

# Modelos experimentales de poblaciones de fitoplancton: nuevas observaciones sobre pigmentos y fijación de carbono inorgánico

por

RAMÓN MARGALEF \*

## EXPERIENCIAS

En esta comunicación se comentan los resultados de algunas nuevas experiencias hechas en el tubo de cultivo de 2 m de altura, descrito en un trabajo anterior (MARGALEF, 1963), en el cual (págs. 16-22) se encontrarán los detalles técnicos que es innecesario repetir aquí.

En primer lugar se describe la marcha de las dos series más instructivas, cuyas enseñanzas serán comentadas a continuación.

*Serie E.* — Se llena de agua de mar el 16 de mayo de 1962. Temperatura uniforme: 15,8°C. Salinidad: 36,29 por mil. Fósforo inorgánico: 0,06 mg/l. Iluminación: de las 6 a las 21 horas, cuatro tubos fluorescentes de luz azul, de 20 vatios y 60 cm de longitud, extendidos según el eje del tubo y en la parte alta del mismo; de las 9 a las 18 horas, además, dos tubos de luz fluorescente azul, de 40 vatios y 120 cm de longitud, extendidos según el eje del tubo y en la parte alta del mismo, y dos lámparas de incandescencia de 100 vatios cada una, encima de la superficie. Agitación: de las 9 a las 18 horas la red de vidrio y nilon oscilaba entre 1 y 8,5 cm por debajo del nivel libre del agua, a la velocidad de 27 ciclos por minuto. El agua que se saca para las observaciones y la que se evapora se repone con agua de mar diluida para conservar constante la salinidad. El día 18 ya se aprecia notable estratificación térmica, que se desarrolla más hasta el final (27 de mayo), en que la temperatura del agua en superficie es de 22°C y existen notables termoclinas a 25 cm y a 58-60 cm.

El mismo día 16 de mayo se siembra en superficie con 150 ml de un cultivo de *Skeletonema costatum* en agua de mar enriquecida. Se desarrolló excelentemente un cultivo unialgal de *Skeletonema* (con bacterias), cuya marcha puede verse en las figuras 1 y 2. El 21 se manifiesta intensa sedimentación (aparece sedimento amarillo en el fondo del tubo), que hacia el 25 es mucho más acusada; por entonces ya se ha aclarado el agua después de la proliferación de diatomeas, que ha manifestado la

\* Instituto de Investigaciones Pesqueras. Paseo Nacional, s/n. BARCELONA-3.

