



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA  
METROPOLITANA

---

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

“REGULACION DE LA FOTOSINTESIS DEPENDIENTE  
DE LA DISPONIBILIDAD DE NITROGENO EN  
DINOFLAGELADOS SIMBIOTES”



**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN  
**MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A :**

HIDROBIOL. MARIA AIME RODRIGUEZ ROMAN

DIRECCION: DR. ROBERTO IGLESIAS PRIETO  
y DR. MARTIN MERINO IBARRA

2000

**La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, se encuentra dentro del padrón de programas de posgrado de excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con Numero de Registro: 309-0.**

**El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por el CONACyT con número 95358.**

---

A mis amigos les adeudo la ternura  
y las palabras de aliento y el abrazo  
el compartir con todos ellos la factura  
que nos presenta la vida paso a paso.

A mis amigos les adeudo la paciencia  
De tolerarme mis espinas más agudas  
Los arrebatos del humor, la negligencia,  
Las vanidades, los temores y las dudas.

(A. Cortez)

---

## **Agradecimientos.**

Al Dr. Roberto Iglesias Prieto, por la excelente dirección de este trabajo, por su ayuda en los momentos críticos, por su comprensión, por su enorme entusiasmo y por ser el mejor de los amigos.

Al Dr. Martín Merino Ibarra, por los constantes retos que me plantea, por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo. Por todos los años compartidos siendo sin duda alguna antes que todo un amigo.

A la Dra. Laura J. Pérez Flores y al M. en C. Fernando Díaz de León S. por sus comentarios al presente trabajo y por su preocupación para que concluyera satisfactoriamente. Gracias.

A la Dra. Susana Enríquez la mejor de las amigas, por su ayuda en la realización de los experimentos y por sus buenos consejos. Gracias por ser el más grande apoyo para mí en Pto. Morelos.

A la Estación de Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM y al personal que en ella labora, por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Margarita E. Gallegos Martínez por su amistad incondicional y por ponerme en el camino de la ciencia.

A la Dra. Patricia Thomé por sus sabios consejos durante la realización de los experimentos y por los buenos momentos compartidos.

A Natalia Ayala Schiaffino por su amistad y ayuda en la etapa de experimentación y a Tito Livio Pérez Vivar por su asesoría en el manejo estadístico de los datos.

Al Hidrobiól. Sergio F. Castillo por su ayuda en la realización de los análisis químicos y por su eterna e incondicional amistad.

A Luzma, Daniella, Kor, Karla, Marissa, Nancy, Norma, Gaby, Guille, Miguel Angel, María José, Andrés, Verónica, Jaime, Griselda, Jorge, Shade, Ricardo, Mario por su amistad y por hacer mi estancia en Puerto Morelos más agradable.

A Ofelia, Graciela, Karina, Liliana G, Liliana H, Diana, Arturo y Emilio. Gracias por enseñarme el incalculable valor de la verdadera amistad, por todos los años compartidos y por los que faltan.

A Claudia, Lorena, Toño, Arturo, Silverio, Carmen y Héctor (Orca), por el gusto de haberlos conocido y por que nuestra amistad continúe por muchos años más.

A mis abuelas, tíos, primos y sobrinas por el constante amor con el que me han rodeado. A Carlos por el apoyo técnico brindando durante meses.

A Norma y Ernesto, gracias por contar con ustedes y no hasta dos o tres, sino contar con ustedes siempre. Por su cariño y apoyo. Por recordarme las ventajas de estar en familia.

A Mariana la niña más linda y buena onda del mundo, el más grande regalo que Dios ha dado a mi familia.

Y especialmente **a mi Madre** por apoyarme siempre, por amarme e impulsarme día con día y **por supuesto por ser mi mejor amiga.**

---

# **Indice**

Resumen. ....	1
Introducción. ....	2
Antecedentes.....	8
Fluorescencia. ....	14
Hipótesis de trabajo.....	24
Objetivo General. ....	24
Objetivos Particulares.....	24
Material y Método.....	26
Crecimiento de cultivos. ....	26
Determinación de la tasa de crecimiento.....	26
Concentración de nutrientes y determinación de la cuota de nitrógeno. ....	28
Mediciones de Fluorescencia.....	28
Estrés por disponibilidad de nitrógeno. ....	30
Medidas de Fluorescencia Modulada. ....	32
Análisis espectroscópicos y extracción de pigmentos. ....	36
Análisis estadístico.....	38
Resultados .....	39
Curvas de Crecimiento .....	39
Consumo y cuotas de Nitrógeno .....	42
Estrés por disponibilidad de nitrógeno .....	48
Medidas de Fluorescencia Modulada después del cambio de medio a los tratamientos N- y N+.....	57
Discusión. ....	63
Conclusiones. ....	80
Literatura Citada. ....	83

## Resumen.

Se determinó la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) de dos especies de dinoflagelados simbiotes en cultivo: *Symbiodinium kawagutii* y *S. pilosum* creciendo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. La concentración de  $\text{NO}_3^-$  del medio de cultivo fue medida en diversos puntos de la curva de crecimiento y a partir de ésta se determinó la cuota celular de nitrógeno de cada especie. Paralelamente se obtuvieron medidas de la proporción Fv/Fm. La variación en este parámetro no presentó relación con respecto a la concentración externa de nitrógeno y sí con respecto a la densidad celular. Los valores máximos en *S. kawagutii* se presentaron entre los días 15 y 19 de cultivo cuando la concentración externa de  $\text{NO}_3^-$  presentó los valores mínimos, estando en el orden de 35  $\mu\text{M}$ . En *S. pilosum* el valor máximo se registró el día 14 de cultivo, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en los valores obtenidos entre los días 8 y 23 de cultivo, a pesar de que a partir del día 12 de cultivo los niveles de  $\text{NO}_3^-$  estuvieron por debajo del límite de detección. Fv/Fm de *S. kawagutii* cayó 25 y 35% con respecto al valor máximo en los días 41 y 55 de cultivo respectivamente. Fv/Fm en *S. pilosum* presentó una caída en los días 47 y 61 de 8 y 13% respectivamente.

Los cambios generados en la maquinaria fotosintética de ambas especies fueron medidos al provocar ausencia de nitrógeno en forma de  $\text{NO}_3^-$  en diferentes etapas de la curva de crecimiento y en donde la concentración de nitratos previa al cambio de medios fue determinada por el consumo del cultivo. La ausencia de nitratos fue estudiada bajo dos condiciones: a) un medio de cultivo sin ninguna fuente de nitrógeno (N-) y b) un medio de cultivo con nitrógeno en forma de amonio (N+) cubriendo los requerimientos diarios de nitrógeno de cada especie obtenidos a partir de la cuota celular. Al inicio de la curva de crecimiento cuando la concentración externa de  $\text{NO}_3^-$  en ambas especies presentó los valores máximos, el cambio de medio a los tratamientos N- y N+ mostró una caída en el flujo máximo de electrones (ETR) con respecto al control de 43.66 y 51 % respectivamente para *S. kawagutii* y de 19.5 y 21.7% para N- y N+ en *S. pilosum*. Sin embargo, a pesar de que la caída fue mayor en *S. kawagutii*, la desactivación no-fotoquímica (NPQ) de ésta fue menor con respecto al control 40 y 27.76% para N- y N+ respectivamente, mientras que en *S. pilosum* ambos tratamientos presentaron un incremento del 57 y 41%. Al final de la curva de crecimiento cuando la concentración de  $\text{NO}_3^-$  registró los valores mínimos el comportamiento de ETR y NPQ en *S. pilosum* se invirtió. Mientras que para *S. kawagutii* dicho comportamiento se invirtió únicamente en lo que respecta al flujo máximo de electrones.

En *S. kawagutii* la variación en el flujo máximo de electrones en diferentes puntos de la curva de crecimiento estuvo acompañada de las variaciones de Fv/Fm y de la desactivación fotoquímica (qP). La desactivación no-fotoquímica no presentó un patrón definido corroborando la baja capacidad de inducir mecanismos fotoprotectores de esta especie. *S. pilosum* no presentó variaciones significativas de los tratamientos N- y N+ con respecto al control en Fv/Fm y qP. Sin embargo, el comportamiento de la desactivación no-fotoquímica fue evidencia de la alta capacidad de esta especie para inducir mecanismos fotoprotectores.

## ***Introducción.***

Los nutrientes de los océanos proceden en su mayoría de los aportes fluviales. Por lo que se aprecia un claro gradiente horizontal, con un máximo en las zonas próximas a la costa y disminuyendo hacia la zona oceánica, donde se presentan las menores concentraciones de nutrientes con respecto a todas las aguas marinas (Owens, 1993; Sevilla, 1976). Salvo en las llamadas zonas de surgencia, donde por características especiales aguas de niveles profundos ricas en nutrientes son arrastradas hacia la superficie.

En el mar poca luz penetra por debajo de los ochenta metros. De esta forma la energía contenida en la biosfera marina finalmente deriva de la capa superficial. En la zona fótica existe la cantidad de luz adecuada para la fotosíntesis de productores primarios. Durante este proceso elementos esenciales, iones y otras sustancias aumentan su complejidad formando compuestos orgánicos, de tal forma que la fotosíntesis es el primer y crucial paso en la producción de biomateriales. Posteriormente los productores primarios son consumidos por herbívoros, y éstos a su vez por carnívoros formando complejas redes alimenticias.

La sedimentación de biomateriales como cadáveres y productos de excreción de la zona fótica provee de alimento a la zona afótica. En diversos estratos este material puede ser remineralizado o bien viajar lentamente hacia el fondo, donde es consumido por detritívoros, quienes a su vez son presas de carnívoros (Horne, 1969).

La recuperación de nutrientes en el agua se realiza a partir de los detritos que alcanzan el fondo antes de que su descomposición sea completa. Esta recuperación en la zona costera se realiza en los lodos del fondo, mientras que en la zona oceánica aparentemente ocurre en aguas profundas (Sevilla, 1976).

La mezcla vertical de la columna de agua controla la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento del fitoplancton, ya que se presenta un enriquecimiento en los niveles superiores con sustancias nutritivas de niveles inferiores (Marra, 1980; Sevilla, 1976). Esta mezcla vertical se produce cuando hay un rompimiento de la termoclina. La temperatura en una columna de agua desciende lentamente en el estrato superior, cerca de la superficie, hasta llegar a un nivel en el que se registra un descenso brusco en este parámetro. Esta zona de discontinuidad térmica es denominada termoclina.

La variación estacional de los nutrientes en la zona templada en la cual los estratos superiores quedan enriquecidos con nutrientes al establecerse la termoclina después de la mezcla invernal de las aguas, ocasiona el florecimiento planctónico. Posteriormente las sustancias disminuyen paulatinamente como resultado del consumo de organismos autótrofos.

En la zona tropical la cantidad de nutrientes presente a lo largo del año es más o menos constante y se mantiene en niveles comparativamente bajos, en este caso la mezcla parcial de agua y enriquecimiento de nutrientes en los niveles superiores coincide con la temporada de vientos (Sevilla, 1977).

Debido a la baja disponibilidad se ha postulado a los nutrientes como los factores limitantes de la productividad primaria oceánica (Owens, 1993).

Numerosos estudios han sido realizados para determinar los efectos de la limitación por nutrientes en la productividad primaria. Sin duda alguna, el mayor conocimiento en torno a este tema ha sido derivado de estudios de limitación por nitrógeno. Si bien el nitrógeno ha acaparado la atención en las investigaciones, también el fósforo ha sido postulado como uno de principales factores limitantes del crecimiento. En años recientes, se ha demostrado la importancia de la limitación por hierro en aquellas cuencas oceánicas en las que el N y P son abundantes en la zona fótica, pero la concentración de clorofila es baja (LaRoche *et al.*, 1993).

La limitación por nutrientes tiene como efectos finales la reducción de la actividad fotosintética y la disminución del crecimiento. Debido a las funciones específicas de cada nutriente, se sugiere que los mecanismos que llevan a la reducción en el crecimiento pueden ser nutriente-específicos (Geider *et al.*, 1993). Sin embargo, la reducción de la actividad fotosintética, parece tener respuestas comunes para muchos elementos. La pérdida de pigmentos, denominada clorosis por ejemplo, es resultado de la limitación por elementos esenciales como: nitrógeno, fósforo, hierro y sulfatos (Kolber *et al.*, 1988; Herzig y Falkowski, 1989; Greene *et al.*, 1991).

La fotosíntesis es un proceso que involucra dos fases: a) la fase de transferencia de electrones cuya finalidad es la transformación de energía luminosa en poder reductor y ATP y b) la fase de síntesis en la cual se lleva a cabo la fijación de CO<sub>2</sub> para la formación de carbohidratos, entre muchas otras funciones. Se sabe que la demanda de ATP y poder reductor en los procesos de biosíntesis juega un papel determinante en la eficiencia con la cual se llevan a cabo las reacciones de fotoquímica primaria. Es decir, el flujo de electrones a través de la cadena de transporte está modulado por la tasa de consumo de poder reductor y ATP (Wykoff *et al.*, 1998).

En el agua de mar las formas nitrogenadas de mayor concentración son nitratos (1-500 µg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> N / lt), seguida de los nitritos (<0.1-50 µg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> N / lt) y el amonio (<1-50 µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> N / lt) (Riley y Chester, 1971). En presencia de amonio y nitrato las comunidades fitoplanctónicas incorporan rápidamente el primero, al parecer por ser la especie de nitrógeno más reducida lo que implica un menor costo energético.

Durante la fase de biosíntesis una gran proporción de poder reductor es requerida para la reducción de algunos otros elementos. Tal es el caso de organismos que crecen en un ambiente cuya única fuente de nitrógeno está en forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> la forma más oxidada de nitrógeno. Para la reducción de una molécula de nitrato hasta amonio son requeridos 8 electrones. En este proceso

intervienen dos enzimas: la enzima nitrato-reductasa (NR) y la nitrito-reductasa (NiR). En la primera etapa de reducción a nitritos, el NADPH ha sido identificado como el donador de los 2 electrones requeridos para la NR, mientras que el donador de los 6 electrones restantes para la NiR es directamente la ferredoxina reducida (Alberts et al., 1994; Huppe y Turpin, 1994).

De esta forma, la disminución abrupta en la concentración externa de nitratos puede generar una considerable disminución de la tasa de consumo de poder reductor, presentándose una acumulación de éste similar a la presentada durante el estrés por exceso de luz.

Actualmente, la mayor parte de los estudios en torno a la limitación por nutrientes han sido abordados bajo condiciones experimentales donde la limitación es forzada por un cambio abrupto del medio de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial, provocando la ausencia del nutriente limitante en un lapso de tiempo corto (Rhiel *et al.*, 1986; Geider *et al.*, 1993; LaRoche *et al.*, 1993; Wykoff *et al.*, 1998), lo cual podría constituir un estrés más que una limitación.

Bajo condiciones de estado-estacionario la limitación por nutrientes ha sido abordada en muy pocos casos. Los efectos presentados bajo esta condición experimental son similares a los generados durante un cambio abrupto, pero menos drásticos (Herzig y Falkowski, 1986; Kolber *et al.*, 1988; Berges *et al.*, 1996) pudiendo ser más representativos de los efectos de una limitación real.

A pesar de que la desaparición de los nutrientes en ambientes naturales se presenta lentamente, no existen trabajos previos en donde el cambio a un medio limitado por un nutriente se realice en diferentes etapas de la curva de crecimiento del cultivo, y en donde la concentración del nutriente en cuestión haya sido paulatinamente consumida por el cultivo.

En el presente trabajo se pretende hacer una distinción entre limitación y estrés. Provocando un estrés por disminución drástica de la tasa de consumo de poder reductor y una limitación por nitrógeno, a través del cambio de células a un medio sin ninguna fuente de nitrógeno como en el resto de los experimentos realizados hasta ahora. Y provocando un estrés pero descartando la limitación por nitrógeno, por el cambio de células a un medio con nitrógeno en forma reducida ( $\text{NH}_4^+$ ) suficiente para cubrir los requerimientos diarios de nitrógeno. La distinción entre limitación y estrés fue seguida a lo largo de toda la curva de crecimiento de los cultivos teniendo en cuenta de esta manera, las diferencias a través del abatimiento paulatino de la concentración de nitratos del medio. Tratando de diferenciar si la respuesta de la maquinaria fotosintética es debida a la pérdida de nitrógeno como elemento o si es producto de una acumulación de poder reductor, por la pérdida de un aceptor final de electrones.

La respuesta de la maquinaria fotosintética fue estudiada en dos especies de dinoflagelados simbiotes. A pesar de que la forma de nitrógeno con la que crecen ambas especies en ambiente natural es el amonio, ya que en la asociación intacta el animal provee el nitrógeno (Trench, 1974), el crecimiento en cultivo esta sustentado por nitratos.

Al crecer en un medio con nitratos como única fuente de nitrógeno la pérdida abrupta de esta fuente generará una acumulación de poder reductor. Se piensa que la respuesta puede ser universal presentándose en cualquier organismo fotosintético y que será muy similar a la presentada durante un estrés por exceso de luz.

Por otro lado, existe una ventaja al comparar las respuestas del aparato fotosintético de *Symbiodinium kawagutii* y *Symbiodinium pilosum* ya que al ser simbiotes de invertebrados viven en un régimen predecible de luz. A diferencia de las comunidades fitoplanctónicas, en donde la mezcla turbulenta

de la parte superior del océano previene la estratificación vertical disminuyendo la presión de selección para el desarrollo de fotoadaptación.

Al vivir en régimen predecible de luz se pueden distinguir diferencias en fotoadaptación *sensu* Darwin entre ambas especies de dinoflagelados simbiotes. *Symbiodinium kawagutii* el simbiote del coral escleractineo *Montipora verrucosa* es una especie adaptada a baja irradiancia. En estudios previos se ha demostrado que presenta una baja capacidad fotoaclimatatoria a alta densidad de flujo de fotones con síntesis e incorporación limitada de pigmentos fotoprotectores del ciclo de las xantofilas, teniendo de esta forma una baja capacidad de inducir mecanismos de desactivación no-fotoquímicos (Iglesias-Prieto y Trench, 1997b). Mientras que *S. pilosum* simbiote del zoántido *Zoanthus sociatus* es una especie adaptada a regímenes de alta luz, capaz de inducir de forma eficiente mecanismos de desactivación no-fotoquímicos con una alta capacidad de síntesis e incorporación de pigmentos fotoprotectores del tipo de las xantofilas (Iglesias-Prieto y Trench, 1994; 1997).

## ***Antecedentes.***

En el aparato fotosintético, durante la fase de transferencia de electrones, la luz es absorbida por los pigmentos antena, y la energía de excitación es transferida a los centros de reacción de los fotosistemas I y II (FSI y FSII) los cuales son complejos proteína-pigmento con una conformación especial que permite que se lleve a cabo la separación de cargas. El fotosistema II al excitarse transporta electrones hasta la plastocianina, la cual interactúa con el fotosistema I, donando un electrón para el regreso al estado basal de P<sub>700</sub>. El fotosistema II es regenerado al tomar electrones del agua (Rutherford, 1989). El fotosistema I al excitarse con luz transporta electrones hasta la ferredoxina. La fase de transferencia de electrones o fase luminosa juega un papel determinante en el metabolismo del cloroplasto, ya que utiliza la luz, para generar poder reductor en forma de NADPH y ferredoxina reducida (Chitnis, 1996).

La formación de ATP esta acoplada a las reacciones fotoquímicas a través de un gradiente de pH transmembranal. La concentración de protones en el lúmen se va incrementando (acidificación) mediante dos procesos el rompimiento de las moléculas de agua, necesario para el regreso de P<sub>680</sub> el centro de reacción del fotosistema II a su estado basal, y durante el transporte de los dos electrones que se unen al segundo aceptor de tipo quinona (QB) de fotosistema II. Simultáneamente el estroma se alcaliniza. La ATPasa utiliza la fuerza proton-motriz del gradiente de pH para la formación de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (fig. 1).

