo, es decir, disminución en la primera parte de la fase de crecimiento exponencial, posterior aumento alcanzándose el máximo (0,4337 μg de clorofila a/ 10^6 cél), y posterior descenso de dicha concentración a partir del momento en que se agota el fosfato y el C inorgánico; en esta fase la concentración relativa de carotenoides aumenta.

La evolución de este cultivo, en lo que se refiere a productividad y excreción, es en líneas generales igual al anterior. Los valores de productividad de ambos cultivos son ligeramente inferiores a los obtenidos en cultivos llevados a cabo bajo niveles de luz saturante.

Cabe destacar que la concentración pigmentaria alcanzada en el segundo cultivo ha sido la mayor registrada en todos los experimentos; ello parece ser debido a la coincidencia de estar sometido a una iluminación limitante y a la disponibilidad de nitrógeno (nitrato) en el medio.

A través de los diferentes experimentos realizados hasta el momento, la dinámica excretora de las algas manifiesta siempre valores altos al principio, decayendo en días sucesivos y estabilizándose después, cuando la población tiene una densidad alta y el carbono inorgánico, en líneas generales, está presente en concentraciones bajas. Es decir, que hay una relación inversa entre densidad de población y excreción.

Otro hecho importante relacionado con el fenómeno anterior es la dificultad de medir con precisión valores bajos de radiactividad (cpm). Los valores de radiactividad al principio del cultivo son bajísimos, como puede observarse en los datos expuestos, y ello se acentúa todavía más para los valores de excreción. Este fenómeno es debido a que los valores de radiactividad son inversamente proporcionales a la concentración de C inorgánico presente en el medio. Este hecho se justifica por las bajas densidades de población características de las primeras fases de los experimentos. IGNIIIADES y FOGG (1973) relacionan los valores de excreción altos con densidades de población bajas (experimentando con la diatomea *Skeletonema costatum*), lo cual es coincidente con nuestras observaciones.

Otro factor que debe ser tenido en cuenta es el efecto de shock al que se ven sometidas las células al ser inoculadas en un medio de cultivo nuevo que las somete a nuevos factores ambientales (WILLIAMS y YENISCH, 1976).

CUADRO 4

Evolución del cultivo 9, realizado en medio de cultivo artificial (S 36) y por duplicado (A y B). La terminología utilizada es la misma que se expresa en el cuadro 1.

MEDIO DE CULTIVO 1											
A											
Día de cultivo	Cél.·ml ⁻¹	Carbóno(ppm)		Asimilación·h ⁻¹		Excreción·h ⁻¹		Nutrientes(μmol·l ⁻¹)			
		C _i	C _f	μgC·10 ⁻⁶ ·cél.·cpm·ml ⁻¹	μgC·10 ⁻⁶ ·cél.·cpm·ml ⁻¹	μgC·10 ⁻⁶ ·cél.·cpm·ml ⁻¹	%	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	PO ₄ ³⁻	G(horas)
0	13 790	5.7	0.2730	24.0	0.1725	41.2	63.20	946.0	0.9	65.0	
1	45 829	5.4	0.3230	281.7	0.0036	3.2	1.13	925.0	1.6	63.0	13.85
2	205 113	5.9	0.2510	909.2	0.0029	10.6	1.15	915.0	0.8	63.0	11.09
3	1 023 020	3.5	0.3230	9 828.5	0.0013	38.6	0.39	898.0	1.7	56.0	10.35
9	7 188 793	0.5	-	-	-	-	-	505.0	6.6	24.3	51.19