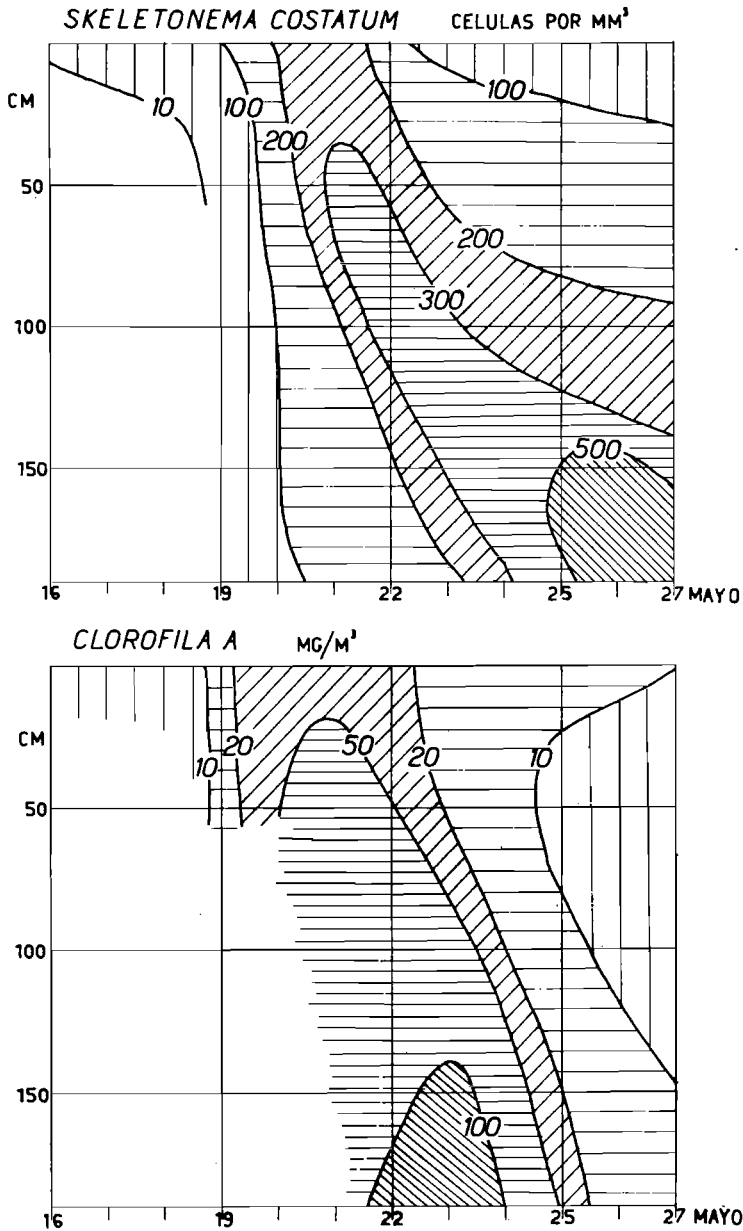


Fig. 1. — Distribución vertical y en el tiempo de la densidad de células de *Skeletonema costatum* (arriba) y de la concentración de clorofila *a* (abajo) en la serie o experiencia E.

misma fugacidad que las que se observan en la naturaleza. El día 26 la concentración del fósforo inorgánico en distintos niveles era la siguiente (determinaciones de J. Herrera):

10 cm, 9,6 mg P/m<sup>3</sup>; 52 cm, 5,5 mg P/m<sup>3</sup>; 80 cm, 1,5 mg P/m<sup>3</sup>  
140 cm, 2,6 mg P/m<sup>3</sup>; 180 cm, 1,4 mg P/m<sup>3</sup>

de modo que se habían consumido 1,86 mg de P inorgánico (el 90 % del disponible al principio del experimento) en la producción de unos 13 600 millones de células, cuyo contenido en carbono se estima en unos 87 mg en total. El diámetro medio de las células de *Skeletonema* no varió significativamente a lo largo de las 10 a 12 generaciones celulares que se sucedieron en el cultivo.

*Serie F.* — Se llena de agua de mar el 14 de junio de 1962. Temperatura uniforme inicial: 22°C. Salinidad y fósforo: aproximadamente como en la serie E. Iluminación y agitación: normalmente como en la serie E. La estratificación térmica se desarrolla a los pocos días, con análogas características a las de la serie anterior (termoclinas a 22 y 60 cm).

El 15 de junio se siembra en la parte superior con un cultivo de *Skeletonema costatum*, junto con el alga se desarrollan más bacterias que en la serie E y algunos flagelados (*Anisonema*); el 22 de junio la población se está sedimentando rápidamente y el 23 casi toda está sedimentada (fig. 4). En este momento se encuentran bastantes *Navicula*, *Amoeba* y *Anisonema*.

El 20 de junio, a 25 cm de profundidad, se suspendieron dos ampollas de 1 ml abiertas hacia abajo, conteniendo entre ambas 13 microcuries de 14-C en forma de bicarbonato. Estas ampollas se quitaron el 27 de junio sin vaciar o agitar su contenido. La cantidad total de radiactividad añadida, considerándola dispersa uniformemente por toda el agua del tubo, era del orden de 15 000 a 20 000 CPM (golpes por minuto en nuestro contador) por cada 100 ml de agua. A partir del 20 de junio se fueron tomando muestras de agua de diversos niveles, que se filtraban sobre filtros «Millipore» [R], de 0,8  $\mu$  de poro. Los filtros se lavaban con solución de NaCl al 3 % adicionada con HCl hasta ser milinormal, luego se desecaban y se medía su actividad, que se expresa en CPM de nuestro contador por cada 100 ml de agua.