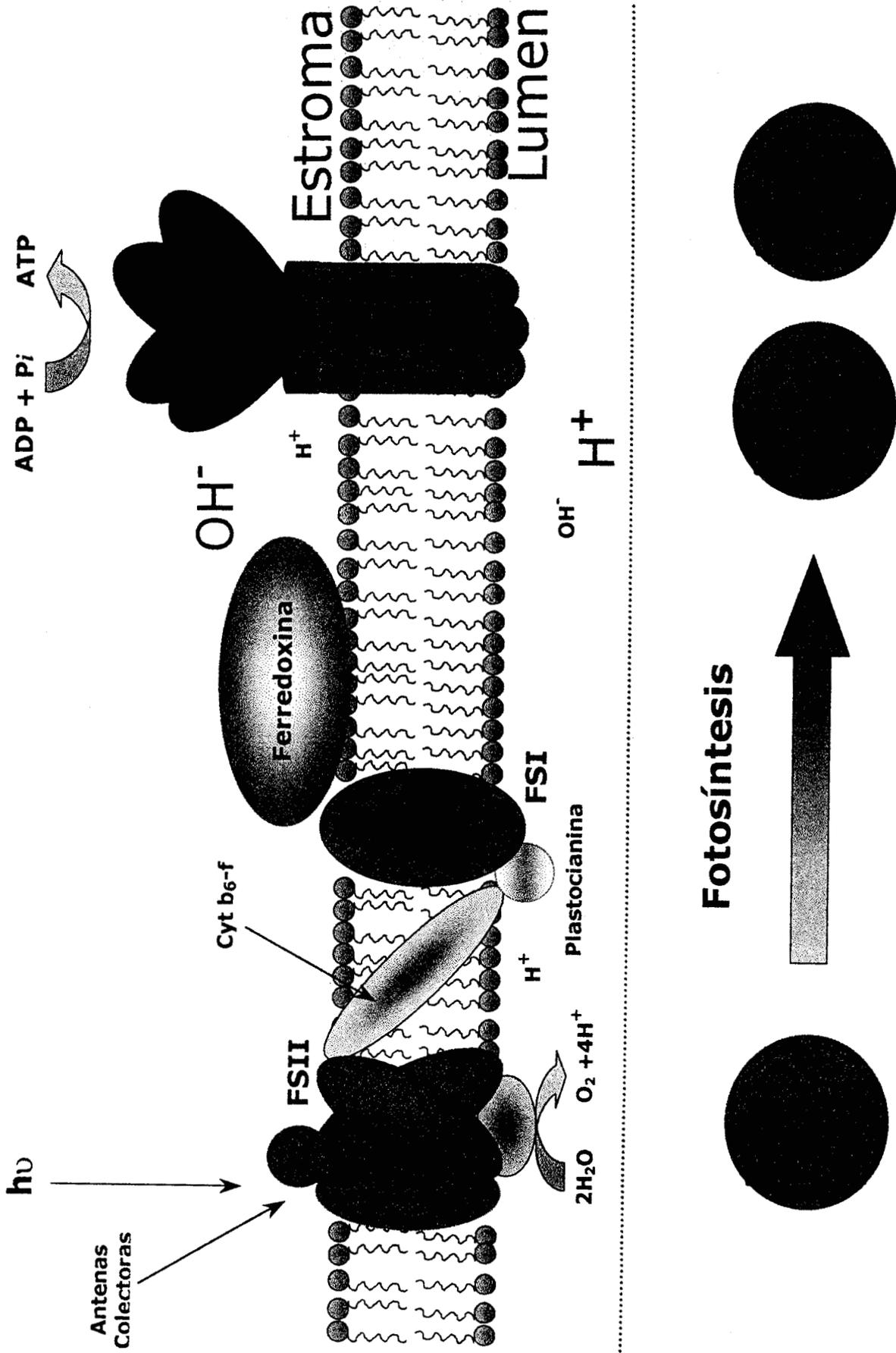
El ATP y el poder reductor generados en las reacciones fotoquímicas son requeridos para la síntesis de numerosos compuestos del metabolismo de los vegetales, como la reducción de carbono y otros procesos de biosíntesis (Alberts et al., 1994; Huppe y Turpin, 1994).

La ferredoxina es el aceptor final de electrones del fotosistema I, esta proteína tiene características únicas y es la responsable de distribuir el poder reductor hacia múltiples aceptores. Se destacan dos funciones principales: a) donar electrones en un sistema no cíclico al NADP para producir poder reductor en forma de NADPH requerido principalmente en la fijación de carbono, y b) donar electrones de regreso a la cadena de transporte en un sistema cíclico que resulta únicamente en la formación de ATP (Hall y Rao, 1994). Además de estas dos funciones principales la ferredoxina proporciona el poder reductor requerido para la reducción de materiales inorgánicos como sulfatos, nitratos, hidrógeno y oxígeno; de proteínas como la tiorredoxina y de compuestos orgánicos como el acetileno y únicamente en bacterias para la síntesis de oxoácidos.

Cabe resaltar que los procesos de biosíntesis antes mencionados tienen la finalidad de generar el material suficiente para la división celular. De este modo, podemos ver a la fotosíntesis no únicamente como la formación de carbohidratos, sino como el factor determinante para la formación de tejido nuevo en vegetales superiores y el crecimiento de las poblaciones cuando se trata de organismos unicelulares (fig. 1).

Las respuestas de la maquinaria fotosintética, tanto de vegetales terrestres como acuáticos están moduladas por parámetros físico-químicos del ambiente. Tal vez los más frecuentemente estudiados son la temperatura y la irradiancia. La variación de estos parámetros, por arriba o por debajo de las condiciones óptimas puede generar un estrés. La combinación de diferentes factores de estrés, puede resultar en una intensificación, sobrelapamiento o reversión de los efectos en el aparato fotosintético (Osmond *et al.*, 1987).

En condiciones de luz por debajo del óptimo, las reacciones fotoquímicas ocurren con alta eficiencia, el 90% de los cuanta absorbidos son utilizados para la fotosíntesis en vegetales superiores y cerca del 70 % de éstos en microalgas. Sin embargo, un gran número de procesos compiten por la desactivación de pigmentos excitados entre estos procesos se encuentran: la fluorescencia, la



## Fotosíntesis

**Fig. 1.** Durante las reacciones fotoquímicas la luz absorbida por los pigmentos antena es transferida a los centros de reacción donde se lleva a cabo la separación de cargas, formando ATP y poder reductor. El consumo de éstos tiene como función final además de la formación de carbohidratos, la asimilación de diversos elementos para cubrir las cuotas celulares necesaria para una siguiente división.

transferencia de excitación, las reacciones fotoquímicas, la disipación en forma de calor y la desactivación no-fotoquímica (Kraus y Weis, 1991).

La exposición a alta irradiancia lleva una reducción de la capacidad fotosintética, fenómeno conocido con el nombre de fotoinhibición. Los efectos en la eficiencia de la separación de cargas del fotosistema II, en vegetales expuestos a alta iluminación son observados antes de que ocurra la reducción en la tasa máxima de fotosíntesis ( $P_{m\acute{a}x}$ ). El grado de disminución en la eficiencia refleja el balance entre dos procesos conjuntos: el fotoprotector, en el cual ocurre la disipación de energía en forma de calor, y el de daño, donde la renovación de proteínas claves del FSII, especialmente la proteína D1, es alterada (Franklin, *et al.*, 1996). Esta reducción en la capacidad de transporte electrónico del fotosistema II, se ha observado en organismos sometidos a diferentes tipos de estrés ambiental como: elevadas temperaturas (Havaux, *et al.*, 1991; Iglesias-Prieto, *et al.*, 1992; Maxwell *et al.*, 1993), y limitación por macro y micronutrientes como el nitrógeno, el fósforo, el hierro y el sulfato (Geider, *et al.*, 1993; Herzig y Falkowski, 1989; LaRoche *et al.*, 1993; Wykoff *et al.*, 1998).

A pesar de que la limitación por nutrientes tiene una respuesta común en la actividad fotosintética, parecen existir diferencias cuantitativas y cualitativas. Dichas diferencias han sido explicadas con base en la función que desempeña cada nutriente. El carbono y el nitrógeno son componentes esenciales para la síntesis de proteínas. El fósforo es parte de ácidos nucleicos y de lípidos de membrana, actuando también como acarreador de sustratos y fuente de energía química (nucleótidos), sin olvidar que es un elemento esencial en las modificaciones posttraduccionales reversibles de las proteínas (fosforilación-defosforilación). El hierro, es un componente del sistema de acarreadores electrónicos de cloroplasto y mitocondria (LaRoche *et al.*, 1993).

La mayoría de los estudios realizados en torno a la limitación por nutrientes en fitoplancton marino han sido enfocados al nitrógeno. Se han

estudiado los efectos en la fotosíntesis por reducción del contenido de clorofila *a* (Chl *a*) y aumento de la actividad no-fotoquímica de pigmentos carotenoides (Herzig y Falkowski, 1989), así como los efectos en la conversión fotoquímica de la energía por disminución en la síntesis de proteínas cloroplásticas (proteínas de centros de reacción de FSI y FSII), han sido bien documentados (Kolber *et al.*, 1988, Rhiel *et al.*, 1986).

Se ha observado que también puede afectar la relación funcional entre la cosecha de luz y la conversión de energía fotosintética en el fotosistema II. Herzig y Falkowski (1989) encontraron un incremento en la absorción de la sección transversal del fotosistema II (FSII) asociado con una disminución en pigmentación, debida a dos causas: 1) un aumento de pigmentos accesorios como carotenoides y Chl *c*, con respecto a la Chl *a*; y 2) una reducción en el apilamiento y la absorción de las membranas del tilacoide. Geider *et al.* (1993), encuentran resultados muy similares con respecto a la disminución de la proporción Chl *a*/carotenoides, dando como resultado final una reducción en la densidad de los centros de reacción por célula, pero con un aumento del tamaño efectivo de la antena de fotosistema II.

Kolber *et al.*, (1988) y Rhiel *et al.*, (1986) encontraron efectos similares en lo que respecta a la conversión de energía fotoquímica; sin embargo, esta disminución presentó una correlación con la disminución en la síntesis de proteínas. Aparentemente esta disminución repercute más fuertemente en proteínas cloroplásticas (específicamente en proteínas de los centros de reacción) que en proteínas de citoplasma. Kolber *et al.*, (1988) demuestran que los niveles de la proteína CP47 la cual media la transferencia de la energía de excitación de los complejos antena hasta los centros de reacción de FSII, y de la proteína D1 (proteína estructural del centro de reacción de FSII) disminuyen marcadamente en relación con otras proteínas en células creciendo en un medio limitado por nitrógeno.

Los efectos de la carencia de nitrógeno, también han sido descritos al nivel de la organización celular de criptofitas, donde se ha demostrado que el aparato fotosintético es afectado particularmente en lo que respecta a las biliproteínas de los complejos antena de los fotosistemas I y II. Este efecto puede ser significativamente aumentado por la intensidad de luz (Rhiel *et al.*, 1985).

Se sabe que la asimilación de nitrógeno es un proceso dependiente de la fotosíntesis, la cual además de generar el poder reductor, contribuye con los esqueletos de carbono necesarios para la síntesis de aminoácidos. En pulsos de asimilación de nitrógeno en oscuridad se estimula el flujo de carbono hacia las rutas glucolíticas y respiratorias (Vergara *et al.*, 1995).

Como ya se mencionó en el agua de mar las formas nitrogenadas de mayor a menor concentración son los nitratos, seguida de nitritos y amonio (Riley y Chester, 1971). La incorporación de nitrógeno en organismos fitoplanctónicos presenta una cinética tipo Michaelis-Menten (sugiriendo la presencia de un transportador en membrana). En la presencia de nitratos, amonio y urea, la preferencia es sobre el amonio. La preferencia de amonio sobre nitratos, ha sido generalmente atribuida al estado reducido del amonio (Valiela, 1984; Lavasseur, *et al.*, 1993).

Al ser el amonio la forma preferente de nitrógeno que se incorpora pero al estar en baja concentración en ambientes marinos, el abatimiento de éste es muy rápido. Y una vez agotado el amonio las comunidades fitoplanctónicas sustentan su crecimiento en la incorporación de nitratos como única fuente de nitrógeno (Valiela, 1984; Riley y Chester, 1971).

Se han propuesto algunas estrategias de adecuación para la asimilación de nitratos, ya que ésta implica un gasto energético mayor comparado con la asimilación de amonio entre éstas se encuentran: 1) reducción en tasas de crecimiento y/o en cuotas de nitrógeno y carbono; 2) aumento en la eficiencia de absorción de luz, reflejado por un aumento en pigmentos y/o aumento en la

sección transversal de absorción de la clorofila *a*. y 3) un aumento en la eficiencia fotosintética neta, con menor fluorescencia de Chl *a in vivo* o mayor producción neta de O<sub>2</sub> (Lavasseur, *et al.*, 1993).

## **Fluorescencia.**

Durante los últimos años, ha habido un rápido progreso en la evaluación de la fotosíntesis por mediciones de fluorescencia la cual proporciona una amplia información acerca del funcionamiento fotosintético de los vegetales. Esta señal es controlada por algunos factores que están estrechamente relacionados con propiedades fundamentales del aparato fotosintético en diversos niveles de organización: en el complejo de cosecha de luz, en la fotoquímica primaria, en el transporte de electrones y su acoplamiento con el transporte de protones (Briantais *et al.*, 1986; Renger y Schreiber, 1986; Krause y Weis, 1991).

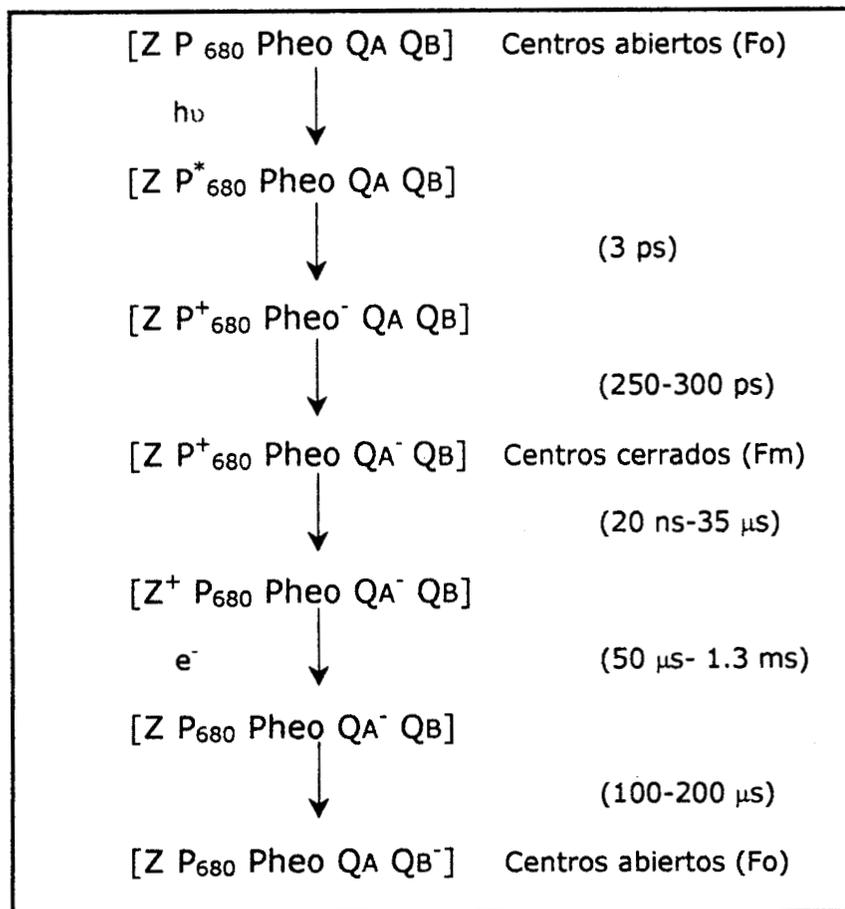
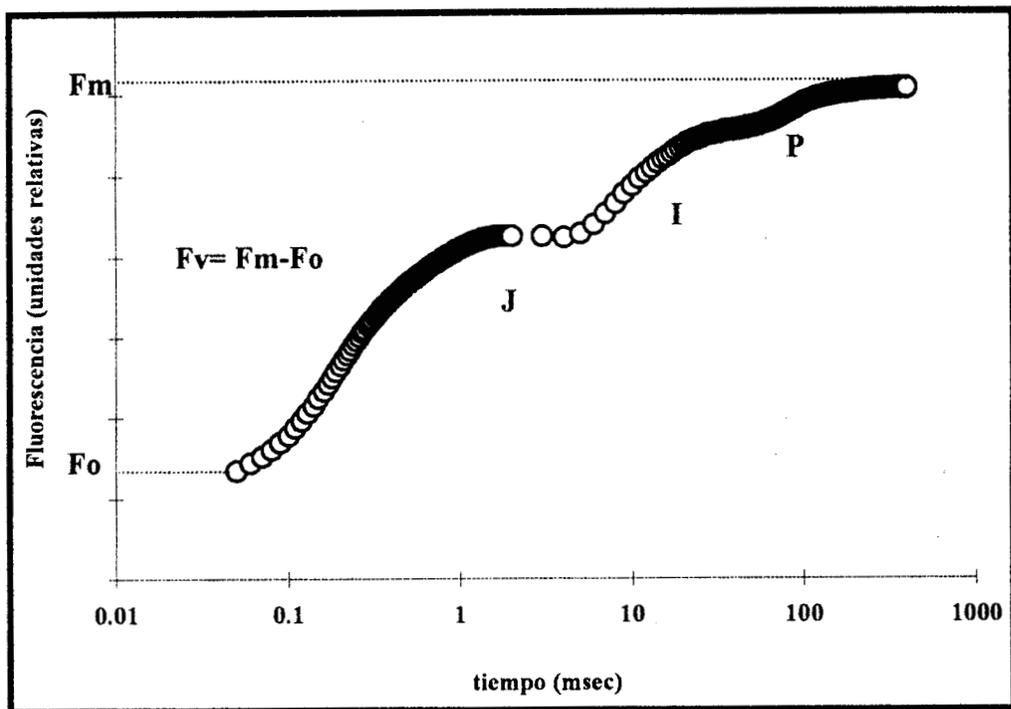
La diversidad de información de la fluorescencia tiene la ventaja de ser una señal fácilmente medida; y propiamente analizada puede ser utilizada para entender la mayoría de los complejos procesos de la fotosíntesis. Por otro lado, bajo condiciones *in vivo* es inevitable un solapamiento de varios cambios en la fluorescencia causados por mecanismos diferentes los cuales aumentan la complejidad y complican la evaluación cuantitativa de un aspecto particular (Schreiber *et al.*, 1995).

La mayoría de los estudios basados en el análisis de fluorescencia hacen referencia a la eficiencia en la separación de cargas del fotosistema II. A temperatura ambiente la fluorescencia es principalmente emitida desde el FSII. La contribución del FSI a la señal de fluorescencia a temperatura ambiente es de cerca del 20%. Sin embargo, en una primera aproximación, la cual es bien aceptada, se considera que la señal de fluorescencia es originada en el FSII (Lázar, 1999).

La energía es absorbida por el complejo de cosecha de luz y es transferida al centro de reacción del fotosistema II en donde se lleva a cabo la separación de cargas. El pigmento  $P_{680}$  es excitado a  $P^*_{680}$ , éste transfiere un electrón a la feofitina *a*. Posteriormente el electrón es transferido al aceptor primario tipo-quinona denominado QA. La separación de cargas crea un  $P^+_{680}$  activo, altamente oxidante,  $P^+_{680}$  recibe un electrón para el regreso a su estado basal de un segundo donador Z, este segundo donador es un residuo de tirosina de la proteína D1. Finalmente el donador oxidado  $Z^+$ , es reducido por un electrón del sistema de oxidación del agua. En una reacción más lenta la cual involucra un átomo de hierro, el electrón es transferido desde la quinona QA hasta la quinona QB (fig. 2). Después de recibir dos electrones, QB se une a dos protones y se fusiona dentro de las reservas de plastoquinona/plastohidroquinona (Krause y Weis, 1991).