B											
Día de cultivo	Cél.·ml ⁻¹	Carbóno(ppm)		Asimilación·h ⁻¹		Excreción·h ⁻¹		Nutrientes(μmol·l ⁻¹)			
		C _i	C _f	μgC·10 ⁻⁶ ·cél.·cpm·ml ⁻¹	μgC·10 ⁻⁶ ·cél.·cpm·ml ⁻¹	μgC·10 ⁻⁶ ·cél.·cpm·ml ⁻¹	%	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	PO ₄ ³⁻	G(horas)
0	44 238	4.8	0.1185	39.0	0.0756	68.8	63.80	925.0	0.7	60.0	
1	90 546	5.0	0.4129	789.5	0.0068	8.5	1.10	920.0	0.7	58.5	23.22
2	359 439	5.6	0.3600	2 447.3	0.0015	10.0	0.41	904.0	1.0	51.0	12.06
3	1 907 795	1.9	0.2912	31 004.0	0.0008	89.9	0.29	819.0	3.2	45.0	9.96
9	10 617 291	0.6	-	-	-	-	-	476.0	5.4	23.2	58.14

CUADRO 5

Evolución del cultivo 10, realizado en un medio obtenido a partir de un cultivo en fase de crecimiento estacionaria, mediante filtración. Este cultivo se hizo por duplicado (C y D). La terminología utilizada es la misma que se expresa en el cuadro 1.

MEDIO DE CULTIVO 2											
C											
Día de cultivo	Cél. ml ⁻¹	Carbono(ppm)		Asimilación.h ⁻¹		Excreción.h ⁻¹		Nutrientes(μmol.l ⁻¹)			
		C _i		μgC.10 ⁻⁶ cél. cpm.ml ⁻¹	μgC.10 ⁻⁶ cél. cpm.ml ⁻¹	%	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	PO ₄ ³⁻	G(horas)	
0	16 590	8.18	0.1064	13.08	0.0335	8.5	39.38	409.0	3.2	47.0	
1	20 736	9.24	0.4309	62.30	0.0380	5.5	8.90	404.0	3.3	50.0	74.57
2	21 428	12.18	0.4683	76.60	0.0490	9.0	10.50	382.0	3.2	47.0	506.71
3	31 796	13.54	0.2631	59.10	0.0190	4.7	7.45	372.0	2.8	47.5	42.15
9	3 345 553	1.91	-	-	-	-	-	170.0	6.2	29.0	21.43

D											
Día de cultivo	Cél. ml ⁻¹	Carbono(ppm)		Asimilación.h ⁻¹		Excreción.h ⁻¹		Nutrientes(μmol.l ⁻¹)			
		C _i		μgC.10 ⁻⁶ cél. cpm.ml ⁻¹	μgC.10 ⁻⁶ cél. cpm.ml ⁻¹	%	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	PO ₄ ³⁻	G(horas)	
0	51 842	7.57	0.0410	24.40	0.0053	3.6	12.80	405.0	3.1	50.0	
1	73 961	8.18	0.3180	195.00	0.0105	2.2	3.30	404.4	3.1	50.0	47.02
2	125 112	11.80	0.0857	80.60	0.0139	15.7	16.26	400.5	3.1	51.0	31.64
3	232 253	10.59	0.3100	673.90	0.0123	46.3	6.87	380.0	3.5	48.0	26.89
9	5 861 631	0.82	-	-	-	-	-	149.0	4.7	21.8	30.91

Con el fin de estudiar la influencia de los factores enumerados más arriba, fue configurado el presente experimento. Se llevó a cabo utilizando dos medios de cultivo diferentes (experimentos 9 y 10). Uno de ellos fue agua de mar artificial (medio S 36), que llamaremos medio de cultivo 1; el otro medio (agua de mar enriquecida) fue obtenido de un cultivo en fase de crecimiento estacionario mediante filtración, y lo llamamos medio de cultivo 2. Ambos tenían un contenido en carbono inorgánico relativamente bajo y estaban enriquecidos en fosfatos y nitratos. Cada tipo de cultivo se hizo por duplicado, inoculando diferente número de células. Los resultados aparecen en los cuadros 4 y 5.

Los cultivos en medio artificial (1) presentan unos valores de productividad altos con un crecimiento normal. La excreción sigue la misma tónica que los experimentos anteriores, es decir, valor máximo al principio del experimento, decayendo después y manteniéndose en un margen de valores bajos.