Del 30 de junio al 21 de julio se interrumpe toda iluminación, con lo que la termoclina se desvanece y se alcanza prácticamente la homotermia el 20 de julio. Se desarrollan gran número de bacterias, flagelados incoloros y *Cyclidium*. El mismo 21 de julio se vuelve a poner en marcha la iluminación, volviendo a estratificarse el agua, se desarrolla *Phormidium* sobre la red agitadora y algunas *Navicula* y flagelados en el agua libre. Del 1 de agosto al 16 de septiembre se interrumpe la iluminación de nuevo y también la agitación. El 16 de septiembre se resiembró en la parte superior con un cultivo de *Skeletonema* que no prosperó; siguen viviendo *Navicula*, *Phormidium*, ciliados y flagelados.

## LOS PIGMENTOS EN EL CURSO DE UNA PROLIFERACIÓN TÍPICA

La serie E (figs. 1-3) constituye un ejemplo modélico del curso de una proliferación de diatomeas en aguas superficiales. Es una población fugaz, que consume rápidamente los elementos nutritivos y pronto se sedimenta con velocidad acelerada. La concentración de clorofila por célula decrece gradualmente a medida que la población envejece y su tasa de multiplicación disminuye. El cociente entre las densidades ópticas de los extractos de acetona a 430 y 665 m $\mu$  ( $D_{430}/D_{665}$ ) se comporta de la forma ya conocida, aumentando a medida que decrece la producción rela-