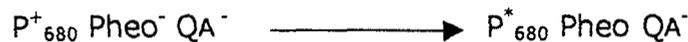
La fluorescencia emitida por la Chl *a* refleja actividades fotosintéticas de una manera compleja. Según lo propuesto por Duysens y Sweers (1963), la fluorescencia producida es mínima ( $F_0$ ), cuando todos los centros de reacción se encuentran abiertos con QA en estado oxidado (fig. 2). Se ha postulado que la fluorescencia es emitida desde la clorofila de los complejos de cosecha de luz. De esta forma  $F_0$  es entonces una emisión desde la clorofila excitada de la antena de FSII en competencia con la transferencia de excitación al centro de reacción del FSII. Esto tiene lugar antes de que el excitón alcance el centro de reacción II; es la emisión cuando los centros de reacción de FSII se encuentran abiertos. (Lázar, 1999).

Cuando QA es totalmente reducida (todos los centros de reacción están en el estado  $ZP^+_{680}PheoQA^-$ ), la excitación de  $P_{680}$  no puede resultar en una separación de carga estable, considerando pues a todos los centros de reacción cerrados, teniendo lugar la fluorescencia máxima ( $F_m$ ).



**Fig. 2.** Curva de Inducción de Fluorescencia obtenida mediante la medición con fluorómetro PEA (Hansatech). Se indican los parámetros de fluorescencia  $F_o$ ,  $F_m$  y  $F_v$ . En el cuadro inferior se definen los eventos fotoquímicos en el centro de reacción de FSII.

La emisión de fluorescencia variable  $F_v$  (dada por  $F_v = F_m - F_o$ ), describe el cambio en la fluorescencia entre los dos estados descritos, es el resultado de una recombinación de cargas entre  $P_{680}^+$  y la feofitina reducida, cuando QA esta totalmente reducida:



Kijama y Butler reportaron que la cosecha cuántica máxima de FSII puede ser expresada como  $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m - F_o) / F_m = F_v / F_m$  (Lázar, 1999).

La proporción  $F_v / F_m$  es un parámetro fácil de medir y es importante para determinar el estado fisiológico del aparato fotosintético. El estrés ambiental que afecta la eficiencia del fotosistema II lleva a una disminución característica en la relación  $F_v / F_m$  (Krause y Weis, 1991; Kolber *et al.*, 1988).

Cuando se determina fluorescencia en una muestra adaptada a la oscuridad, la proporción  $F_v / F_m$  es una medida de la cosecha cuántica potencial de FSII. La fotoinhibición causada por una densidad excesiva de flujo de fotones (PPDF) es la causa principal de la reducción de  $F_v / F_m$  bajo condiciones naturales. Sin embargo, otros factores de estrés, como estrés por calor o frío pueden llevar, directa o indirectamente vía inducción de la fotoinhibición a la disminución de la eficiencia cuántica de FSII (Ludlow 1987; Huner *et al.*, 1993). Actualmente, existe una controversia de si la reducción de  $F_v / F_m$  representa una regulación hacia abajo reversible fotoprotectora o una inactivación irreversible de FSII por reparación, la cual involucra el tiempo de renovación de la proteína D1. Se ha propuesto que la inactivación de FSII también confiere fotoprotección (Krause *et al.*, 1990) o bien que puede ser parte de un mecanismo de ajuste de la eficiencia de FSII a la densidad de flujo de fotones (Bilger *et al.*, 1995).

En la actualidad han sido desarrollados fluorómetros con los cuales es posible realizar la medición de fluorescencia bajo condiciones de luz ambiente y

aún bajo luz solar (Schreiber *et al.*, 1986). De esta forma las mediciones de fluorescencia pueden proveer información de la utilización y disipación de la energía luminosa en estado-estacionario, es decir, cuando la fotosíntesis es totalmente operativa (Bilger *et al.*, 1995).

Durante iluminación, la eficiencia cuántica de FSII depende del consumo de energía de las reacciones oscuras. De esta forma el monitoreo de la actividad de FSII por mediciones de fluorescencia puede proveer información de la tasa de transporte de electrones, y bajo ciertas condiciones, también permite la estimación de la fijación de CO<sub>2</sub> (Weis y Berry, 1987; Genty *et al.*, 1989; Edwards y Baker, 1993; Oberhunner *et al.*, 1993).

El fluorómetro portátil PAM-2000 combina la técnica de medición de pulsos modulados, lo cual permite la detección precisa de la fluorescencia en luz de día natural. Además esta técnica también permite hacer estimaciones constantes de qP (desactivación fotoquímica de la fluorescencia) y de qE (desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia); del estado redox de la cadena de transporte de electrones y del estado de energía en los cloroplastos de hojas (Schreiber *et al.*, 1986).

El análisis de la desactivación de la fluorescencia revela que dos tipos fundamentalmente diferentes de desactivación pueden reducir el nivel de la fluorescencia máxima producida F<sub>m</sub>. Solo uno de éstos, (la desactivación fotoquímica) puede ser rápidamente suprimido por la aplicación de un pulso corto de luz saturante el cual resulta en el cierre de todos los centros de reacción de FSII. El otro tipo (la desactivación no-fotoquímica) se forma de manera relativamente lenta y puede ser causado principalmente por la energización de la membrana del tilacoide. Esto involucra una variedad de mecanismos de desactivación a nivel de la antena y del centro de reacción de FSII (Krause y Weis, 1991, Demmig-Adams, 1990, Schreiber y Neubauer, 1990).

La técnica de pulsos modulados empleada en el fluorómetro PAM-2000 está libre de los artefactos al prender o apagar luz saturante y actínica que se encuentran en otros sistemas de amplificación convencional, permitiendo la resolución de la inducción rápida.

En este fluorómetro las tres fuentes de luz y el detector de fluorescencia se conectan al clip o cámara por una sola fibra óptica. La luz modulada o haz de medición es suficientemente bajo para no causar una inducción de fluorescencia apreciable. La luz actínica y el pulso saturante inducen fluorescencia (fig. 3).

Con el avance en el análisis de la desactivación de la fluorescencia ha sido posible obtener información cuantitativa de la fotosíntesis en estado estacionario, similar a la obtenida por métodos de intercambio de gas. Weis y Berry (1987) y Genty *et al.* (1989) derivaron expresiones empíricas para la cosecha cuántica relativa del FSII basados en parámetros de fluorescencia determinados por el análisis de la desactivación (Schreiber *et al.*, 1995).

A continuación se presentan las fórmulas para la cuantificación de la desactivación fotoquímica y no-fotoquímica propuestos por Schreiber *et al.*, (1986) descritos en la curva de fluorescencia (fig. 3):

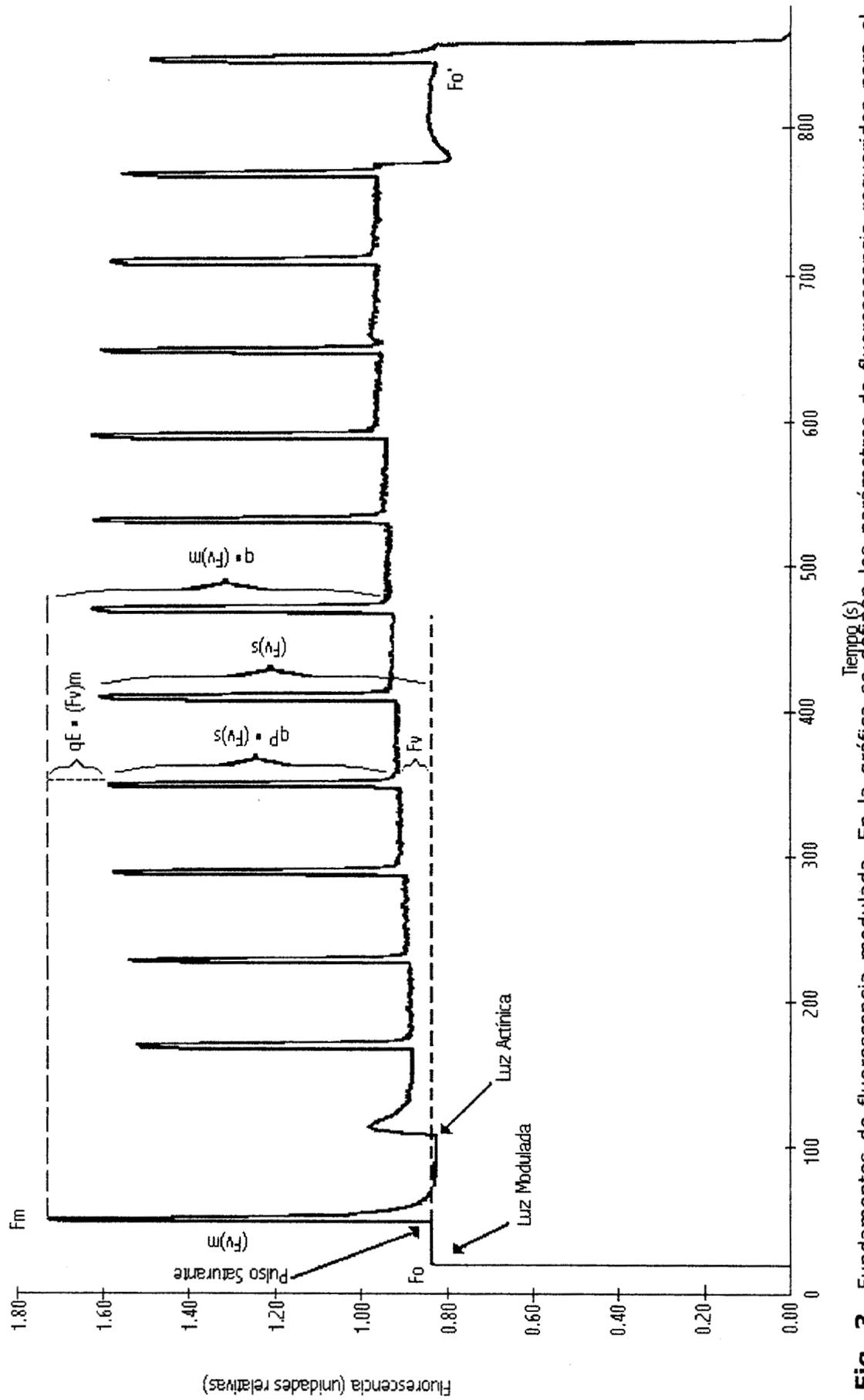
$$F_v = (F_v)_m - q (F_v)_m \quad (1)$$

donde  $q$  es el coeficiente de desactivación el cual puede variar entre  $q=0$  (con 100 % de  $QA^-$ ;  $qE=0$ ) y  $q=1$  (total supresión de  $F_v$ ).

$$F_v = (F_v)_s - qP (F_v)_s \quad (2)$$

$$(F_v)_s = (F_v)_m - qE(F_v)_m \quad (3)$$

$$F_v = (F_v)_m - qE(F_v)_m \quad (4)$$



**Fig. 3.** Fundamentos de fluorescencia modulada. En la gráfica se definen los parámetros de fluorescencia requeridos para el análisis de la desactivación fotoquímica y no-fotoquímica.

sustituyendo en 4 (Fv)s de la ecuación 3.

$$Fv = (1-qE)(1-qP) (Fv)m$$

$$1-qP = \frac{Fv}{(Fv)s}$$

$$qP = \frac{(Fv)s - Fv}{(Fv)s}$$

$$1-qE = \frac{(Fv)s}{(Fv)m}$$

$$qE = \frac{(Fv)m - (Fv)s}{(Fv)m}$$

Donde (Fv)m es la fluorescencia variable (máxima) cuando QA está totalmente reducida; Fv es la fluorescencia variable; y (Fv)s es nivel de saturación de la fluorescencia variable.

En campo, bajo diversas condiciones, la eficiencia cuántica es activamente regulada hacia abajo por mecanismos de control fisiológicos que optimizan el funcionamiento de la planta y proveen protección de los efectos de daño por exceso de luz (Horton *et al.*, 1996).

El potencial de oxidación extremadamente alto necesario para la oxidación del H<sub>2</sub>O es característica única del FSII, lo que requiere regulación de la cosecha de luz. El daño en el centro de reacción ocurre bajo todas las condiciones, y éste parece ser una consecuencia inevitable de la función de FSII, con centros de reacción inactivados después de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> recambios. La tasa de daño es alta en exceso de luz y es exacerbada en la presencia de otros factores de estrés. La reparación involucra desensamble, proteólisis e introducción del polipéptido D1 recién sintetizado. Esto no es energéticamente costoso; sin embargo, tiene una cinética lenta. Cuando la tasa de daño excede

la tasa de reparación, hay acumulación de centros inactivos, lo cual conduce a una declinación de la fotosíntesis (Horton *et al.*, 1996).

De lo anterior, se infiere que existe una fuerte presión de selección para reducir el incremento en la densidad de excitación en exceso de luz. La reducción en la densidad de excitación resulta de respuestas fisiológicas, como la alteración del ángulo de la hoja o el movimiento de cloroplastos para reducir la absorción de luz. A nivel molecular, la densidad de excitación es disminuida por la interrupción del funcionamiento eficiente (regulación hacia abajo) del sistema de cosecha de luz por la disipación de energía en forma de calor. Es ampliamente aceptado que el nivel de energización del tilacoide ( $\Delta pH$ ) es el sensor de luz. Esto es complicado porque el  $\Delta pH$  tiene efectos múltiples: dirige la fuerza para la formación de ATP, el  $\Delta pH$  alto restringe el transporte de electrones en el complejo citocromo  $b_6/f$ , y se propone al  $\Delta pH$  alto como la causa primaria de fotoinhibición. De hecho, el valor óptimo de  $\Delta pH$  permite simultáneamente altas tasas de fotosíntesis y disipación de energía en luz alta (Horton *et al.*, 1996).

La desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia ( $q_N$ ) proviene de un número de procesos en la membrana del tilacoide, pero la mayor fracción depende del  $\Delta pH$  y es llamada desactivación dependiente de la energía ( $q_E$ ).  $q_E$  se forma en minutos de exposición a la irradiancia y se relaja después de 1-2 min de oscuridad. Un segundo componente ( $q_T$ ) en donde la disminución de la fluorescencia esta asociada con el estado de transición es generalmente pequeño y es poco probable que sea un factor significativo en la fotoprotección. El tercer tipo de desactivación ha sido llamado  $q_I$  porque esta asociado con un grado fuerte de estrés por luz, cuando el incremento en la desactivación es irreversible o lentamente reversible. Una parte de esta desactivación ocurre por el fotodaño de los desactivadores de fluorescencia en los centros de reacción de FSII. Sin embargo, una proporción significativa proviene aún en la ausencia de cada pérdida de actividad de FSII y ha sido

referida como "desactivación sostenida" y da como en el caso de qE un papel fotoprotector.

Excepto bajo las condiciones más extremas, la "fotoinhibición" detectada como una disminución en  $F_v/F_m$  no proviene del daño en los centros de reacción (RC por sus siglas en inglés) pero si de una disipación de energía fotoprotectiva. Sin embargo, la correlación observada entre el decline de  $F_v/F_m$  y la disminución del número de RC de FSII activos sugiere que la regulación sostenida hacia abajo de la cosecha de luz y la inactivación de RC puede proceder de una manera concertada o aún provenir del mismo mecanismo (Horton *et al.*, 1996).

La extensión máxima de qE es variable entre las especies de ecología restringida. En algunas especies que crecen en baja luz se ha observado una menor capacidad de qE que las plantas que crecen en alta luz. Estos cambios también han sido observados en plantas que crecen en bajas temperaturas y cuando la capacidad fotosintética ha sido genéticamente reducida. Estas respuestas ilustran el papel fisiológico de qE en la remoción del exceso de energía absorbida y la integración de la luz absorbida y la energía utilizada para fotosíntesis. Dos características han acompañado la aclimatación de las plantas a alta luz: el incremento en el tamaño de la reserva de pigmentos del ciclo de las xantofilas y la disminución en la cantidad de complejos de cosecha de luz en plantas superiores (LHCIIb). El incremento de pigmentos del ciclo de las xantofilas está acompañado por un incremento en el máximo estado de depoxidación, el cual resulta en un mayor contenido de zeaxantina. Si la zeaxantina es un desactivador directo de la energía de excitación, entonces éste solo puede explicar la mayor capacidad de qE. Esta explicación resulta insuficiente dadas las observaciones hechas en mutantes que tienen alta proporción  $zea:chl$  pero bajo qE (Horton *et al.*, 1996).

## ***Hipótesis de trabajo.***

La disminución de la actividad fotosintética en los dinoflagelados simbios *Symbiodinium kawagutii* y *S. pilosum* asociada a una disminución drástica en la disponibilidad de  $\text{NO}_3^-$  es un mecanismo de protección, ya que gran parte del poder reductor requerido para la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  deja de ser utilizado. La acumulación de ferredoxina reducida y poder reductor en forma de  $\text{NADPH}_2$  induce mecanismos no-fotoquímicos que compiten en la desactivación de pigmentos excitados, disminuyendo la posibilidad de daño irreversible por destrucción de los centros de reacción. La actividad fotosintética no presentará esta disminución en cultivos donde los niveles de nitrógeno son abatidos por el consumo, ya que la desviación hacia otras vías del flujo de electrones utilizado por la nitrato-reductasa, se dará paulatinamente conforme se van consumiendo los nitratos.

## ***Objetivo General.***

Contribuir a esclarecer la hipótesis formulada, comparando el efecto sobre la actividad fotosintética en dos dinoflagelados simbios sujetos al estrés de la súbita reducción en la disponibilidad del ion nitrato en dos condiciones: a) sin ninguna otra fuente de nitrógeno, y b) con alta disponibilidad de nitrógeno pero en forma de amonio.

## ***Objetivos Particulares.***

- Determinar la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), y la cuota celular de nitrógeno de *Symbiodinium kawagutii* y *S. pilosum*.

- Comparar la eficiencia en la separación de cargas de FSII absoluta ( $F_v/F_m$ ) entre las dos especies, a lo largo de la curva de crecimiento de los cultivos y bajo distintas concentraciones de nitratos determinadas por el consumo de éste.
- Estimar la absorptancia de luz a partir de los espectros de absorción *in vivo* y compararla con la estimación bruta de absorptancia obtenida a partir de las medidas de luz del sensor plano del fluorómetro.
- Comparar tanto en las dos condiciones de disponibilidad de nitrógeno, como en controles las siguientes variables fotosintéticas:
  1. El flujo de electrones por medio del cálculo de la cosecha cuántica relativa ( $\Delta F/F_m'$ ) en relación a la intensidad luminosa.
  2. La inducción de desactivación no-fotoquímica.
  3. La desactivación fotoquímica.
  4. La cosecha cuántica absoluta ( $F_v/F_m$ ).
  5. Cuantificación de pigmentos: Chl a, Chl c2.

## **Material y Método.**

### **Crecimiento de cultivos.**

Los cultivos de los dinoflagelados simbiotes *Symbiodinium kawagutii* y *S. pilosum* crecieron en agua de mar artificial (medio ASPA-8A; Tabla 1), en frascos Ferbach de 2.8L con una densidad inicial de  $1 \times 10^5$  cel ml<sup>-1</sup> aproximadamente. La iluminación fue suministrada por lámparas fluorescentes con dos regímenes de luz: al inicio del experimento  $168 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , que se disminuye a  $96 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  después de las primeras medidas de fluorescencia de *S. kawagutii* ya que el régimen inicial resultó supersaturante. La luz fue medida en la base de los matraces por medio de un sensor  $4\pi$  Li-Cor. El fotoperiodo fue de 14:10 hrs (luz:oscuridad), y temperatura de  $27 \pm 3.5$  °C.

### **Determinación de la tasa de crecimiento.**

La densidad celular fue medida por medio de conteos en microscopio óptico marca Zeus con un hematocitómetro de 0.1mm de profundidad (Brigh-Line). Para eliminar la agregación celular, las alícuotas de 1.5 ml fueron previamente tratadas con una solución  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{MgSO}_4$  y fijadas con lugol y homogeneizada durante 5 min por medio de agitación en un Vortex marca Fisher. Cada dato procedió de un promedio de nueve conteos de tres alícuotas.