Los cultivos en medio reutilizado (2) no manifiestan un buen desarrollo y los valores de excreción son altos, si bien en el cultivo 2-C el valor máximo de excreción se alcanza también al principio.

El anormal desarrollo de estos cultivos puede estar provocado por un efecto de shock, desencadenado por los compuestos excretados (catabolitos) al medio por las células que anteriormente se habían desarrollado en él.

La densidad de población, por lo tanto, no parece ser uno de los factores que condicionan la excreción, a no ser que relacionemos dicha densidad con densidad de metabolitos en el medio. En los cultivos A y B observamos que las concentraciones celulares del día primero dan una excreción de 1,1 %, y en experimentos anteriores con estas densidades obteníamos excreciones en mayor proporción, si bien en aquéllos los cpm incorporados eran menores debido a que la concentración de C inorgánico era mucho mayor. Ello parece indicar que realmente cuando se trabaja con valores bajos de radiactividad, el fondo (*background*) es un factor de interferencia importante.

Finalmente se configuró un experimento (cultivo 11) cuyo objetivo era estudiar la evolución del carbono orgánico en el medio, producido por la excreción de las algas en cultivo axénico.

Al mismo tiempo se trataba de observar la evolución de la población en un cultivo no tamponado en el que no se realizó ninguna regulación del pH (cuadro 6).

El crecimiento exponencial cesa cuando se agota el C inorgánico.

El medio estaba enriquecido en fosfatos y nitratos. Ambos iones están en exceso en el momento en que la población cesa de crecer, si bien el fosfato se agota el 8.º día. El nitrato se agota el día 23.º. Este ion es asimilado a un ritmo constante durante la fase estacionaria. El nitrito aumenta inversamente al consumo de nitrato, producido por el metabolismo celular. Cuando el nitrato se vuelve limitante, es consumido también el nitrito (día 23.º).

El carbono orgánico disuelto se mantiene en una concentración prácticamente estable hasta el día 5.º, a partir de aquí hay un aumento constante

CUADRO 6

Dinámica del cultivo 11 (axénico). Ci = carbono inorgánico (ppm), Co = carbono orgánico (ppm). $\mu\text{g Co } 10^{-6} \text{ cél.} = \mu\text{g de carbono orgánico liberado al medio de cultivo por cada } 10^6 \text{ células}$ (El dato perteneciente al día 1 no debe ser tenido en cuenta) G=tiempo medio de duplicación de la población, expresado en horas.

Día de cultivo	Cél. $\cdot\text{ml}^{-1}$	Carbono(ppm)			Nutrientes($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			
		C _i	C _o	$\mu\text{g C}_o \cdot 10^{-6} \text{cél.}$	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	G(horas)
0	15 096	23.4	3.39	0.00	0.3	671.0	39.5	-
1	51 151	22.5	3.64	4.89	0.5	670.0	41.2	13.63
2	246 078	21.8	3.39	0.00	0.6	651.0	39.2	10.59
3	801 826	19.2	3.39	0.00	1.4	609.0	35.0	14.08
4	3 234 957	10.3	3.15	0.00	4.3	474.7	18.6	11.92
5	3 649 695	0.9	3.16	0.00	5.7	369.3	-	137.89
6	4 285 626	0.5	5.34	0.45	5.6	358.4	10.3	103.56
7	5 037 453	0.5	6.32	0.58	5.7	344.4	-	96.98
8	4 340 925	0.5	7.59	0.97	6.1	328.3	0.2	-
9	5 391 595	0.5	8.45	0.94	6.2	301.8	-	-
10	4 728 014	0.5	7.88	0.95	6.2	290.7	0.6	-
11	4 009 131	0.5	8.87	1.37	6.4	281.6	0.3	-
12	4 451 522	0.5	9.13	1.29	6.1	252.0	0.3	-
14	5 350 532	0.8	9.36	1.12	7.3	229.5	-	-
16	7 216 442	0.8	9.74	0.88	7.7	184.7	-	-
18	6 829 353	0.8	10.95	1.11	8.1	134.0	0.1	-
19	5 916 930	0.8	10.04	1.11	8.2	103.0	-	-
22	-	1.9	10.50	-	7.8	17.3	-	-
23	7 824 725	2.6	12.73	1.20	3.3	-	-	-
24	9 290 133	3.3	12.21	0.95	2.6	-	-	-
25	10 009 011	3.9	12.55	0.95	2.3	-	-	-
26	-	6.5	14.10	-	1.7	-	-	-