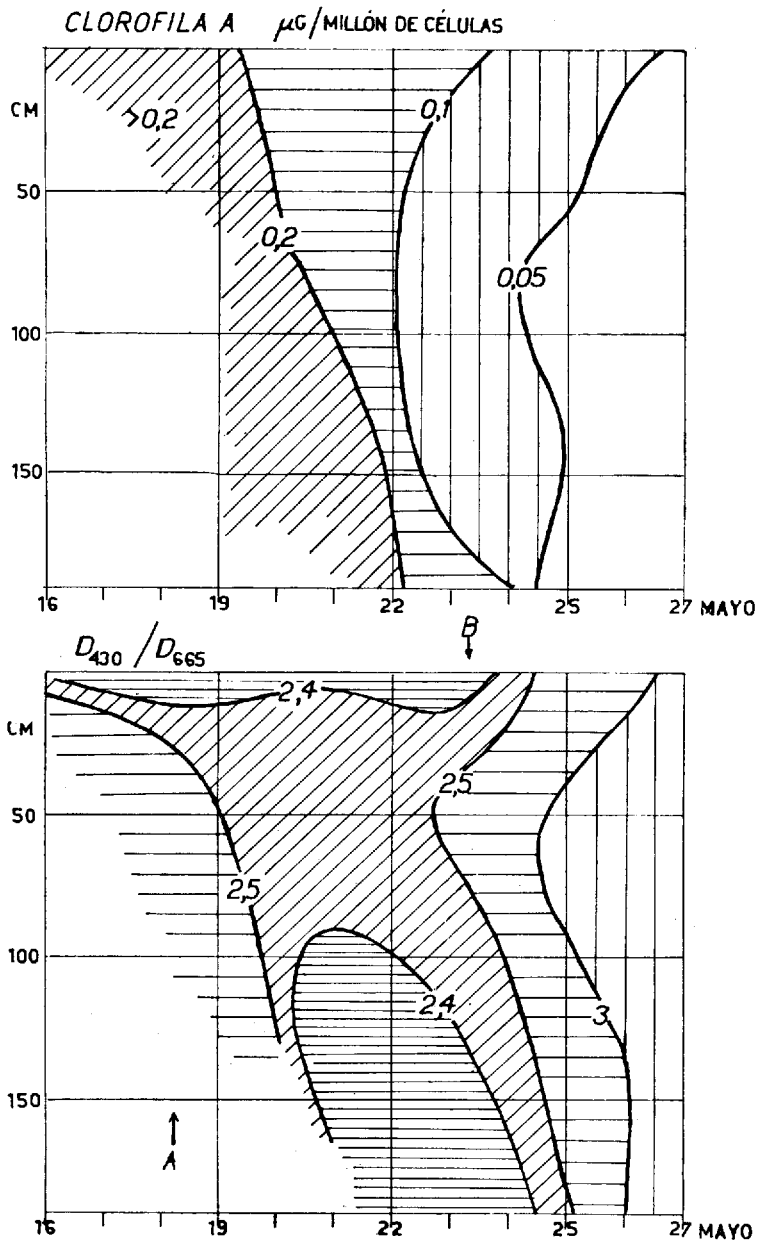


FIG. 2. — Distribución vertical y en el tiempo de la concentración de clorofila *a* por célula (arriba) y del cociente  $D_{430}/D_{665}$  (abajo) en la serie o experiencia E. Se refiere a la misma población de *Skeletonema* de la figura 1. En el gráfico inferior, las flechas A y B señalan dos situaciones típicas en el gradiente vertical del cociente  $D_{430}/D_{665}$ : A, al comienzo del desarrollo de la población, el valor de dicho cociente aumenta hacia abajo; B, hacia el final del desarrollo de la población, el valor máximo de dicho cociente se tiene cerca de la superficie.

tiva a la biomasa y a medida que la concentración total de clorofila en las células también disminuye.

Con toda regularidad (aquí y en otros experimentos no detallados) se manifiesta el notable fenómeno consistente en que, al principio de la proliferación, cuando la concentración de elementos nutritivos es uni-

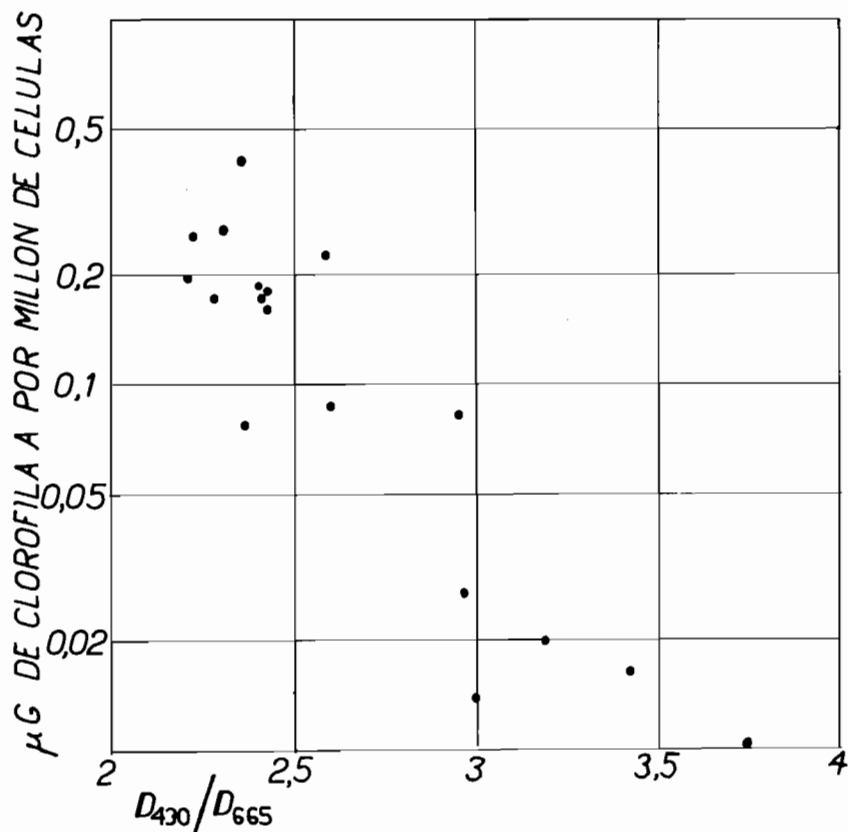


FIG. 3. — Relación entre el valor del cociente  $D_{430}/D_{665}$  (en abscisas y en escala aritmética) y la concentración de clorofila por célula (en ordenadas y en escala logarítmica) en la serie o experiencia E.

forme y la luz, que determina la intensidad de producción, muestra un gradiente notable, el valor del cociente  $D_{430}/D_{665}$  *aumenta hacia abajo*.