La curva de crecimiento fue medida a partir de la inoculación y hasta el día 19 de cultivo para *S. kawagutii* y hasta el día 23 de cultivo para *S. pilosum*. La tasa de crecimiento específica,  $\mu$ , fue determinada mediante el ajuste de los datos de densidad celular a una curva sigmoideal por medio del paquete Peakfit, considerando la sigmosidad como el tiempo de duplicación ( $r$ ).

$$\mu = \text{Ln } 2/r \text{ (Schlegel, 1979)}$$

	<b>Solución Stock</b>	<b>1 lt de medio</b>	<b>[Conc.]en 1 lt</b>
NaCl	-----	25 gr	
KCl	35 gr / 500 ml	10 ml	
Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	450 gr / 1000 ml	20 ml	
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	55 gr / 500 ml	10 ml	
NaNO <sub>3</sub>	2.5 gr / 50 ml	1 ml	580 µM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 gr / 50 ml	1 ml	73 µM
NTA	1.5 gr / 50 ml	1 ml	
Tris pH 9	100 gr / 1000 ml	10 ml	
Mezcla de Metales	-----	10 ml	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.5 gr / 50 ml	1 ml	124 µM
Mezcla de Vitaminas	-----	0.25 ml	
B <sub>12</sub>	10 µg/ml	0.1 ml	
Agua deionizada		932 ml	
<b>Mezcla de Metales PII</b>		<b>1 lt</b>	
CoSO <sub>4</sub>	4.8 mg		
EDTA 2Na	1000 mg		
FeCl <sub>3</sub> 8H <sub>2</sub> O	49 mg		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1140 mg		
MnSO <sub>4</sub>	164 mg		
ZnSO <sub>4</sub>	22 mg		
<b>Mezcla de Vitaminas 2x</b>		<b>1 lt</b>	
Ac-p-aminobenzoico	10 mg		
Biotina	0.5 mg		
Citrato de tricolina	500 mg		
Ac. fólico	2.5 mg		
Ac. folínico	0.2 mg		
Inositol (mio)	1000 mg		
Ac. Nicotínico	100 mg		
Ac. Orótico	20 mg		
Ac. D-pantoténico	100 mg		
Pirodoxamina diHCl	200 mg		
Pirodoxina HCl	40 mg		
Putrescina HCl	40 mg		
Riboflavina	5 mg		
Tiamina HCl	200 mg		
Tiamina	800 mg		

**Tabla 1.** Medio ASP-8A. Se presenta la concentración molar final de N y P.  
Con 704 µM en forma de NO<sub>3</sub> y 124 µM NH<sub>4</sub>

## ***Concentración de nutrientes y determinación de la cuota de nitrógeno.***

Las muestras para el análisis químico del medio de cultivo fueron obtenidas paralelamente a las medidas de densidad celular. Las células se separaron por centrifugación ligera a 420 g en centrifuga clínica durante 5 min. El sobrenadante fue filtrado con filtros Millipore de 0.45  $\mu$ , preservado con dos gotas de cloroformo y almacenado a -70 °C hasta su análisis.

La concentración de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^-$  del medio de cultivo fue cuantificada en un autoanalizador de flujo segmentado SAN plus SYSTEM (SKALAR), mediante los métodos estandarizados para agua de mar por Strickland y Parson (1972).

La cuota de nitrógeno fue determinada por medio del método propuesto por Monod (1949), a partir de la fórmula:

$$K = G/C$$

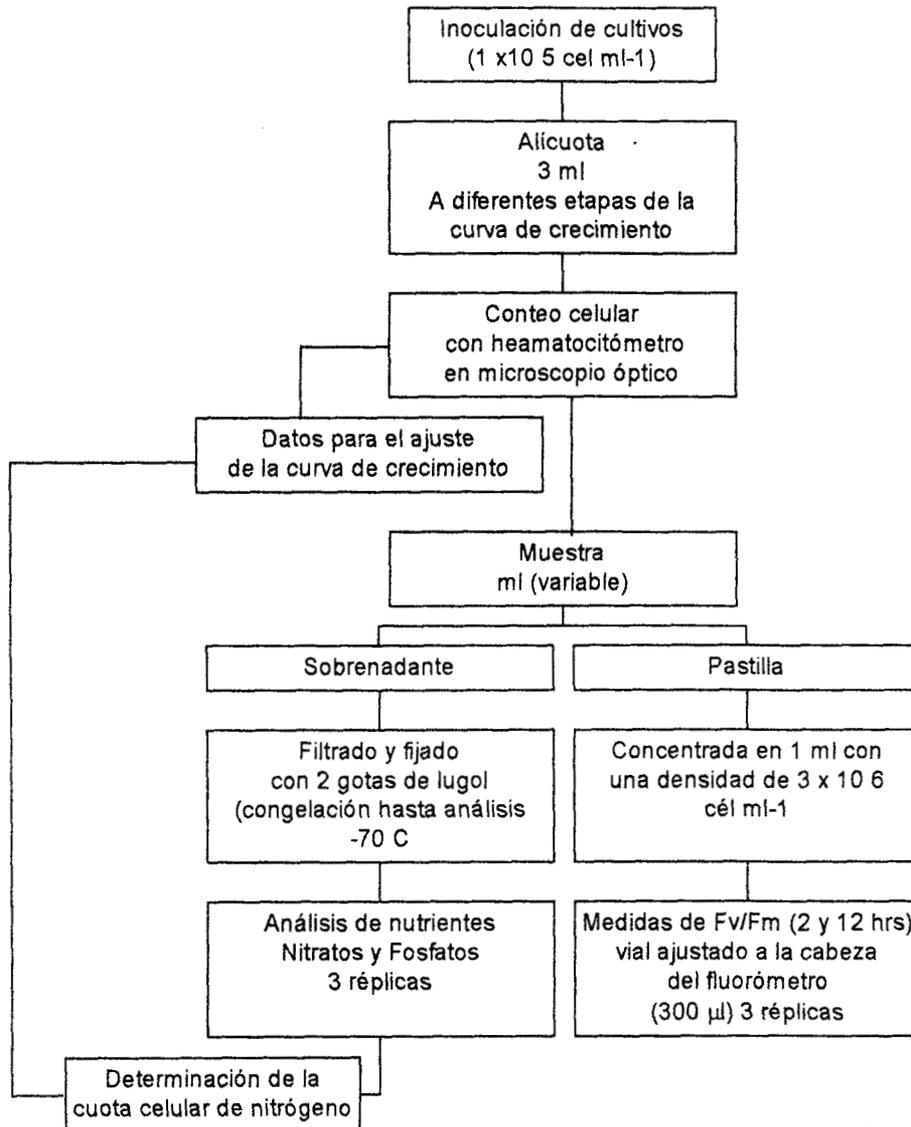
donde G es el crecimiento producido y C es la cantidad de nutriente utilizado, de tal forma que la cantidad de sustancia requerida para formar una célula nueva (cuota celular) es el inverso de K:

$$\text{cuota celular} = 1/K$$

## ***Mediciones de Fluorescencia.***

Durante las mediciones de la tasa de crecimiento, se obtuvieron medidas de la eficiencia en la separación de cargas de fotosistema II en muestras adaptadas a la oscuridad durante 5 min, con un fluorómetro PEA (Plant Efficiency Analyser de HANSATECH).

La medición de la fluorescencia fue obtenida a partir de una alícuota de 300  $\mu\text{l}$  de una solución con una concentración de  $3 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , en un vial colocado dentro de un cilindro de acrílico opaco adaptado a la cabeza del fluorómetro. Cada medición se realizó por triplicado bajo dos condiciones: después de 2 ( $t=2$ ) y de 12 ( $t=12$ ) hrs de tiempo de exposición a la luz (Diagrama 1).



**Diagrama 1.** Primera parte de experimentación. Determinación de la tasa de crecimiento, la cuota celular de nitrógeno y de la eficiencia en la separación de cargas ( $F_v/F_m$ ) en diversos puntos de la curva de crecimiento.

## ***Estrés por disponibilidad de nitrógeno.***

Una vez obtenidos los datos de consumo de nitrógeno, tasa de crecimiento de cultivo y cuotas de nitrógeno, se inició la segunda etapa de experimentación. Para esta etapa los cultivos fueron inoculados con 250 ml de cultivos "madre" en medio ASPA-8A de 12 días (máximo 18 días) de crecimiento a fin de evitar que las células de experimentación provinieran de un cultivo deficiente de nitrógeno. La densidad inicial de estos cultivos fue de  $1 \times 10^5$  cel ml<sup>-1</sup> aproximadamente.

Una vez iniciado el crecimiento de ambas especies, a lo largo de la curva de crecimiento de los cultivos se provocaron diferentes condiciones con respecto a disponibilidad de nitrógeno: 1) tratamiento N<sup>-</sup> en el cual las células se resuspendieron en medio ASP 8A modificado sin ninguna fuente de nitrógeno; 2) tratamiento N<sup>+</sup>, en el cual se resuspendieron las células en medio ASP 8A modificado, en el que la concentración de nitrógeno en forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fue determinada por las cuotas celulares de cada especie, con una concentración de 120 μM para *S. kawagutii* y de 130 μM para *S. pilosum* (Tabla 2); y 3) el control, en el cual las células se resuspendieron en el medio del cual fueron tomadas, donde la concentración de nitrógeno fue determinada por el propio consumo del cultivo generando de esta forma una variación en la concentración de nitratos, la cual osciló entre 313-100 y 465-5.4 μM para *S. kawagutii* y *S. pilosum* respectivamente.

Las células fueron concentradas por centrifugación en una centrífuga SORVAL a 3,000 g, y resuspendidas en los diferentes medios. Las células de los tratamientos N<sup>-</sup> y N<sup>+</sup> fueron lavadas tres veces con los medios de cultivo respectivos antes de la resuspensión final.

225717

Tiempo (d)	<i>S. kawagutii</i> μ M	<i>S. pilosum</i> μ M
4	34.25	136.75
8	84.25	114.00
12	97.00	70.00
15	197.33	nd
17	14.50	nd
19	0.78	nd
Promedio	103.21	125.37
<b>[NH4] exp</b>	<b>120</b>	<b>130</b>

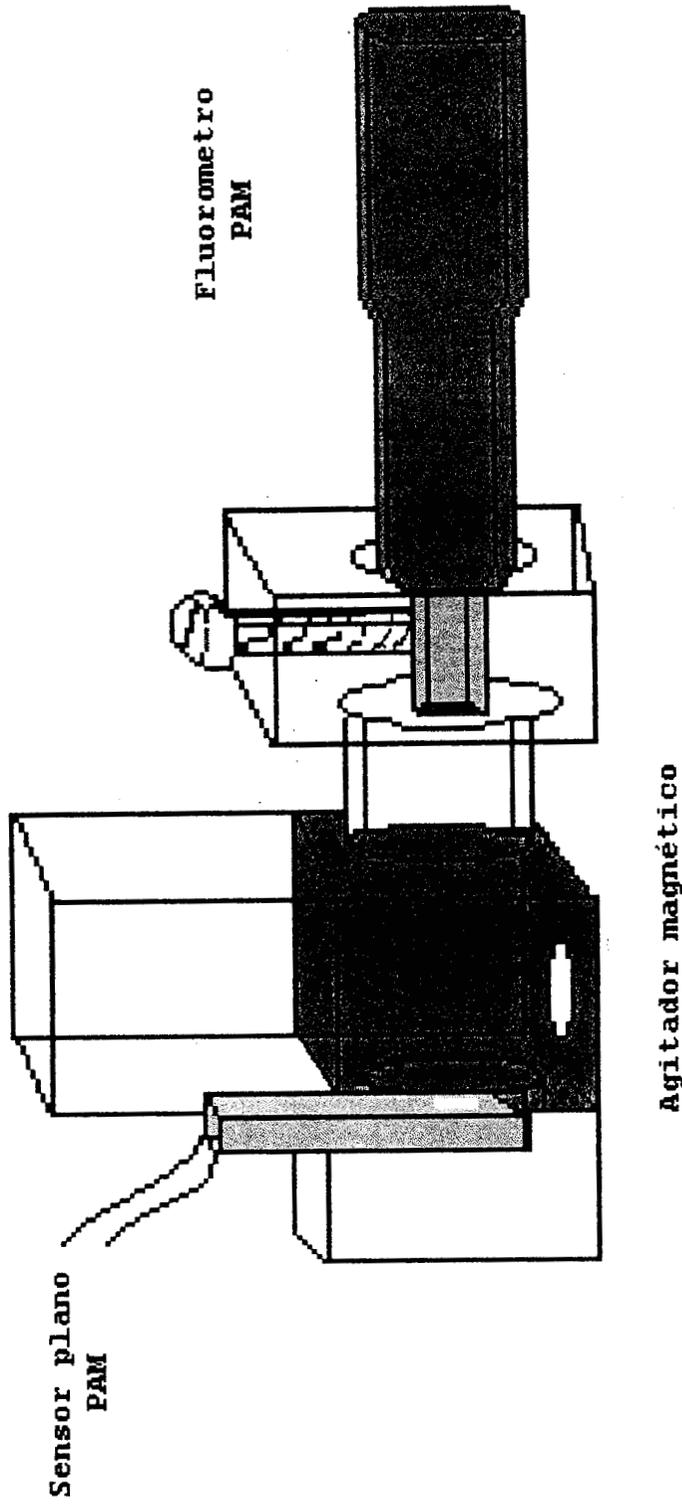
Tabla 2 Concentración promedio de nitrato consumido en cada intervalo de tiempo. Concentración por debajo del límite de detección (nd).

## **Medidas de Fluorescencia Modulada.**

Las medidas de fluorescencia se realizaron con un fluorómetro de amplitud modulada sumergible (PAM Walz). La fibra óptica conectada al detector de fluorescencia, las fuentes de luz modulada, actínica y saturante, y el sensor plano de luz del fluorómetro fueron adaptados a una celda de acrílico de 1 cm de paso óptico (fig. 4). Las células se concentraron en 1 ml de medio por centrifugación a 420 g en una centrífuga clínica durante 5 min, a una densidad de  $3.5 \times 10^6$  y  $3.0 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> para *S. kawagutii* y *S. pilosum* respectivamente.

Se determinó la cosecha cuántica absoluta de FSII dada por la proporción Fv/Fm en muestras adaptadas a la oscuridad por 5 min, mediante la iluminación con un flash saturante de intensidad  $>2000 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de 0.8 s de duración. Las medidas se realizaron por triplicado. Después de la medición de Fv/Fm, la muestra se mantuvo bajo condiciones de oscuridad durante 1 min, únicamente con el haz de medición encendido (luz modulada). Posteriormente, se inició la medición de la cosecha cuántica relativa del FSII ( $\Delta F/Fm'$ ) a través de una curva de luz con 8 irradiancias actínicas entre 0-1095  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , con un intervalo de tiempo de 30 s para cada una de las irradiancias, registrando la cosecha cuántica relativa al final de cada periodo después de un flash saturante. Los valores de la cosecha cuántica relativa ( $\Delta F/Fm'$ ), la desactivación fotoquímica (qP), y la desactivación no fotoquímica (qE y NPQ) fueron calculados a partir del modelo propuesto por Schreiber et al. (1986). Los valores de ETRmáx (flujo máximo de electrones), Fv/Fm, qP y NPQ, obtenidos a partir del cambio de medio a N- y N+ en distintas concentraciones de nitrógeno dadas por el consumo del cultivo fueron comparados con respecto al control considerándose valores relativos.

1 ml ( $3 \times 10^6$  cél./ml)



**Fig. 4.** Esquema de la cámara diseñada para las mediciones de fluorescencia y absorbancia, adaptada a una fibra óptica conectada al sensor de fluorescencia y a las fuentes de luz modulada, saturante y actínica del fluorómetro PAM y en el extremo opuesto al sensor plano de luz del mismo fluorómetro.

### **Tasa de transporte aparente de electrones.**

La tasa de transporte de electrones (ETR) se calculó a partir de la fórmula propuesta por Brodribb y Hill (1997):

$$\text{ETR} = \Phi_{\text{FSII}} \cdot I \cdot \alpha / 2$$

donde  $\alpha$  es la absorptancia, la cual representa la fracción de luz absorbida;  $\Phi_{\text{FSII}}$  es la cosecha cuántica efectiva del fotosistema II ( $\Delta F/F_m'$ );  $I$  es la irradiancia actínica, y la constante 2 implica un flujo lineal de electrones entre los dos fotosistemas.

La absorptancia de cada muestra fue calculada a partir de la relación lineal entre  $\alpha$  y  $x$  (fig. 5):

$$\alpha = 0.8124 x$$

donde la  $x$  es la cantidad bruta de luz absorbida. El análisis de regresión lineal se realizó entre la absorptancia obtenida a partir del promedio de absorción *in vivo* en la región visible del espectro:

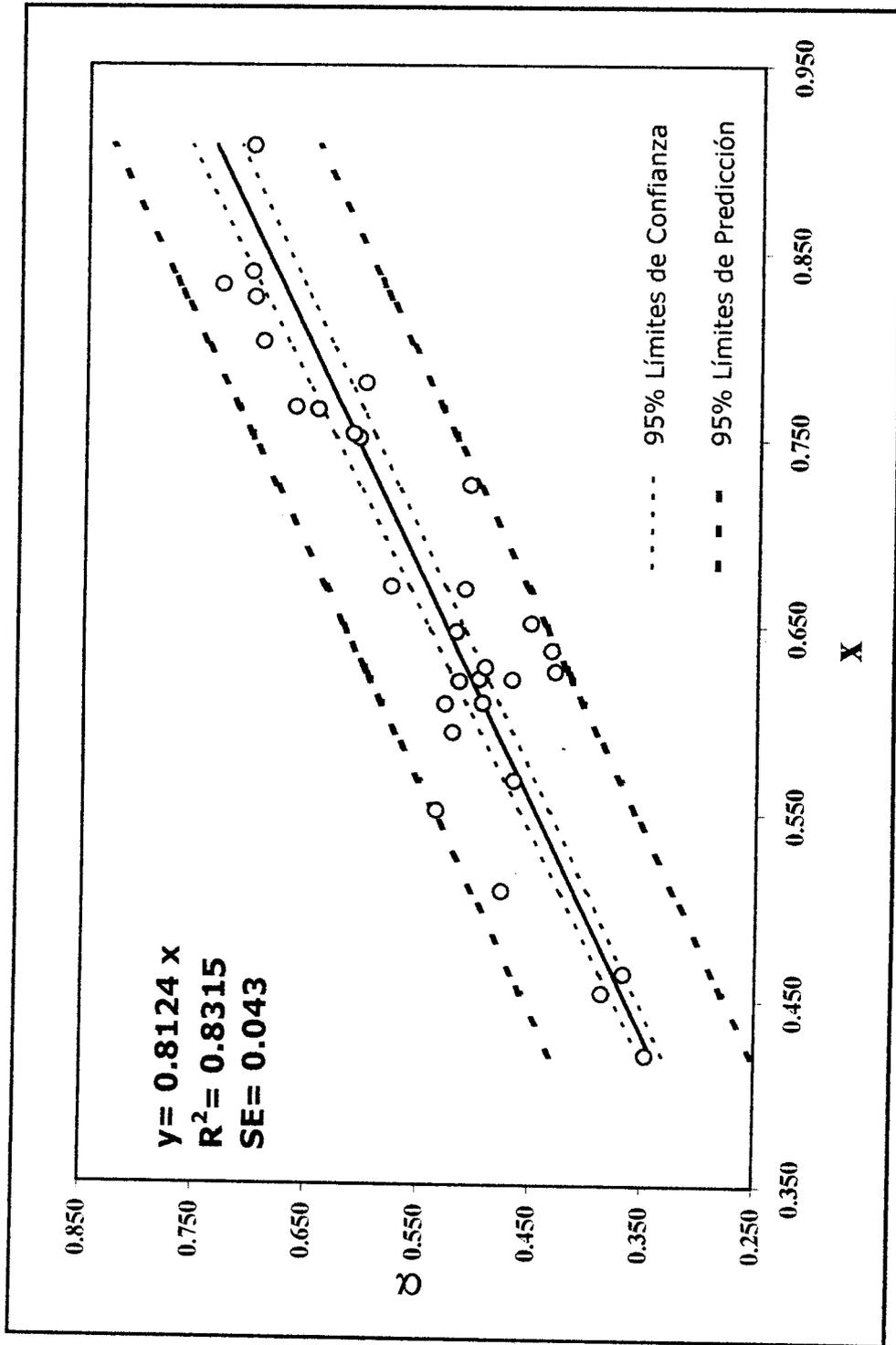
$$\alpha = (1 - 1 \times 10^{-\text{O.D.}})$$

donde O.D. es el promedio de absorción entre los 400-700 nm, y la cantidad bruta de luz absorbida medida con el sensor plano de luz del fluorómetro:

$$x = 1 - (L_1/L_2)$$

donde  $L_1$  es la cantidad de luz actínica medida por el sensor del fluorómetro, después del paso del haz de luz a través de la solución celular y  $L_2$  es la cantidad de luz actínica medida después del paso a través de medio de cultivo sin células.