Los valores de C orgánico disuelto obtenidos son del mismo orden que los que se han obtenido en otros experimentos realizados en condiciones no axénicas, lo cual confirma nuevamente que la actividad heterotrófica bacteriana, en nuestras condiciones de trabajo, no tiene un efecto importante en la disminución del nivel de C orgánico disuelto. En la última fase del cultivo, después de haberse mantenido estacionaria la población, ésta aumenta debido a la incorporación de C inorgánico en el medio. Este hecho se produce como consecuencia de la disminución progresiva del volumen del cultivo en el matraz, lo cual provoca que la relación «superficie de intercambio/volumen

de medio» aumente. Este aumento de número de células provoca un incremento (día 22.º) del carbono orgánico disuelto, si bien el cociente $\mu\text{g C}_\text{org} \cdot 10^{-6}$ cél. disminuye.

CONCLUSIONES

NUTRIENTES

Phaeodactylum tricornutum consume selectivamente el amonio en un medio que además está enriquecido con nitrato y nitrito. El consumo de estos dos iones queda prácticamente inhibido hasta la total desaparición del ion amonio.

El consumo de nitrato y nitrito es, en cambio, simultáneo en un medio enriquecido con ambos iones; el consumo relativo de nitrato es, no obstante, superior. La presencia de nitrito en un medio enriquecido con nitrato y amonio en la fase de crecimiento del cultivo es proporcional al consumo de nitrato, como consecuencia de la actividad reductora por parte de las células fitoplanctónicas, no existiendo nitrito en el medio mientras es consumido el amonio.

La evolución de la población no presenta diferencias por el hecho de usar como fuente de nitrógeno amonio o nitrato.

Phaeodactylum manifiesta una gran capacidad de concentración y almacenamiento de fosfato. También, aunque en menor magnitud, de N-nitrato y N-amonio. Careciendo de ambos iones el medio de cultivo, y siendo éste rico en C inorgánico, puede haber división celular hasta un determinado nivel. Ello indica que la incorporación es superior a los requerimientos actuales.

Los valores de productividad bajan drásticamente cuando se agota el C inorgánico. Este hecho se produce porque la velocidad de incorporación de dióxido de carbono al medio no es suficiente para cubrir la demanda de la población. Como consecuencia, el crecimiento celular se detiene.

El agotamiento o la escasez de fosfato, nitrato o amonio no produce ninguna variación apreciable en los niveles de excreción de los cultivos, pero la productividad resulta afectada, con lo cual el crecimiento disminuye.

ILUMINACIÓN

La luz tiene una clara influencia sobre la concentración de la clorofila *a* y los carotenoides, siendo mayor esta concentración en células sometidas a un ciclo diario de luz-oscuridad y todavía mayor si la luz es limitante.

La máxima concentración alcanzada ha sido en células que se desarrollaban con un nivel de iluminación bajo, en un medio que contenía nitrato en exceso.

La utilización de bajos niveles lumínicos provoca una disminución evidente de la productividad. La excreción no presenta prácticamente variaciones si la comparamos con otros experimentos efectuados bajo niveles lumínicos saturantes. No obstante, se ha observado que la excreción aumenta ligeramente cuando la luz es un factor limitante. El hecho de someter los cultivos a un ciclo de luz-oscuridad no produce ninguna variación importante en la productividad ni en la excreción. En cultivos sometidos a un período de oscuridad (3 horas) posterior a una incubación con ^{14}C , se observa una excreción de la misma magnitud (proporcional al tiempo) que la que se obtiene al finalizar la incubación. Esto parece indicar que existe una dinámica de excreción constante, excepto cuando la población, como antes se ha dicho, está en los primeros estadios del crecimiento del cultivo.