Después, cuando se ha desarrollado una estratificación notable en la concentración de elementos nutritivos, que han sido más consumidos en las capas superficiales, continuando en la misma forma el gradiente lumínico, el valor del cociente  $D_{430}/D_{665}$  *disminuye hacia abajo*, siendo más alto en las células que se sedimentan en agua relativamente profunda.

y poco iluminada, pero rica en elementos nutritivos. En confirmación de experiencias anteriores, puede decirse que el valor del cociente  $D_{430}/D_{665}$  está muy influido por la capacidad nutritiva del agua y, posiblemente, más por ésta que por la intensidad y calidad de la luz.

ANTIA y colaboradores (1963) se muestran escépticos sobre el valor del cociente carotinoides/clorofila (estrechamente relacionado con nuestro cociente  $D_{430}/D_{665}$ ) como indicador del estado fisiológico de poblaciones neríticas de diatomeas; sin embargo, su misma figura 3 (loc. cit. pá-

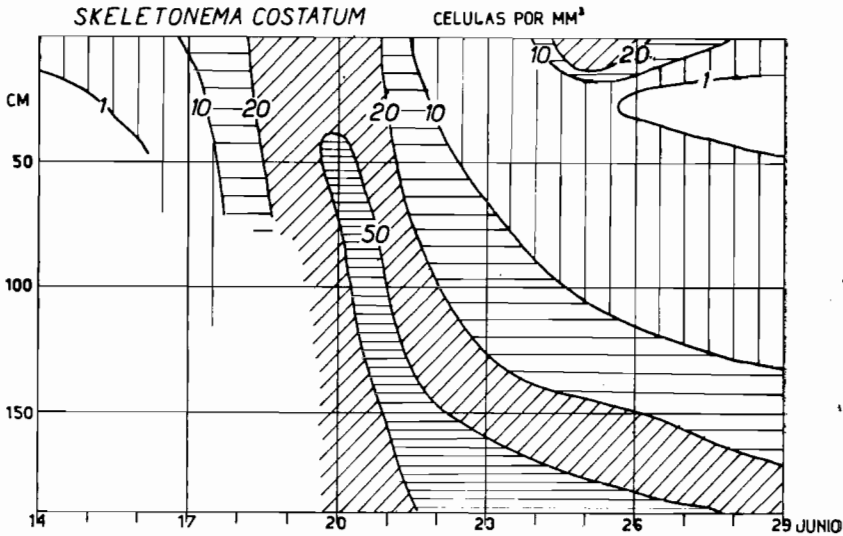


FIG. 4. — Distribución vertical y en el tiempo de la densidad de células de *Skeletonema costatum* en la serie o experiencia F.

gina 172) muestra cómo este cociente aumenta cuando la población envejece, de acuerdo con la experiencia general. Un reciente trabajo de CASSIE (1963) trae datos relativos a cultivos de *Skeletonema costatum*, que permiten calcular una correlación negativa entre los cocientes carotinoides/clorofila  $a$  y producción/biomasa, confirmando también otra relación fundamental.

Indudablemente, el cociente  $D_{430}/D_{665}$  expresa características del conjunto de la población estrechamente relacionadas con su producción y dinámica general. Pero el valor de aquel cociente depende de muchos factores y no puede pretenderse que una relación sencilla entre  $D_{430}/D_{665}$  y una característica de la población (producción/biomasa, o cantidad de clorofila por célula) se pueda formular con gran exactitud cuantitativa. La figura 3 muestra la relación entre  $D_{430}/D_{665}$  y la concentración de clorofila por célula en las diversas etapas de la serie E. La co

observada es típica de otras experiencias equivalentes. Pero la expresión numérica de la regresión varía de unos a otros casos. En la serie F, por ejemplo, para unos mismos valores de la concentración de clorofila *a* por célula, los correspondientes valores de  $D_{430}/D_{665}$  eran siempre más altos que en la serie E.