La relación entre las medidas de absorptancia a partir de los espectros de absorción *in vivo* y las medidas de absorptancia de las curvas de luz, presentó un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.831 ( $p < 0.01$ ).



**Fig. 5.** Análisis de regresión lineal entre  $a$  (absorptancias obtenidas a partir de los espectros de absorción *in vivo* con la fórmula  $1-10^{-OD}$ ; donde OD es el promedio de absorción entre 400-700 nm) y  $x$  (absorptancia medidas desde el sensor plano de luz del fluorómetro PAM con la fórmula  $1-(L_1 L_2^{-1})$  .

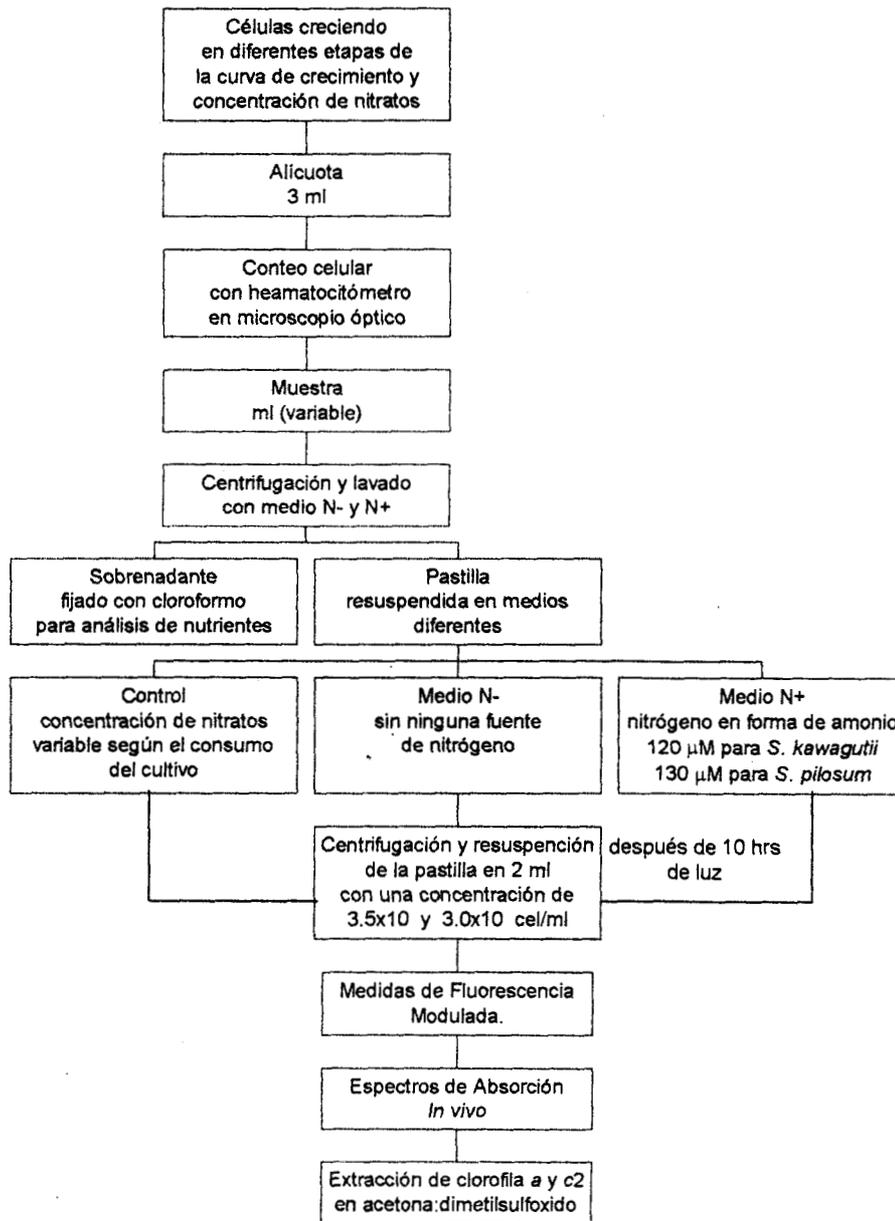
La significación fue obtenida mediante una Prueba de F en el paquete estadístico STATISTICAL (Microsoft).

### ***Análisis espectroscópicos y extracción de pigmentos.***

Los espectros de absorción *in vivo* fueron obtenidos de las mismas células una vez realizadas las medidas de fluorescencia, las tres réplicas de cada tratamiento se concentraron en una solución de 3 ml con una densidad de  $(3.5 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1})$  para *S. kawagutii* y  $(3.0 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1})$  para *S. pilosum*. En tres días de la curva de crecimiento de cada especie se obtuvo un espectro de absorción en un espectrofotómetro AMINCO DW2 (SLM instrument) de haz dual en cubetas con 1 cm de paso óptico, realizando un barrido entre 375 a 750 nm. La absorción en 725 nm fue restada de cada espectro, los espectros fueron normalizados al pico de absorción en el rojo de la Chl *a*, y sustraídos los espectros de absorción *in vivo* de N<sup>-</sup> y N<sup>+</sup> del control. La comparación a través del tiempo fue realizada exclusivamente en los espectros de absorción de controles del inicio de la curva de crecimiento con respecto a los del final.

La extracción de pigmentos se realizó posterior a las medidas de espectros de absorción en acetona:dimetilsulfóxido (DMSO), 90:10 (v:v) según lo propuesto por Iglesias-Prieto *et al.* (1992) y cuantificadas según las fórmulas de Jeffrey y Humphrey (1975). Las células se concentraron por centrifugación a 420 *g* por 5 min en centrifuga clínica en un ml de medio. El medio de cultivo se separó por centrifugación a 30, 000 *g* en una microcentrífuga Fisher. La pastilla fue resuspendida en 900  $\mu\text{l}$  de acetona y almacenada en oscuridad a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 hrs, posteriormente se centrifugó en la microcentrífuga a velocidad máxima por 10 s, el sobrenadante se separó y la pastilla fue resuspendida en 50  $\mu\text{l}$  de DMSO, el sobrenadante fue regresado a la pastilla y agitado durante 1 min en Vortex, repitiendo el paso anterior hasta que la pastilla estuviese completamente blanca.

Finalmente el sobrenadante se llevó a un volumen final de 3 ml con acetona, y se obtuvieron lecturas en un espectrofotómetro Beckman a 725, 663 y 630 nm para el cálculo de Chl *a* y Chl *c*<sub>2</sub> (Diagrama 2).



**Diagrama 2.** Segunda parte de experimentación. Estrés por disponibilidad de nitrógeno.

## **Análisis estadístico.**

Se calcularon los valores promedio y el error estándar de la media SEM por sus siglas en inglés ( $\sigma/(n-1) \pm 0.5$ ). De la concentración de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^-$ ,  $F_v/F_m$ , y de los parámetros  $q_P$ ,  $q_E$ , NPQ, ETR máx,  $I_k$  y  $\alpha$ .

Los valores de  $F_v/F_m$  obtenidos durante los dos experimentos fueron analizados mediante una ANOVA de una vía en el paquete estadístico STATISTICA de Microsoft.

Los resultados obtenidos de la segunda fase de experimentación fueron analizados mediante una ANOVA de una vía y Prueba de LSD por medio del paquete estadístico STATISTICA de Microsoft

El valor considerado para los análisis estadísticos de los parámetros  $q_E$ , NPQ y  $q_P$ , fue el dato final de la curva de luz (correspondiendo a la irradiancia de  $1095 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

El análisis estadístico de  $\alpha$ ,  $I_k$  y ETR máx, la curva de flujo de electrones se analizó como una curva típica fotosíntesis-irradiancia (P-I), de tal forma que los valores de  $\alpha$  fueron estimados mediante la pendiente de la regresión lineal aplicada a todas las réplicas de los primeros cuatro puntos de la curva de luz (entre 0 y  $196 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Los valores máximos de cada curva fueron considerados como ETRmáx. El cálculo de  $I_k$  fue obtenido por la fórmula:

$$I_k = \text{ETRmáx} / \alpha$$

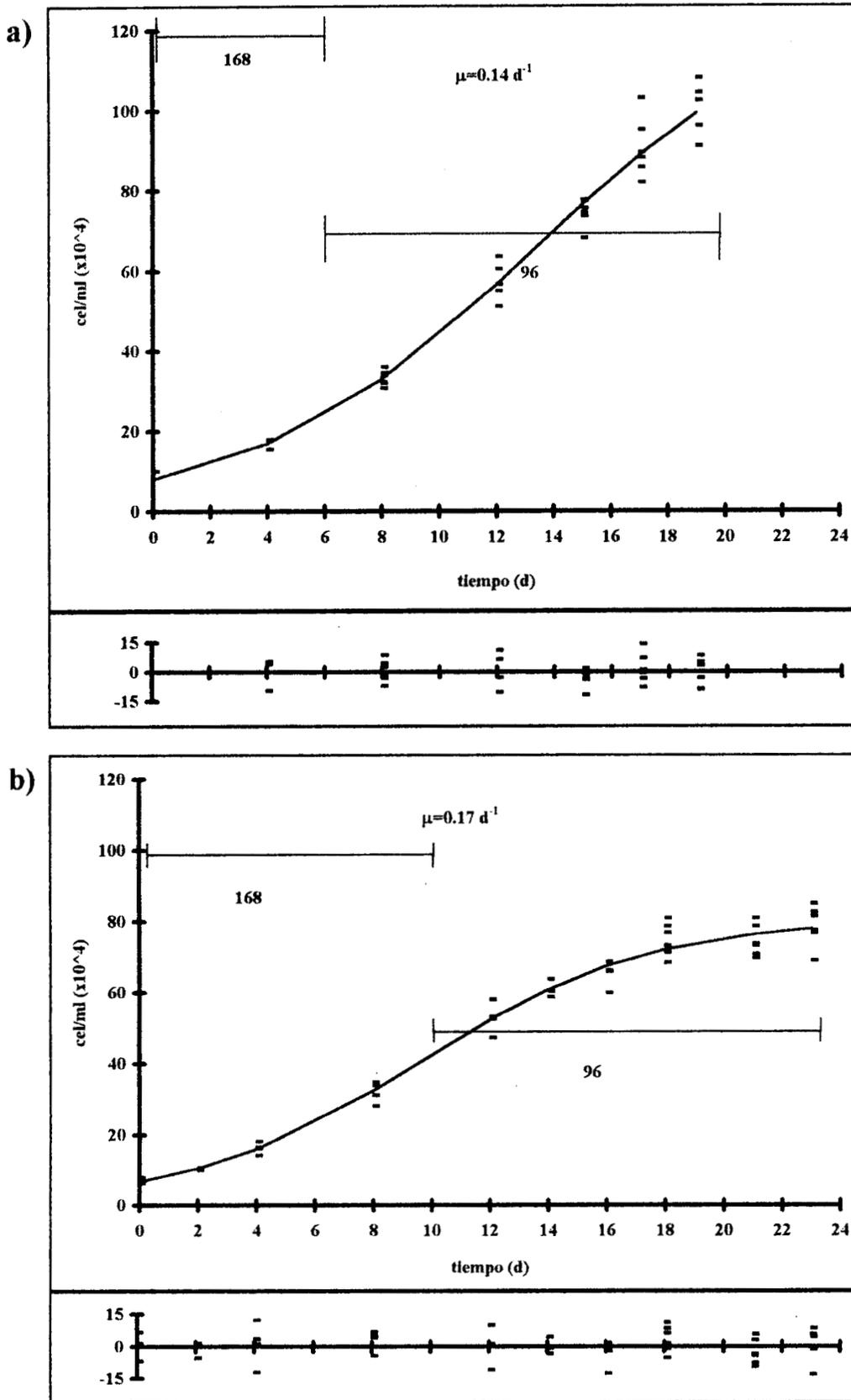
## **Resultados**

### **Curvas de Crecimiento**

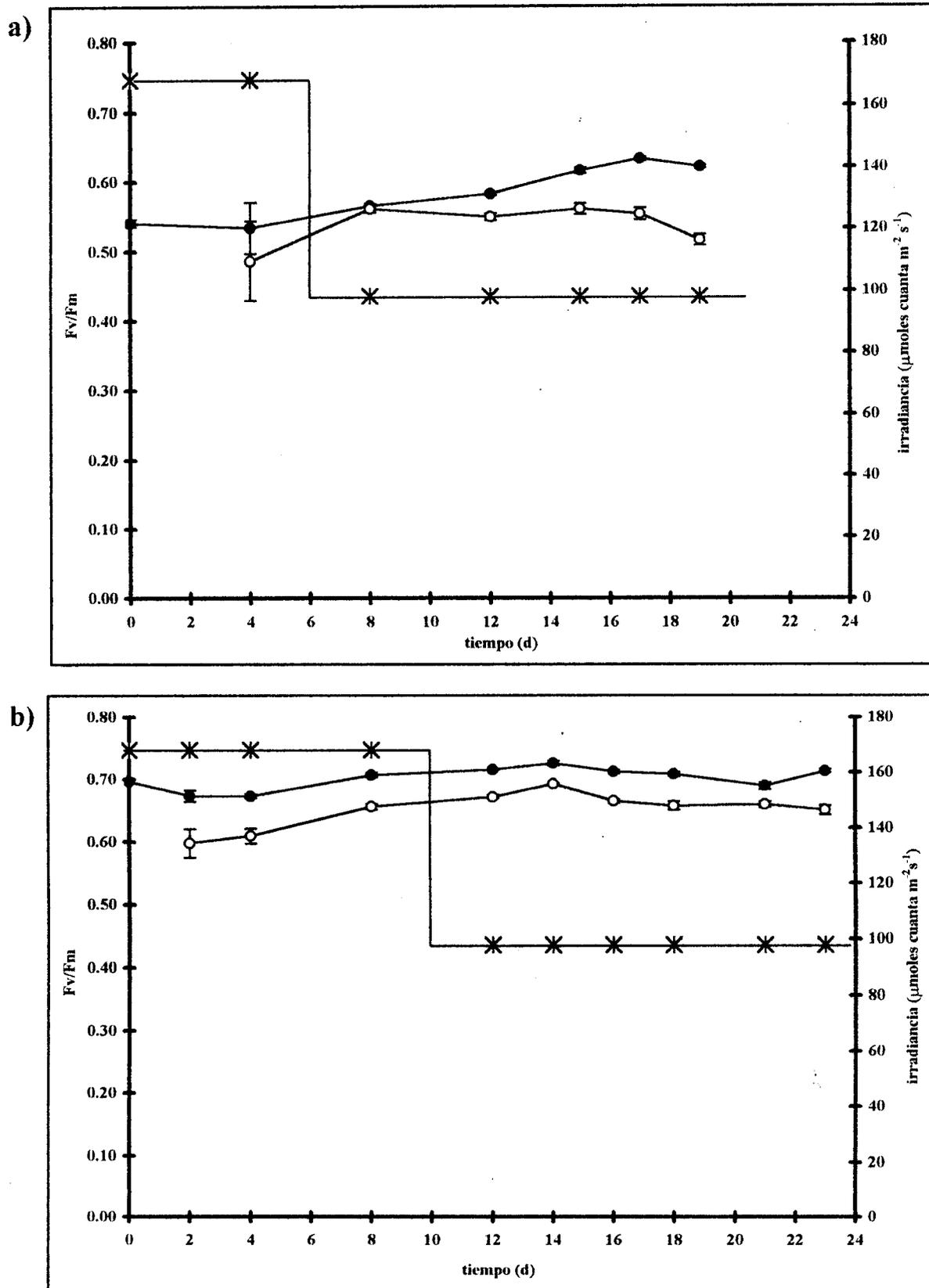
*S. kawagutii* presentó una fase de latencia de cinco días aproximadamente. Duplicándose posteriormente cada 4.87 días, con una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.14 \text{ d}^{-1}$  (fig. 6a). La curva de crecimiento se registró hasta el día 19 de cultivo en el cual no se alcanzó la fase de crecimiento estacionario, sin embargo la fase de crecimiento rápido ya había cesado, dado que entre los días 17 y 19 se presentó una disminución en la tasa de crecimiento relacionada con la denominada fase de retardo descrita por Monod (1949).

*S. pilosum* presentó una fase de latencia de cuatro días, la fase de crecimiento exponencial se presentó a partir del día 4 y hasta el día 14, duplicándose cada 3.91 días con una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.18 \text{ d}^{-1}$  (fig. 6b). La fase estacionaria se alcanzó a partir del día 23 de cultivo, con una densidad máxima de  $8 \times 10^5 \text{ cel ml}^{-1}$  aproximadamente. En la parte inferior de ambas curvas se muestran los valores residuales de la curva ajustada, los cuales se distribuyen en forma azarosa entre  $\pm 15 \%$ .

Los valores de la eficiencia en la separación de cargas del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) de muestras adaptadas a la oscuridad por cinco minutos, después de 2 y 10 hrs de tiempo de exposición a irradiancia, se presentan en la fig. 7. Al inicio del experimento, mientras la cantidad de luz fue mantenida en  $168 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , *S. kawagutii*, a diferencia de *S. pilosum* presentó valores por debajo del óptimo oscilando entre 0.534-0.540 para  $t=2$  y de 0.445 para  $t=12$  (fig. 7a). Debido a que los valores bajos de  $F_v/F_m$  podrían influir en una disminución en la tasa de crecimiento según los resultados de Chang *et al.* (1983), la cantidad de luz se disminuyó a  $96 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a partir del día 10 para *S. pilosum* y del día 6 para *S. kawagutii*, presentándose en esta última especie un ligero incremento. Los valores



**Fig. 6.** Curva de crecimiento. a) *S. kawagutii*, los puntos representan los valores promedio de densidad, la línea es la curva sigmoideal ajustada mediante el paquete Peakfit. En la parte inferior se muestra la distribución de residuales del ajuste. b) *S. pilosum*.