NIVELES DE EXCRECIÓN

El C orgánico disuelto presenta en todos los experimentos un aumento prácticamente constante a lo largo del período de crecimiento. En algunas ocasiones se observan aumentos notables en su concentración, pero éstos no van acompañados de aumentos manifiestos del nivel de excreción.

En todos los experimentos se observa que la excreción alcanza un valor máximo al principio, decreciendo posteriormente de manera inversa al crecimiento celular. Ello parece ser producido por un efecto de shock al someter las células del inóculo a nuevas condiciones ambientales. En este sentido debe relacionarse, como factor condicionante, la densidad de población, si asociamos ésta con densidad de metabolitos presentes en el medio.

Cuando se trabaja con valores bajos de radiactividad (estadios iniciales del cultivo), en especial cuando medimos la excreción, hay una interferencia importante del ruido de fondo (*background*), lo cual provoca que estas medidas den valores artificialmente altos.

PIGMENTOS

Hay una fuerte correlación entre la concentración de nitrógeno (nitrato o amonio) tanto intracelular como extracelular, con la concentración de clorofila *a*. Así, una población que ha agotado la fuente nitrogenada del medio, si sigue creciendo, disminuye su concentración de clorofila *a* en proporción inversa.

Clorofila *a* y carotenoides aumentan su concentración paralelamente al crecimiento exponencial de la población, produciéndose una disminución cuando la población entra en la fase estacionaria. Esta disminución es tanto más acentuada cuanto mayor es la carencia de nitrógeno. Así, cultivos en los que la fuente nitrogenada está en exceso en el medio, apenas disminuye su concentración pigmentaria.

En algunos experimentos se observa que, en la primera mitad de la fase

exponencial, hay un decrecimiento de la concentración pigmentaria, lo cual parece indicar que en los estadios iniciales del cultivo, la división celular es superior a la síntesis pigmentaria en cuanto a velocidad. La tasa de asimilación ($\mu\text{g C producidos}/\mu\text{g clorofila } a$) alcanza en esos momentos su máximo valor.

La velocidad con que se incorpora el ^{14}C a los pigmentos es relativamente alta para carotenos y clorofila *a*, siendo comparativamente baja para las xantofilas. La relación entre incorporación de ^{14}C y evolución de la concentración no parece muy clara, si bien en uno de los experimentos se observa un paralelismo en dos zonas de aumento y descenso de concentración de la clorofila *a* y los carotenos.

pH, TAMPÓN

El desarrollo celular en cultivos no tamponados es aparentemente normal. La adición de pequeños volúmenes de ácido diluido al medio, con el fin de regular el pH, no parece tener un efecto apreciable sobre la población celular. Incluso este desarrollo normal aparece en cultivos no tamponados y sobre los cuales no se efectúa ninguna regulación.

CATABOLITOS

Phaeodactylum presenta un desarrollo anormal cuando crece en un medio que contiene catabolitos producidos por una población de la misma especie que se había desarrollado anteriormente en dicho medio. En este caso se observa una larga fase de latencia y una excreción alta (efecto de shock).