La proliferación de *Skeletonema* en la serie F fue diferente de la serie E en la menor concentración alcanzada. Las diferencias de ambiente consistieron solamente en una mayor temperatura inicial y en la presencia de una mayor densidad de población de bacterias acompañantes. La observación hecha en el párrafo anterior a propósito del cociente  $D_{430}/D_{665}$  prueba que las diatomeas manifestaron una diferencia fisiológica, a pesar de que todas procedían de una misma cepa. La comparación entre las series E y F (figs. 1 y 4) muestra cómo en la determinación de la densidad de población de fitoplancton no sólo intervienen los factores en los que habitualmente se piensa: temperatura, iluminación, concentración de fosfato, sino también otros más sutiles, como concentración de bacterias y otras partículas que pueden competir con las algas por su efecto de superficie, concentración de oligoelementos y micronutrientes, etcétera.

## FIJACIÓN DE CARBONO INORGÁNICO

En la figura 5 se expresa la variación de  $^{14}\text{C}$  contenido en el seston. Durante el mes de junio se reconocen los efectos combinados de la fijación de carbono inorgánico por la actividad de la población de diatomeas y de su transporte por la sedimentación de estos mismos organismos.

Sin embargo, esta experiencia resultó mucho más instructiva más tarde, al mostrar una intensa fijación de  $^{14}\text{C}$  en forma particulada, en ausencia de luz. A pesar de que la iluminación se interrumpió el primero de julio, durante las semanas segunda y tercera de dicho mes, la cantidad de carbono radiactivo aumentó grandemente en el seston de todos los niveles. Actualmente está en estudio la resolución del problema planteado: conocer cómo se ha fijado tanto  $^{14}\text{C}$  en el seston. Una parte procederá del carbono asimilado por la población de *Skeletonema* que ha vuelto al medio en forma orgánica, excretado por las mismas algas. Otra fracción, ciertamente pequeña, deriva de la muerte y descomposición de las diatomeas. Todo este carbono radiactivo ha podido ser asimilado por las bacterias y, por tanto, se manifiesta en el seston. Pero estas aportaciones no bastan, y se hace preciso aceptar una importante asimilación directa de carbono inorgánico por parte de las poblaciones bacterianas que forman una parte muy principal del seston. Tal fijación de carbono inorgánico

por bacterias, en la oscuridad, se ha comprobado en otras experiencias. Pero es preciso averiguar la importancia cuantitativa de este fenómeno.

El interés práctico de su conocimiento es considerable, en relación con la técnica habitual de medir la producción de las poblaciones naturales de fitoplancton. Se explican los valores anormalmente altos de fijación de  $^{14}\text{C}$  en la oscuridad que se obtienen en algunas experiencias. En la práctica de nuestro Instituto, la fijación de  $^{14}\text{C}$  en las botellas oscuras es normalmente del orden del 1 al 3 % de la fijación observada en las botellas transparentes. Pero en algunas ocasiones se obtienen valores muy