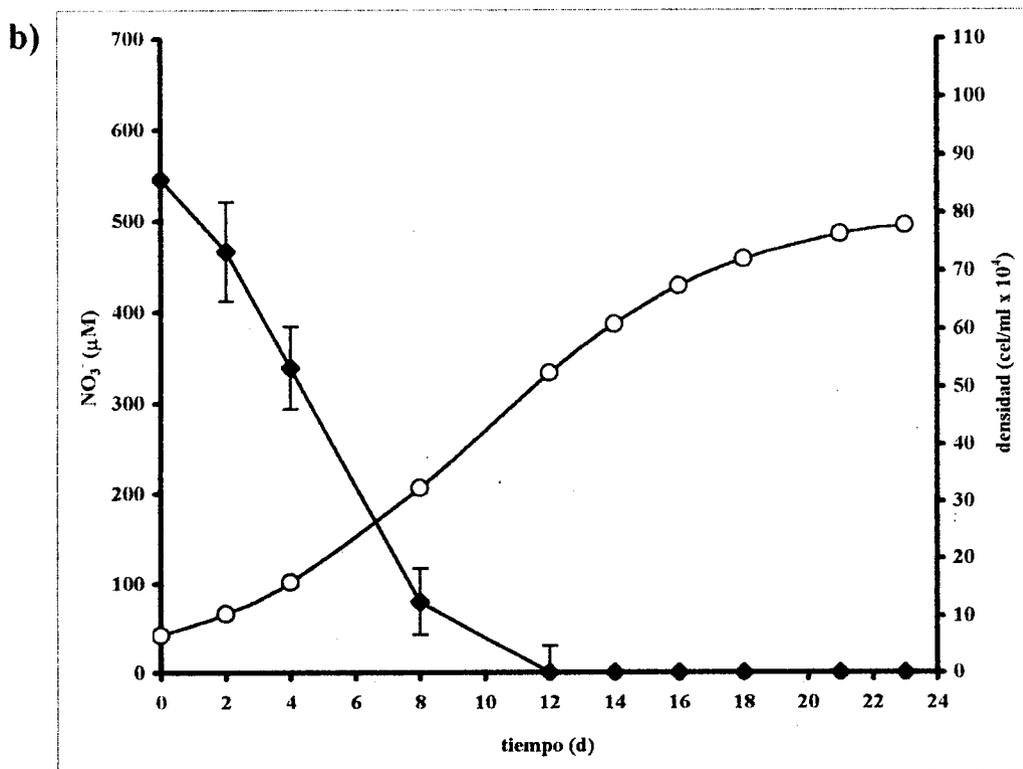
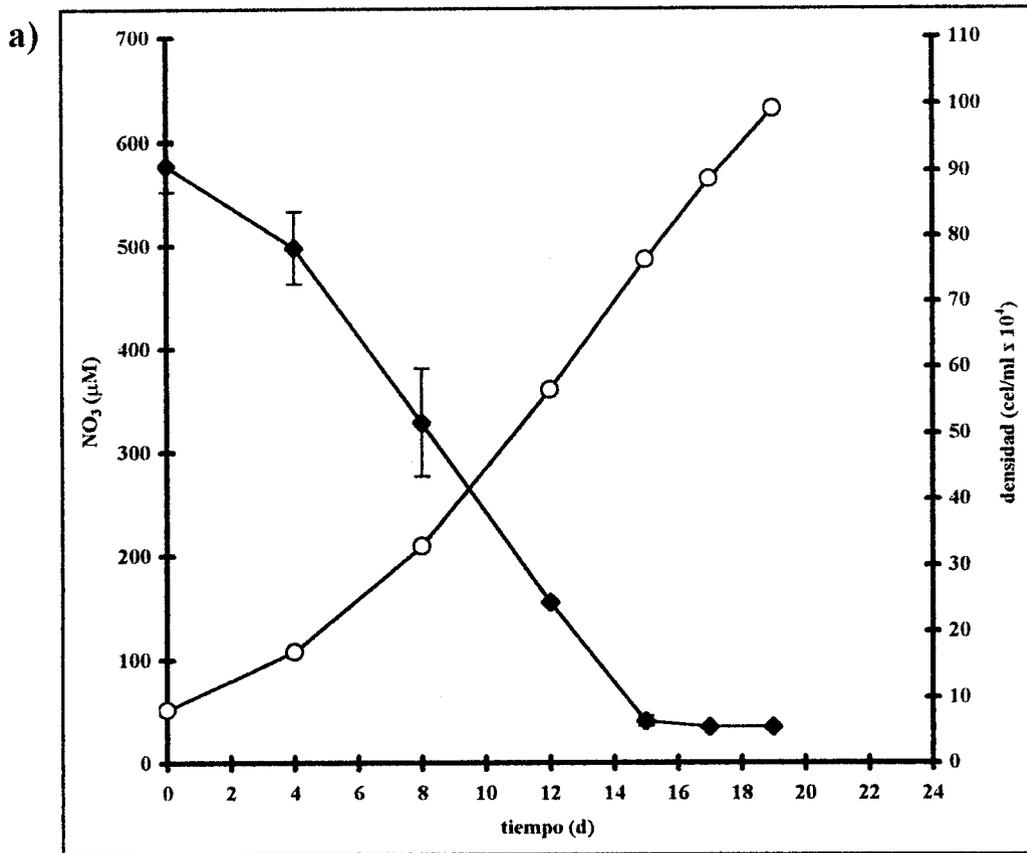
**Fig. 7.** Valores promedio de  $F_v/F_m \pm \text{SEM}$  (Error Estandar de la Media, por sus siglas en inglés) de muestras adaptadas a la oscuridad para a) *S. kawagutii* con  $t=2$  (—O—) y  $t=12$  hrs (—●—) de iluminación. Bajo dos regímenes de luz (—x—). b) *S. pilosum*.

promedio de  $t=2$  y  $t=12$  para *S. kawagutii* mostraron no ser estadísticamente diferentes el día 8 de cultivo, sin embargo presentaron diferencias significativas el día 4 y a partir del día 12 (ANOVA  $p < 0.001$ ), haciéndose más evidentes a través del tiempo (fig. 7a).

*S. pilosum*, presentó un ligero aumento en los valores de  $F_v/F_m$  entre las medidas realizadas en cultivos creciendo con 168 y 96  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (fig. 7b), los valores oscilaron entre 0.673 y 0.726 para  $t=2$ . Al igual que en *S. kawagutii*, la diferencia entre  $t=2$  y  $t=10$  fue estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$  (ANOVA)

## **Consumo y cuotas de Nitrógeno**

La concentración de nitrógeno fue cuantificada en el medio de cultivo a partir de muestras previamente filtradas. En el caso de *S. kawagutii* (fig. 8a), se observó que el nitrógeno durante la fase de latencia es consumido paulatinamente y a partir del día 4, donde se inicia la fase de crecimiento exponencial, el consumo aumenta, disminuyendo el nitrógeno del medio en forma inversa al crecimiento. Este comportamiento se mantuvo hasta el día 15, cuando se alcanzó una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de nitratos la cual se mantuvo sin cambios significativos para los días 17 y 19, presentándose una reducción en la incorporación de nitrógeno. Se observa además que a pesar de que el nitrógeno deja de incorporarse, el cultivo continúa creciendo, y aun el día 19 no se alcanza todavía la fase de crecimiento estacionario. En el caso de *S. pilosum*, la disminución de nitrógeno en el medio fue rápida, pasando de 550  $\mu\text{M}$  a niveles por debajo del límite de detección en tan solo 12 días, diez días antes de que el cultivo alcanzara su estado estacionario. Se observó que entre los días 2 y 8 el nitrógeno decrece del medio en forma rápida, comparado con lo ocurrido en los dos primeros días y entre los días 8 y 12 (fig. 8b).

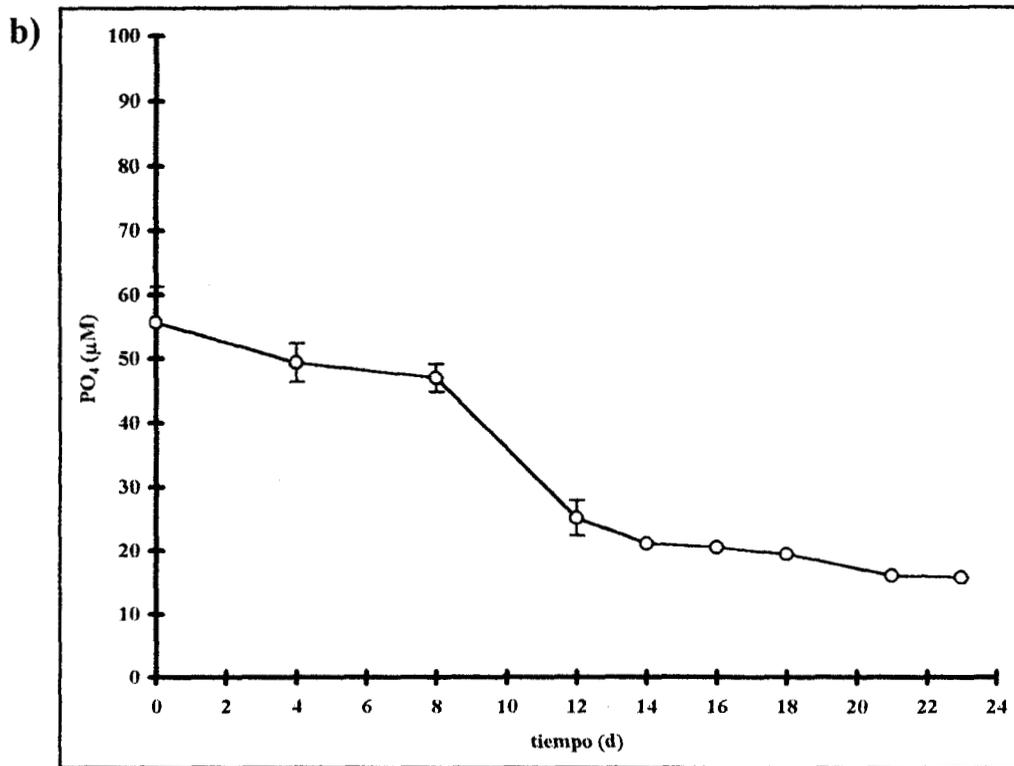
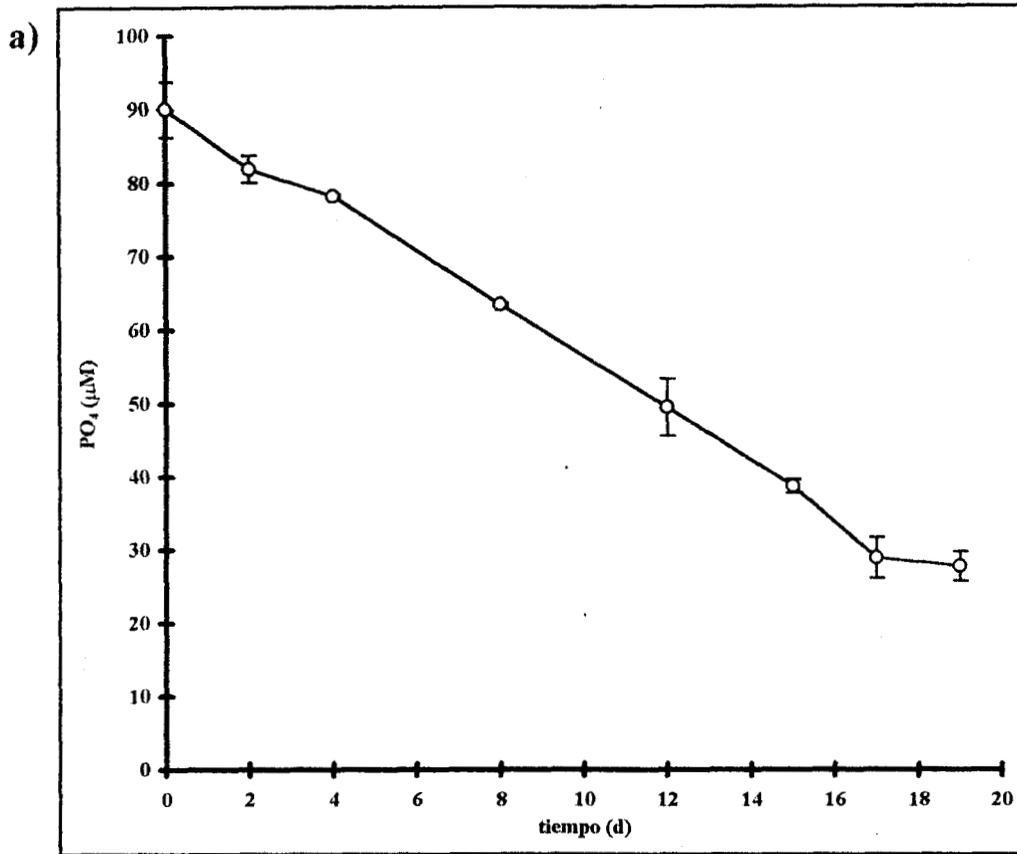


**Fig. 8.** Evolución temporal de la concentración promedio de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ± SEM en el medio, para tres réplicas de dos experimentos por separado (—♦—) y la curva de crecimiento ajustada (—○—) para a) *S. kawagutii* y b) *S. pilosum*.

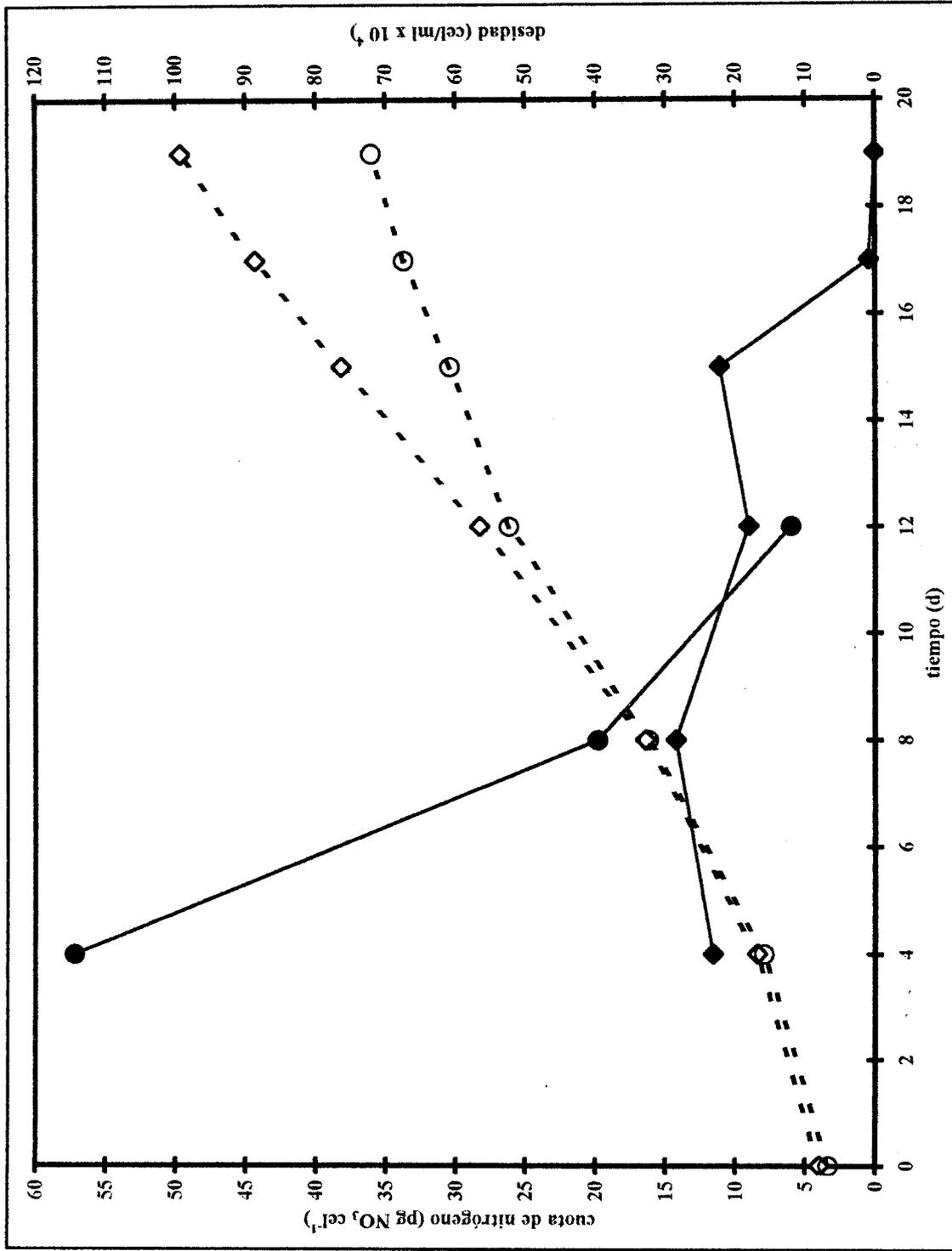
Se sabe que en organismos unicelulares la incorporación de un nutriente requerido para cubrir la cuota para una siguiente división celular puede verse influenciada por la presencia o ausencia de otro nutriente. En este caso, la reducción en la incorporación de nitrógeno al final de la curva de crecimiento de *S. kawagutii* no fue debida a la carencia de fósforo en el medio. Este disminuyó de forma constante y al igual que en caso de los nitratos también se presentó una disminución en la incorporación para los últimos dos días (día 17 y 19), conservándose en niveles de 25  $\mu\text{M}$  (fig. 9a). Mientras que para *S. pilosum* el fósforo disminuyó durante los primeros ocho días de forma lenta, y entre los días 8 y 12 los niveles cayeron de forma drástica, para finalmente caer lentamente como al inicio de la curva de crecimiento. El día 22 de cultivo, cuando se alcanzó el estado estacionario, la concentración de fósforo fue de 15  $\mu\text{M}$  (fig. 9b).

Debido a las diferencias en la incorporación de nitrógeno entre ambas especies, la cuota celular de éste fue diferente para cada especie, siendo menor y constante en *S. kawagutii* del orden de 10 pg de N por célula entre los días 4 y 15 de cultivo, mientras que para *S. pilosum* la cuota celular al inicio de la curva de crecimiento fue mayor, encontrándose en el orden de 57 pg de N por célula y cayendo al inicio de la fase de crecimiento exponencial a 18 pg N cel<sup>-1</sup>, una cuota similar a la de *S. kawagutii* (fig. 10).