ACTIVIDAD BACTERIANA

La respiración bacteriana en las condiciones de trabajo descritas en la presente memoria representa una pérdida muy pequeña de materia orgánica disuelta (0,4-3,9 %), por lo que los resultados citados en ella sobre productividad primaria, excreción y C orgánico disuelto, obtenidos en cultivos no axénicos, son válidos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi agradecimiento al Dr. Antonio Ballester Nolla por su ayuda y orientación como director de la tesis; al Dr. Buenaventura Andréu, por su acogida como director del Instituto; a la Dra. Marta Estrada y al Dr. José Sánchez sus sugerencias en los aspectos biológicos y químicos respectivamente, del trabajo; al Sr. Juan Rovira su constante ayuda en los trabajos de laboratorio, ayuda simultaneada admirablemente con sus estudios de Ciencias Biológicas; a las Srtas. M.^a Rosa Vitriá y Pilar Sacristán y a los Sres. Pedro Caldentey y Juan García, su cooperación en aspectos prácticos del trabajo; finalmente agradecer a mi esposa, Dora Perales, el mecanografiado de la mayor parte de la memoria y su apoyo moral.

Durante la realización del estudio he disfrutado de una «beca para la formación del personal investigador», concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas

BIBLIOGRAFÍA

- AL-HASAN, R. H., S. J. COUGHLAN, P. ADITI y G. E. FOGG. — 1975. Seasonal variations in phytoplankton glycolate concentrations in the Menai Straits, Anglessey. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 55: 557-565.
- ANDERSON, G. C., y R. P. ZEITSCHER. — 1970. Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal and offshore areas of the northeast Pacific ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 15: 402-407.
- BALLESTER, A. — 1966. Crítica de los métodos espectrofotométrico y cromatográfico en el estudio de los pigmentos del plancton. *Inv. Pesq.*, 30: 613-630.
- 1973. Regularidad y heterogeneidad de los pigmentos sintetizadores. *Ibid.*, 37 (2): 245-294.
- BERLAND, B. R., D. J. BONIN, R. A. DAUMAS, P. L. LABORDE y S. Y. MAESTRINI. — 1970. Variations du comportement physiologique de l'algue *Monallatus salina* (xanthophycée) en culture. *Marine Biology*, 7: 82-92.
- BERMAN, T., y O. HOLM-HANSEN. — 1974. Release of photoassimilated carbon as dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Ibidem*, 28: 305-310.
- BIASCO, D. — 1971. *Acumulación de nitritos en determinados niveles marinos por acción del fitoplancton*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. 223 págs.
- CASTELLVÍ, J. — 1971. Contribución a la biología de *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *Inv. Pesq.*, 35 (2): 365-520.
- 1975. Procesos autotróficos y heterotróficos debidos a la actividad de bacterias marinas. *Ibidem*, 39 (1): 119-144.
- 1977. Actividad bacteriana en la zona de afloramiento del NW de África. Campaña «Atlor II». *Res. Exp. Cient. B/O Cornide*, 6: 177-203.
- COOKSEY, K. E. — 1974. Acetate metabolism by whole cells of *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *J. Phycol.*, 10: 253-257.
- COOKSEY, K. E., y B. COOKSEY. — 1974. Calcium deficiency can induce the transition from oval to fusiform cells in cultures of *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Ibidem*, 10: 80-90.
- DROOP, M. R. — 1955. A pelagic marine diatom requiring cobalamin. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 34: 199-231.
- 1955. Some new supralittoral protista. *Ibidem*, 34: 233-245.
- 1973. Some thoughts on Nutrient Limitation in Algae. *J. Phycol.*, 9: 264-272.
- FOGG, G. E. — 1965. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press. Madison and Milwaukee. 126 págs.
- GLOVER, H., J. BEARDALI e I. MORRIS. — 1975. Effects of environmental factors on photosynthesis patterns in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) I: Effect of nitrogen deficiency and light intensity. *J. Phycol.*, 11: 424-429.
- GLOVER, H. — 1977. Effects of iron deficiency on *Isochrysis galbana* (Chrysophyceae) and *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *Ibidem*, 13: 208-212.
- GUILLARD, R. R. L., y J. H. RYTHER. — 1962. Studies of marine phytoplanktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229-239.
- GUILLARD, R. R. L., y J. A. HELLEBUST. — 1971. Growth and the production of extracellular substances by two strains of *Phaeocystis poucheti*. *J. Phycol.*, 7: 330-338.
- HEALEY, F. P., y L. L. HENDZEH. — 1975. Effect of Phosphorus deficiency on two algae growing in chemostats. *Ibidem*, 11: 303-309.
- HOLDSWORTH, E. S., y J. COLBECK. — 1976. The pattern of carbon fixation in the marine unicellular algae *Phaeodactylum tricorutum*. *Marine Biology*, 38: 189-199.
- HUNTSMAN, S. A. — 1972. Organic excretion by *Dunaliella tertiolecta*. *J. Phycol.*, 8: 59-63.
- IGNITIADIS, L., y G. E. FOGG. — Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve in culture. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 53: 937-956.
- JEFFREY, S. W., y HUMPHREY, C. F. — 1974. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c, and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 4: 167-191.