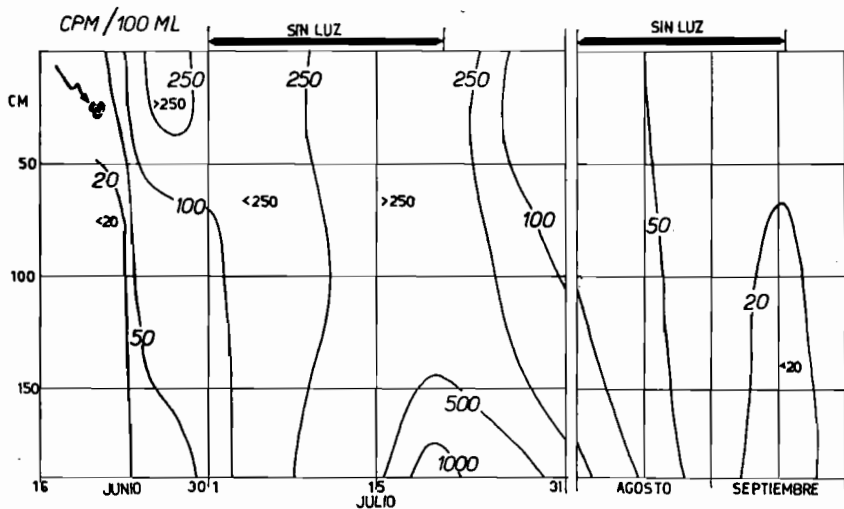


FIG. 5. — Distribución vertical y en el tiempo de la actividad de carbono radiactivo en el seston en la serie o experiencia F. El carbono radiactivo en forma de bicarbonato se añadió el 20 de junio a 25 cm de profundidad. En la parte superior se señalan los períodos durante los cuales el sistema permaneció totalmente en la oscuridad. Nótese el cambio de escala del tiempo el 1 de agosto.

altos, del 7 al 30 % y aún más. Esto acontece en dos circunstancias: o bien en aguas más o menos polutas y muy ricas en bacterias, como las del puerto de Barcelona, o bien en aguas oceánicas pobladas por organismos muy delicados que, verosímilmente, mueren y se descomponen en una gran proporción al ser confinados en las botellas experimentales. Tanto en uno como en otro caso, la actividad bacteriana es relativamente considerable. Se trata, por tanto, de un tema que merece un estudio cuidadoso, para estar en condiciones de interpretar correctamente resultados aparentemente anómalos que se obtienen al aplicar la técnica de STEEMANN-NIELSEN para la determinación de la producción primaria de las aguas dulces y marinas.



## SUMMARY

Experimental models of phytoplankton populations: Further observations on pigments and fixation of inorganic carbon. — Discussion of some results gathered from further operation of the experimental device described in MARGALEF (1963). Nice duplications of «spring blooms» of *Skeletonema* and other phytoplankters can be achieved with regularity. The ratio  $D_{430}/D_{665}$  (absorbancies at the stated wavelengths of the acetic extracts of plankton) is a good indicator of the physiological state of populations. At the beginning of the bloom, with a vertical gradient of light and uniform vertical distribution of nutrients, the value of  $D_{430}/D_{665}$  increases downwards. In an advanced stage or towards the end of the bloom, with the same light gradient, but with a strong stratification of nutrients, it decreases downwards, as it were strongly dependent from nutrient concentration and perhaps also from speed of sedimentation, rather than from intensity and quality of light.

In cultures in which  $^{14}\text{C}$  was added close to the surface, migration of the radioactivity in seston shows the combined effects of assimilation and sedimentation of cells. After darkening of the cultures an impressive fixation of  $^{14}\text{C}$  by bacteria has been observed, and it seems that it comes not only from organic material assimilated and excreted by the algae in the phase of active growth, or from dead algae, but also from direct fixation of inorganic carbon by bacteria. This fact helps to explain why, in certain conditions, production measurements by the STEEMANN-NIELSEN method gives very high  $^{14}\text{C}$  fixation values in the dark bottles. This happens mostly in polluted waters with rich bacterial flora, and also in offshore situations, where the plankton is sparse and delicate and dies and decomposes in the flasks in a fair proportion.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANTIA, N. J., C. D. McALLISTER, T. R. PARSONS, K. STEPHENS & J. D. H. STRICKLAND. 1963. Further measurements of primary production using a large-volume plastic sphere. *Limnol. and Oceanogr.*, 8: 166-183.
- CASSIE, R. M. — 1963. Relationship between plant pigments and gross primary production in *Skeletonema costatum*. *Limnol. and Oceanogr.*, 8: 433-439.
- MARGALEF, R. — 1963. Modelos simplificados del ambiente marino para el estudio de la sucesión y distribución del fitoplancton y del valor indicador de sus pigmentos. *Inv. Pesq.*, 23: 11-52.