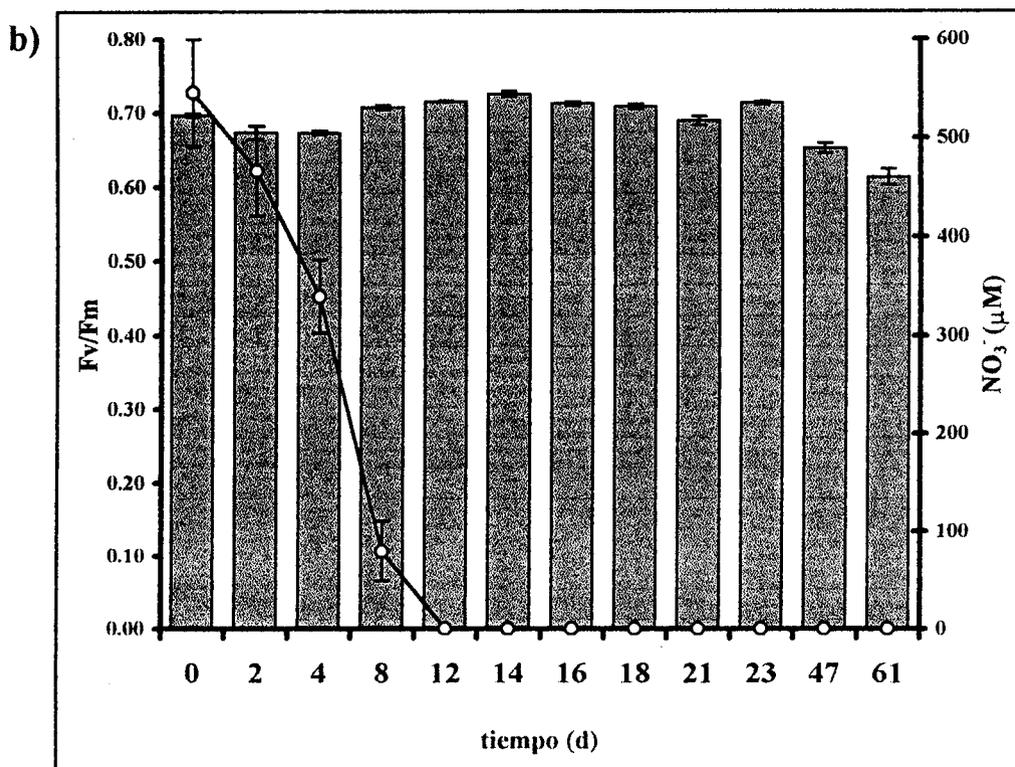
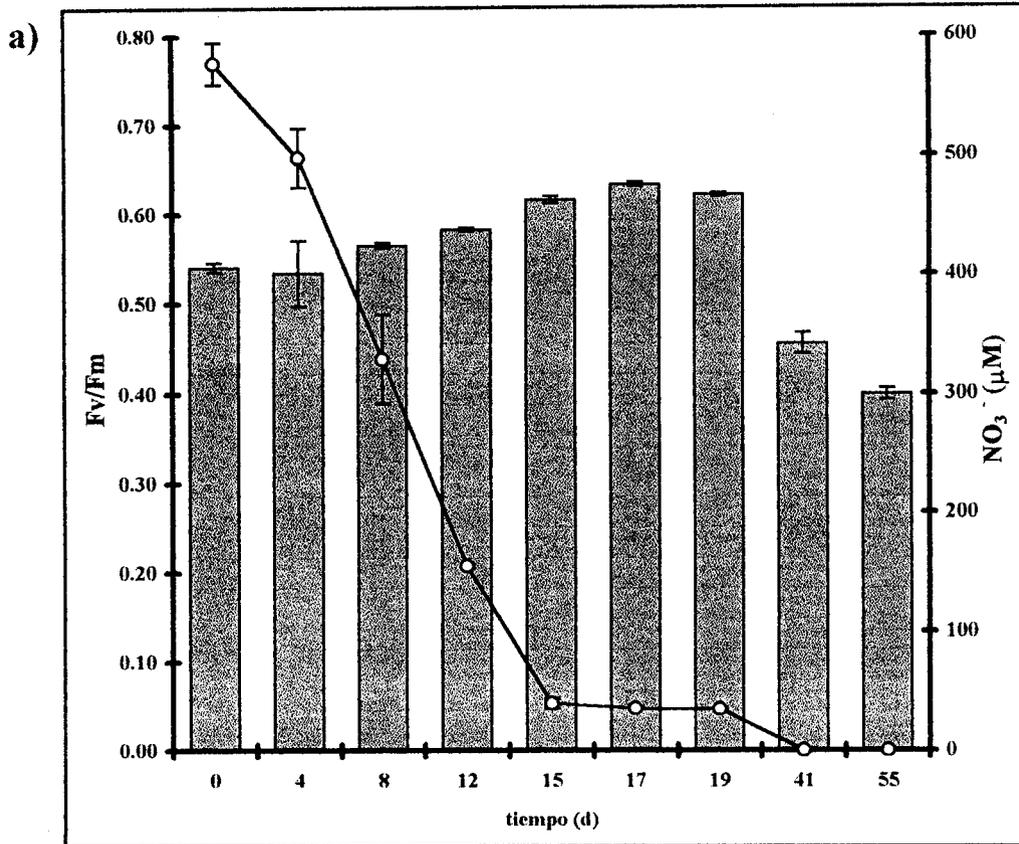
La proporción Fv/Fm se comparó con respecto a los niveles de nitrógeno en el medio de cultivo para cada especie. *S. kawagutii* alcanzó los valores mayores durante los días 15, 17 y 19, cuando los niveles de nitrógeno se encontraron en el orden de 30  $\mu\text{M}$  de NO<sub>3</sub> (fig. 11a), mientras que para *S. pilosum* se fueron incrementando a partir del día 8 y permanecieron con ligeras fluctuaciones hasta el día 23 de cultivo. A pesar de que a partir del día 12 el nitrógeno estuvo por debajo de los límites de detección, no se presentó ninguna caída en la proporción Fv/Fm durante los 11 días siguientes (fig. 11b). Los valores máximos en ambas especies podrían ser el resultado del



**Fig. 9.** Evolución temporal de la concentración promedio de  $PO_4^- \pm$  SEM en el medio para tres réplicas de dos experimentos por separado de: a) *S. kawagutii* y b) *S. pilosum*.



**Fig. 10.** La línea sólida corresponde a la cuota celular de nitrógeno de *S. kawagutii* (—●—) y *S. pilosum* (—◆—); la línea discontinua corresponde a la curva de crecimiento ajustada para *S. kawagutii* (---○---) y *S. pilosum* (---◇---).



**Fig. 11.** Evolución temporal de Fv/Fm y concentración de nitratos. Las barras representan los valores promedio de Fv/Fm ± SEM; la línea (—O—) es la concentración promedio de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ± SEM para: a) *S. kawagutii* y b) *S. pilosum*.

autoensobrecimiento causado por una mayor densidad en el cultivo, que el reflejo de los niveles de nitrógeno en el exterior. Posteriormente en el caso de *S. kawagutti* los días 41 y 55 de cultivo se presentó una caída del 25 y 35 % respectivamente con relación a los valores obtenidos el día 19 ( $p < 0.001$ , ANOVA). En cambio para *S. pilosum* los valores de Fv/Fm de los días 47 y 61 de cultivo, después de 35 y 49 días de la desaparición del nitrógeno en el medio, presentaron una caída de tan solo el 8 y 13% respectivamente ( $p < 0.001$ , ANOVA).

### ***Estrés por disponibilidad de nitrógeno***

El cambio de medio, para provocar diferencias en la disponibilidad de nitrógeno se realizó en cinco días de crecimiento del cultivo o para cinco diferentes concentraciones de nitrógeno las cuales fueron determinadas por el propio consumo de nitrógeno de cada especie.

Después del cambio de medio a los tratamientos N- y N+, se determinaron nuevamente valores de Fv/Fm en muestras adaptadas a oscuridad por 5 min, así como de los parámetros qE, NPQ, qP y ETR. Las medidas fueron realizadas después de 10 hrs del cambio de medio y bajo un régimen de luz de  $96 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Las muestras para determinar los espectros de absorción *in vivo* y la concentración de pigmentos (Chl *a* y Chl *c*<sub>2</sub>) por extracción en acetona se obtuvieron en solo tres experimentos de los cinco realizados para cada especie, al inicio, a la mitad y al final de la curva de crecimiento.

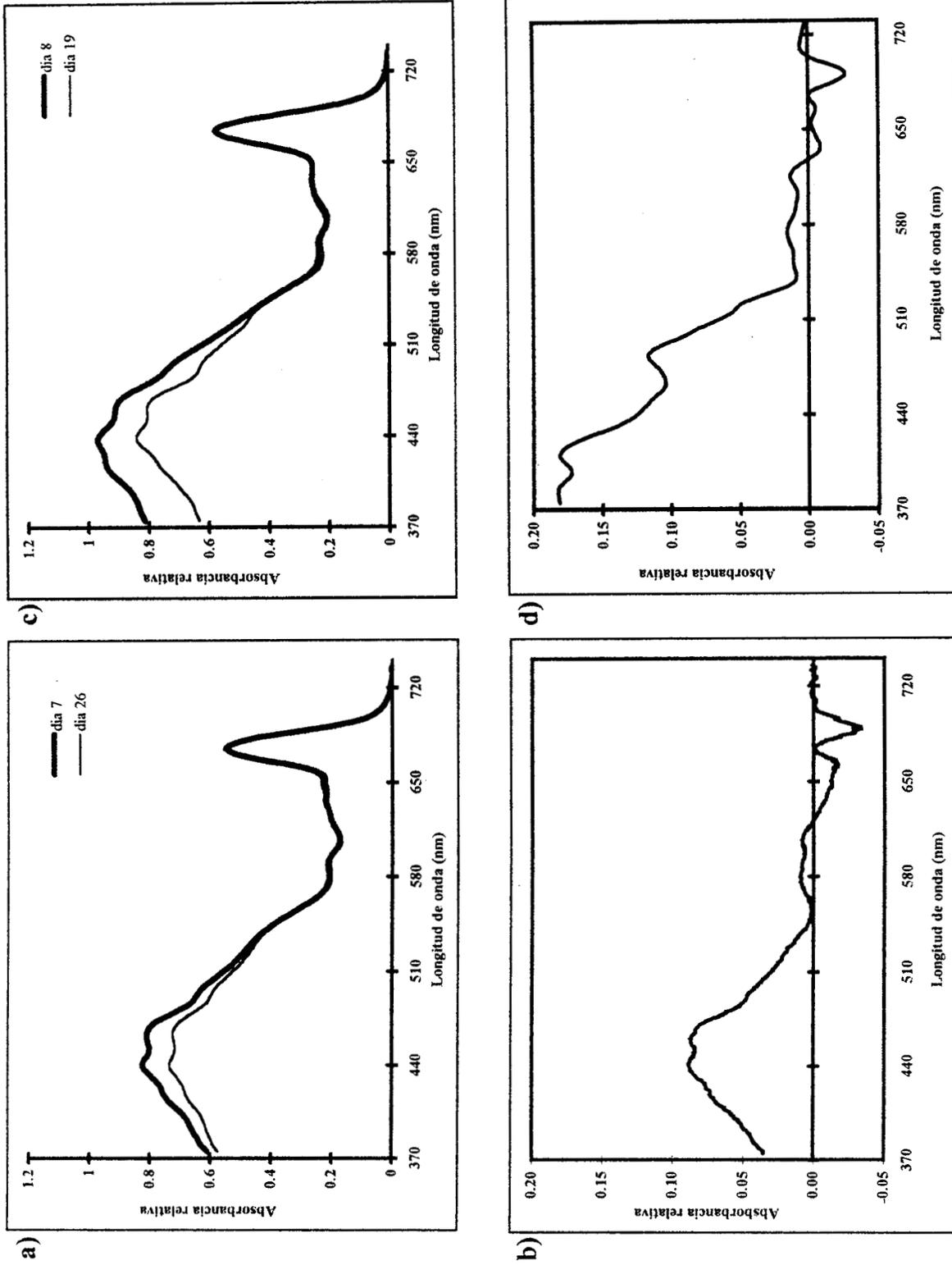
En los espectros de absorción *in vivo*, no se observaron diferencias entre el control y los tratamientos, lo que sugiere que las 10 hrs de experimento no fueron suficientes para observar modificaciones en la composición de pigmentos, para ningún día analizado (los datos no se presentan). Sin embargo, el cambio en la composición de pigmentos, observado a partir de los

espectros de diferencia, si fue evidente en el tiempo, es decir, a lo largo de la curva de crecimiento dicha composición si se vio modificada. Para *S. kawagutii* se compararon los días 7 y 26 de cultivo (fig. 12a) y para *S. pilosum* los días 8 y 19 de cultivo (fig. 12 c), los espectros fueron normalizados al pico de clorofila *a* en el rojo. En el caso de *S. kawagutii* el espectro de diferencia muestra dos picos bien definidos en 440 y 460.5 nm (fig. 12b) los cuales pueden ser el resultado de una mayor concentración de clorofila *c2* y peridina, componentes de la principal antena colectora de luz de los dinoflagelados simbiotes denominada acpPC (complejo proteína clorofila *a*-clorofila *c2*-peridina). En cambio para *S. pilosum* se muestra un pico entre 408-411 nm, y otro bien definido en 485 nm, el cual podría estar relacionado con algún pigmento fotoprotector (fig. 12d).

Como se muestra en la tabla 3, la concentración de clorofila *a* de *S. kawagutii* disminuye en el tratamiento N- con respecto al control en los tres días analizados, esta caída fue más acentuada en el día 22 con un 25 % menos de clorofila por célula con respecto al control, mientras que en el tratamiento N+ aumenta en los días 7 y 26, y disminuye únicamente en el día 22 de cultivo en el cual se presentó la mayor diferencia con una caída del 41 %.

Por otro lado se sabe que la proporción Chl *a*:Chl *c2*, se incrementa con la irradiancia, y era de esperarse que se presentara un incremento en los tratamientos N- y N+ con respecto al control al inicio de la curva de crecimiento (día 7) y una disminución a través del tiempo, lo cual no ocurrió presentándose al igual que para la concentración de clorofila *a* un comportamiento contrario a lo esperado.

El caso de *S. pilosum* fue distinto ya que la concentración de Chl *a* tanto en N- como en N+ cae con respecto al control durante el día 8, el día 12 cae N-, en cambio N+ se incrementa ligeramente, y finalmente durante el día 19, N- permanece igual al control mientras que N+ cae. La clorofila *c2* presenta el mismo comportamiento que la clorofila *a*.



**Fig. 12.** a) Espectros de absorción *in vivo* de *S. kawagutii* del día 7 (línea gruesa) y del día 26 de cultivo (línea delgada) normalizados al pico de absorción de la Chl a en el rojo. b) Espectro de diferencia de *S. kawagutii*. c) Espectro de absorción *in vivo* para *S. pilosum* del día 8 (línea negra) y día 19 (línea gris) de cultivo. d) Espectro de diferencia para *S. pilosum*.

<i>S. kawagutii</i>	Día 7			Día 22			Día 26		
	CTR	N-	N+	CTR	N-	N+	CTR	N-	N+
Chl a	1.110	1.026	1.160	0.795	0.592	0.469	1.037	0.849	1.117
Chl c2	0.360	0.336	0.387	0.244	0.250	0.182	0.331	0.318	0.344
a:c2	3.080	3.051	2.999	3.264	2.367	2.579	3.131	2.665	3.243
a*	0.594	0.710	0.853	0.726	0.901	0.388	0.744	0.613	0.875

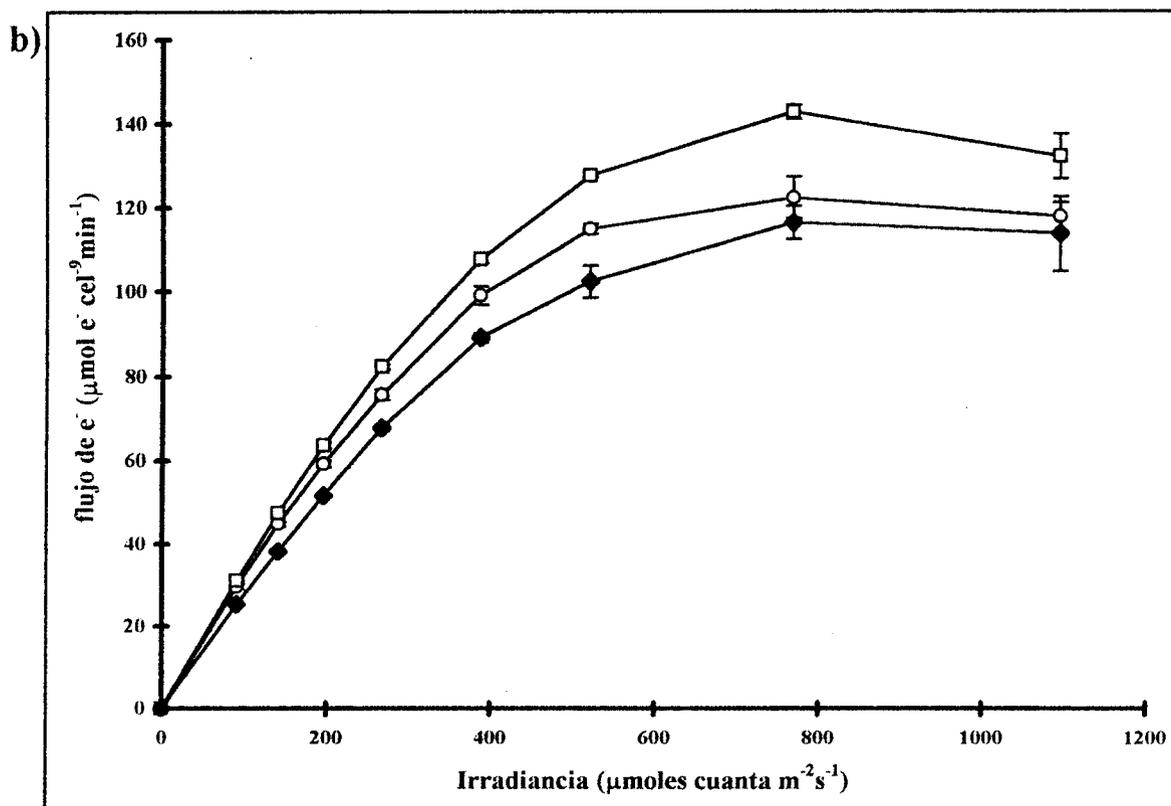
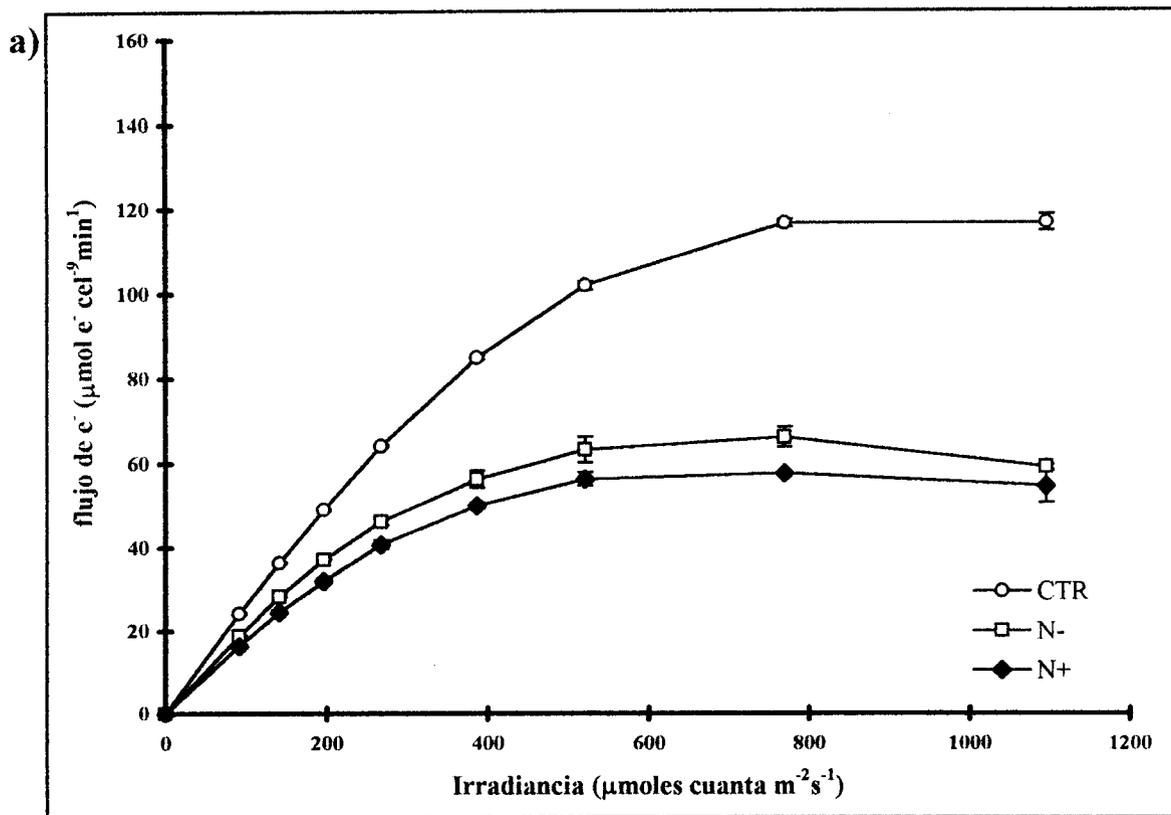
<i>S. pilosum</i>	Día 8			Día 12			Día 19		
	CTR	N-	N+	CTR	N-	N+	CTR	N-	N+
Chl a	2.562	2.009	2.364	1.428	1.417	1.500	2.034	2.031	1.403
Chl c2	0.709	0.557	0.582	0.533	0.466	0.572	0.805	0.734	0.501
a:c2	3.614	3.609	4.062	2.681	3.042	2.620	2.527	2.766	2.803
a*	1.001	0.941	1.044	1.022	0.989	0.931	1.081	1.113	0.796

**Tabla 3.** Concentración de clorofila a y clorofila c2 en extracto de acetona:DMSO (90:10; v:v) expresadas en mol cel-15, proporción clorofila a:c2 y coeficiente de absorción (a\*). De *S. kawagutii* y *S. pilosum* para control y tratamientos (N- y N+) en tres experimentos a lo largo de la curva de crecimiento y bajo diferentes concentraciones de nitratos.

A partir de los espectros de absorción *in vivo*, se realizó el cálculo de la absorptancia, que es el porcentaje de luz fotosintética activa (PAR 400-700 nm, por sus siglas en inglés) absorbida. Durante la realización de las curvas de luz se obtuvieron estimaciones brutas de la cantidad de luz absorbida por las células. La relación entre las medidas de absorptancia a partir de los espectros de absorción *in vivo* y las medidas de absorptancia de las curvas de luz presentó un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.831 (Prueba de F,  $p < 0.01$ ), por lo que se realizaron las estimaciones del resto de los días de muestreo, partir de la ecuación de regresión lineal para ambas especies (fig. 5).