- KOROLEFF, F. — 1970. Direct determination of ammonia in natural waters as Indophenol blue. *I.C.E.S., Service Hydrographique Interlab.*, Rep. n.º 3.
- LEWIN, J. C., y R. A. LEWIN. — 1960. Auxotrophy and heterotrophy in marine littoral diatoms. *Canadian Journal of Microbiology*, 6 (2): 127-131.
- MARTI, M. — 1978. Primary production and release of organic matter in *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin bath culture. *C.I.E.S.M. Rapp. Proc. Verb. XXVth Congress and Plenary Assembly*, Antalya, November 24-December 2.
- NALEWAJKO, C. — 1966. Photosynthesis and excretion in various planktonic algae. *Limnol. Oceanogr.*, 11 (1): 1-10.
- PARSONS, T. R. — 1961. On the pigment composition of eleven species of marine Phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. of Canada*, 18 (6): 1017-1025.
- PARSONS, T. R., y J. D. H. STRICKLAND — 1962. On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in sea water. *Deep-Sea Research*, 8: 211-222.
- 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Journ. of Mar. Res.*, 21 (3): 155-163.
- RICHARDS, F. A., y I. G. THOMPSON. — 1952. The estimation and characterizations of plankton populations by pigment analysis. II. *Ibidem*, 11 (1): 156-172.
- RYTHER, J. M., D. W. MENZEL, E. M. HULBERT, C. I. LORENZEN y N. CORWIN — 1971. The production and utilization of organic matter in the Peru coastal current. *Inv. Pesq.*, 35 (1): 43-59.
- SCHINDLER, D. W., y J. E. NIGHSWANDER — 1970. Nutrient supply and primary production in Clear Lake, Eastern Ontario. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 27 (11): 2009-2036.
- SCHINDLER, D. W., y HOLMGREN — 1971. Primary production and phytoplankton in the experimental Lakes Area, northwestern Ontario, and other low-carbonate waters and a liquid scintillation method for determining ¹⁴C activity in photosynthesis. *Ibidem*, 27 (2): 189-201.
- SHAH, N. M., y G. E. FOGG. — 1973. The determination of glycollic acid in sea water. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 53: 321-324.
- STEEMAN NIELSEN, E. — 1952. The use of radioactive (¹⁴C) for measuring production in the sea. *Journal du Conseil*, 18: 117-140.
- STEIN, J. R. — 1973. *Physiological methods*. Cambridge University Press. 448 págs.
- STEWART, W. D. P. — 1974. *Algal physiology and biochemistry*. Botanical Monographs Volume 10. Blackwell. Oxford.
- STRICKLAND, J. D. H., y T. R. PARSONS. — 1968. A practical handbook of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, 167.
- THOMAS, J. P. — 1971. Release of dissolved organic matter from natural populations of marine phytoplankton. *Marine Biology*, 11: 311-323.
- WILLIAMS, P. J. LE B., y C. S. YENTSCH — 1976. An examination of photosynthetic production, excretion of photosynthetic products and heterotrophic utilization of dissolved organic compounds with reference to results from coastal subtropical sea. *Ibidem*, 35: 31-40.