La tasa de transporte de electrones o flujo de electrones fue medida en función de la irradiancia. En la figura 13 se presentan los resultados correspondientes a dos días en que el cultivo de *S. kawatutii* tenía concentración distintas de nitratos.

Las curvas de flujo de electrones de los tratamientos N- y N+ caen desde el inicio con respecto a la curva control, cuando las células provienen de una concentración de 313  $\mu\text{M}$  de nitratos (fig. 13a), en ambos casos se presentaron indicios de fotoinhibición más acentuada en el tratamiento N-, sin evidencia alguna de ésta en el control. Cabe destacar que en N- y N+ también se presentaron diferencias estadísticas entre los 200-769  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , no siendo significativamente diferentes en el último punto de la curva debido a la fotoinhibición presentada en el tratamiento N-. Contrario a lo esperado N+ presentó la caída más drástica en el flujo máximo de electrones. Dichas diferencias fueron reflejadas en diversos parámetros como  $\alpha$  y la cantidad de luz a la cual se satura el flujo de electrones ( $I_k$ ) los cuales se describen más adelante. Mientras que para las muestras provenientes de una concentración de nitratos de 100  $\mu\text{M}$ , se presentó el comportamiento inverso entre el tratamiento N- y control, sin embargo N+ al igual que en el caso de muestras provenientes de 313  $\mu\text{M}$  de nitratos presentó la curva con el menor flujo de electrones. Cabe destacar que en este último muestreo se presentaron



**Fig. 13.** Curvas promedio de tres réplicas de flujo de electrones (ETR) vs irradiancia  $\pm$  SEM de *S. kawagutii*. a) Cultivos donde la concentración inicial de nitratos fue de 313  $\mu\text{M}$ , del control (—○—), N- (—□—) y N+ (—◆—). b) Cultivos donde la concentración inicial de nitratos fue 100  $\mu\text{M}$ .

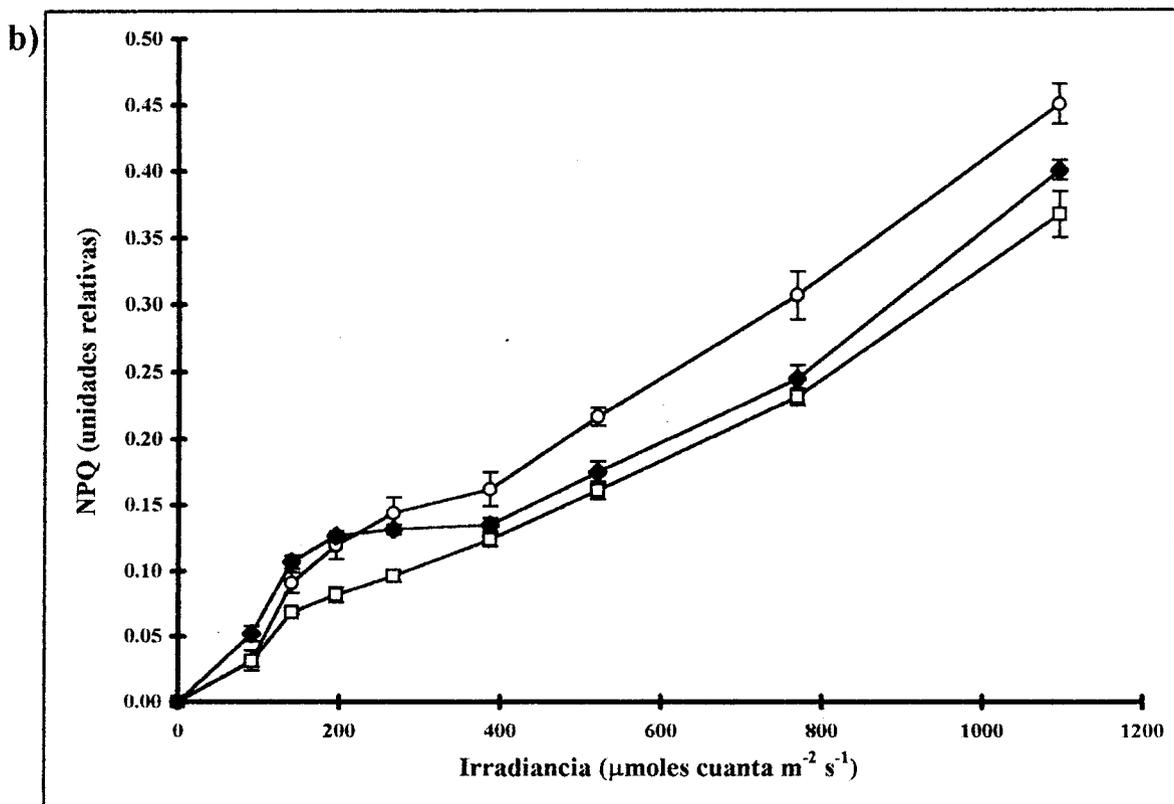
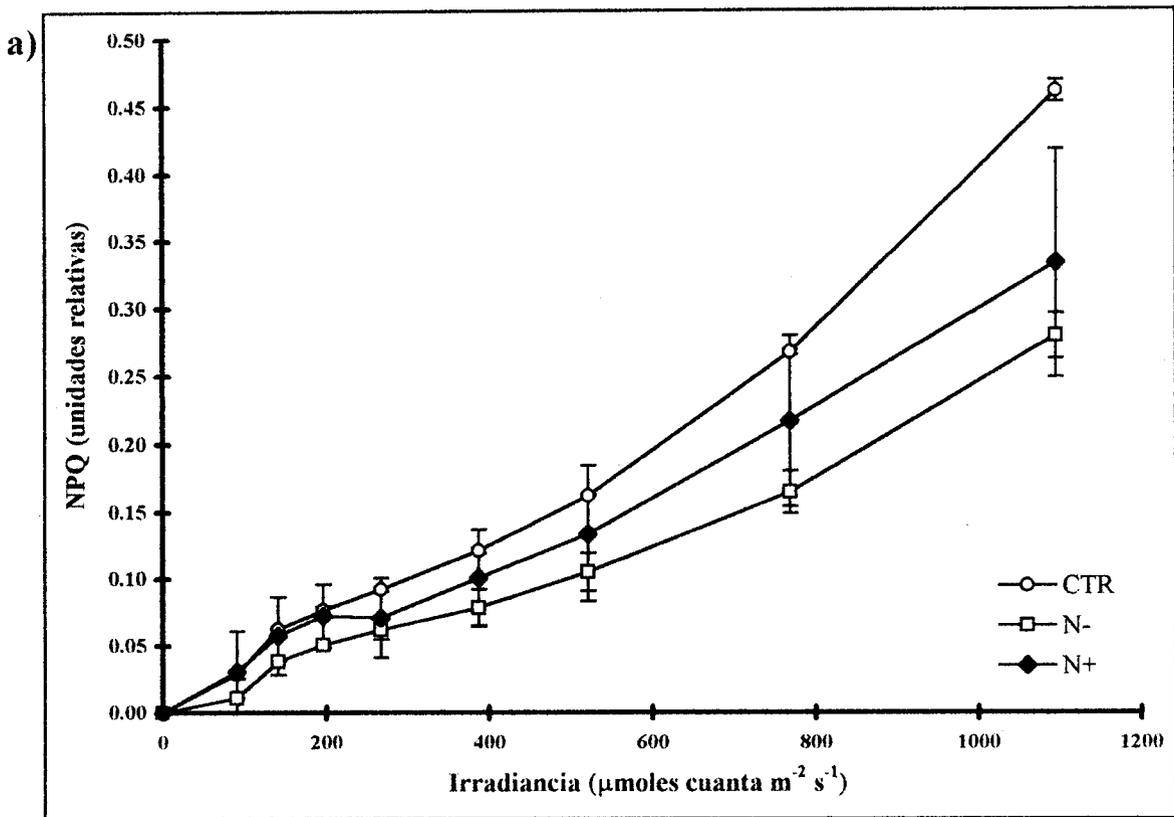
indicios de fotoinhibición en las tres curvas, siendo más evidente en N- a pesar de presentar la mayor tasa de transporte de electrones (fig. 13b).

La absorción de luz por los organismos fotosintéticos es una función lineal, una vez que se alcanza el nivel de saturación en la maquinaria fotosintética, el exceso de luz absorbido debe ser disipado por otras vías, las cuales reciben el nombre de vías no fotoquímicas.

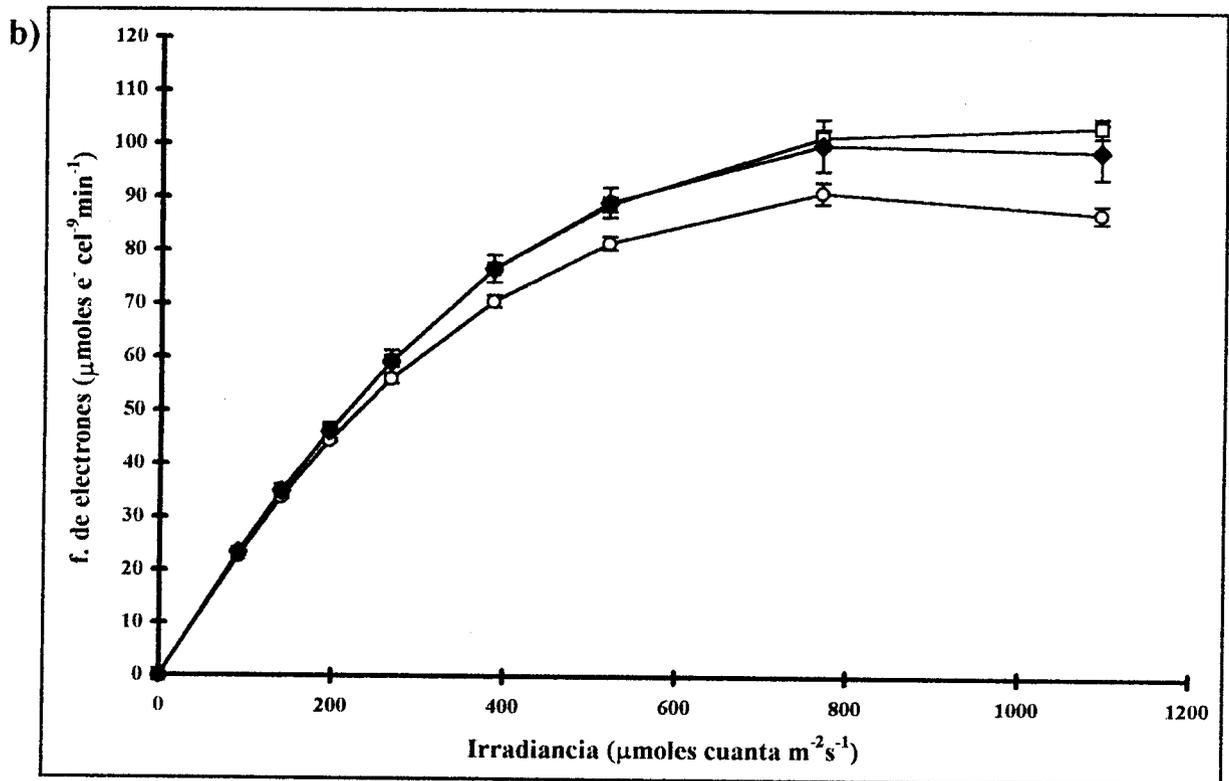
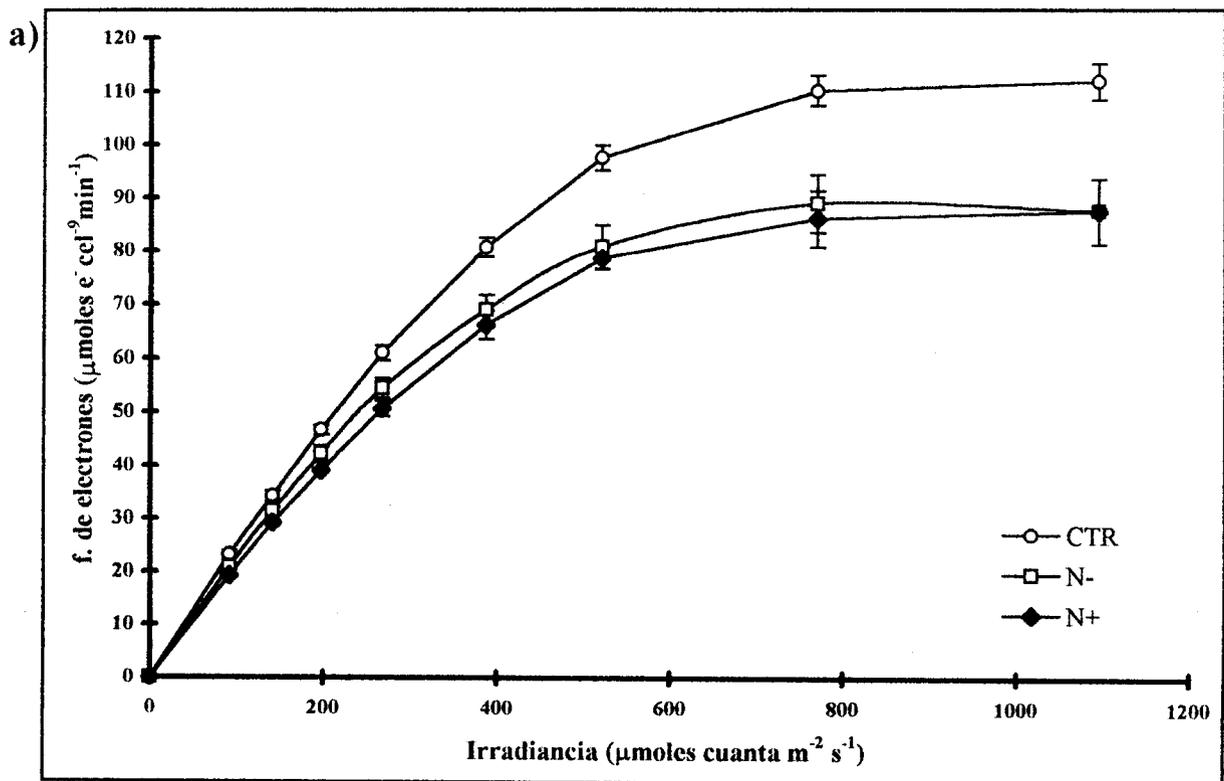
En la figura 14 se presenta la inducción de desactivación no-fotoquímica a través de la "curva de luz" de la especie *S. kawagutii*, donde se observa que en ningún momento se alcanza la saturación. En las células provenientes de un medio con una concentración de 313  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$ , los tratamientos N<sup>-</sup> y N<sup>+</sup> presentaron una inducción de desactivación no-fotoquímica menor, siendo del 40 y el 27.7 % de con respecto al control ( $p < 0.05$  ANOVA) en el último punto de la curva (fig. 14a). Al igual que en el caso anterior, en las muestras de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$  el control induce mayor desactivación no-fotoquímica que N<sup>-</sup> y N<sup>+</sup>; sin embargo, dicha diferencia es significativa solamente a partir de los 400  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (fig. 14b).

El flujo de electrones en *S. pilosum* exhibió el mismo comportamiento que *S. kawagutii*, donde los tratamientos N<sup>-</sup> y N<sup>+</sup> presentan un flujo de electrones menor con respecto al control proveniente de una concentración de 465  $\mu\text{M}$  de nitratos (fig. 15a), sin embargo las diferencias fueron menores. Cabe destacar que las curvas de ambos tratamientos N<sup>-</sup> y N<sup>+</sup> no fueron significativamente diferentes entre sí, y que en ninguna curva presentó indicios de fotoinhibición. Las diferencias en los parámetros que determinan la curva de flujo de electrones-irradiancia se describen más adelante.

Para las células provenientes de 5.4  $\mu\text{M}$  de nitratos el comportamiento del flujo de electrones fue inverso al observado en cultivos provenientes de 465  $\mu\text{M}$  de nitratos. No se observaron diferencias entre las curvas de los tratamientos N<sup>-</sup> y N<sup>+</sup> (Fig. 15b), pero presentaron un flujo de electrones



**Fig. 14.** Curvas de desactivación no- fotoquímica de tres réplicas  $\pm$  SEM con respecto a la irradiancia de *S. kawagutii*. a) Cultivos donde la concentración inicial de nitratos fue de 313  $\mu\text{M}$ , del control (—○—), N- (—□—) y N+ (—◆—). b) Cultivos donde la concentración inicial de nitratos fue 100  $\mu\text{M}$ .



**Fig. 15.** Curvas promedio de tres réplicas de flujo de electrones (ETR) vs irradiancia  $\pm$  SEM de *S. pilosum*. a) Cultivos donde la concentración inicial de nitratos fue de 465  $\mu\text{M}$ , del control (—○—), N- (—□—) y N+ (—◆—). b) Cultivos donde la concentración inicial de nitratos fue 5.4  $\mu\text{M}$ .

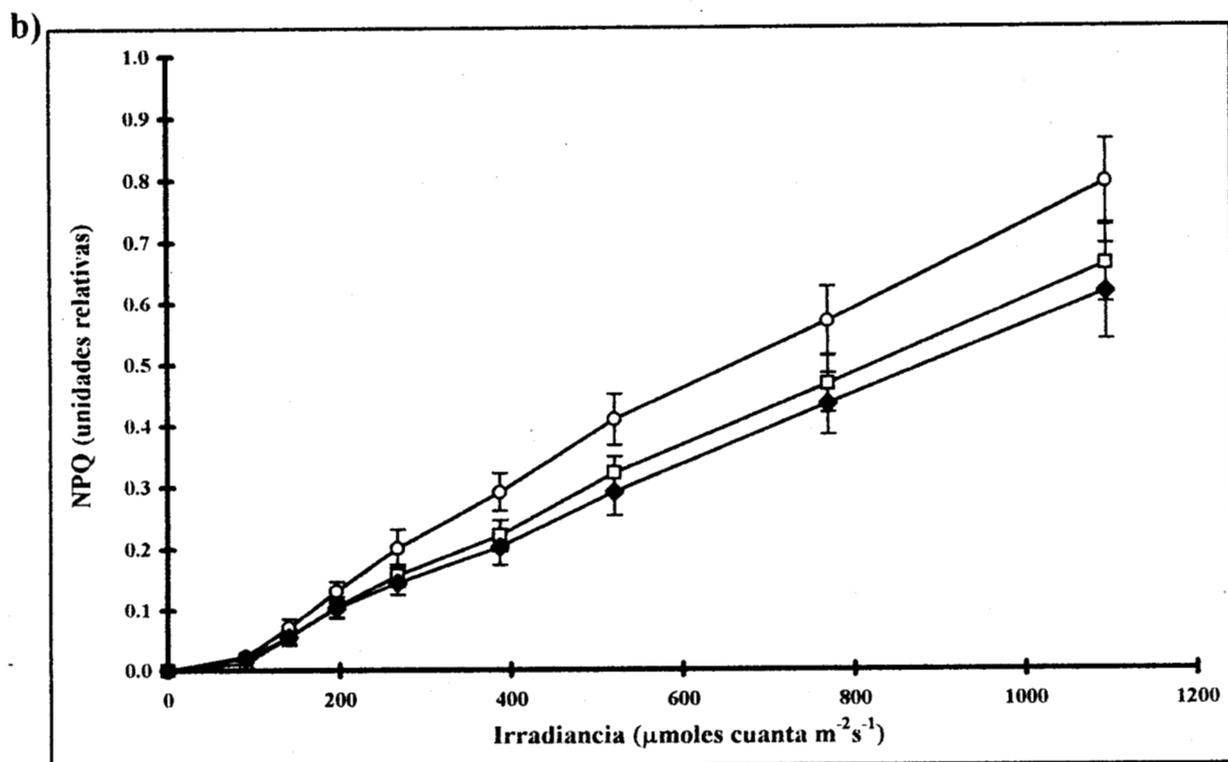
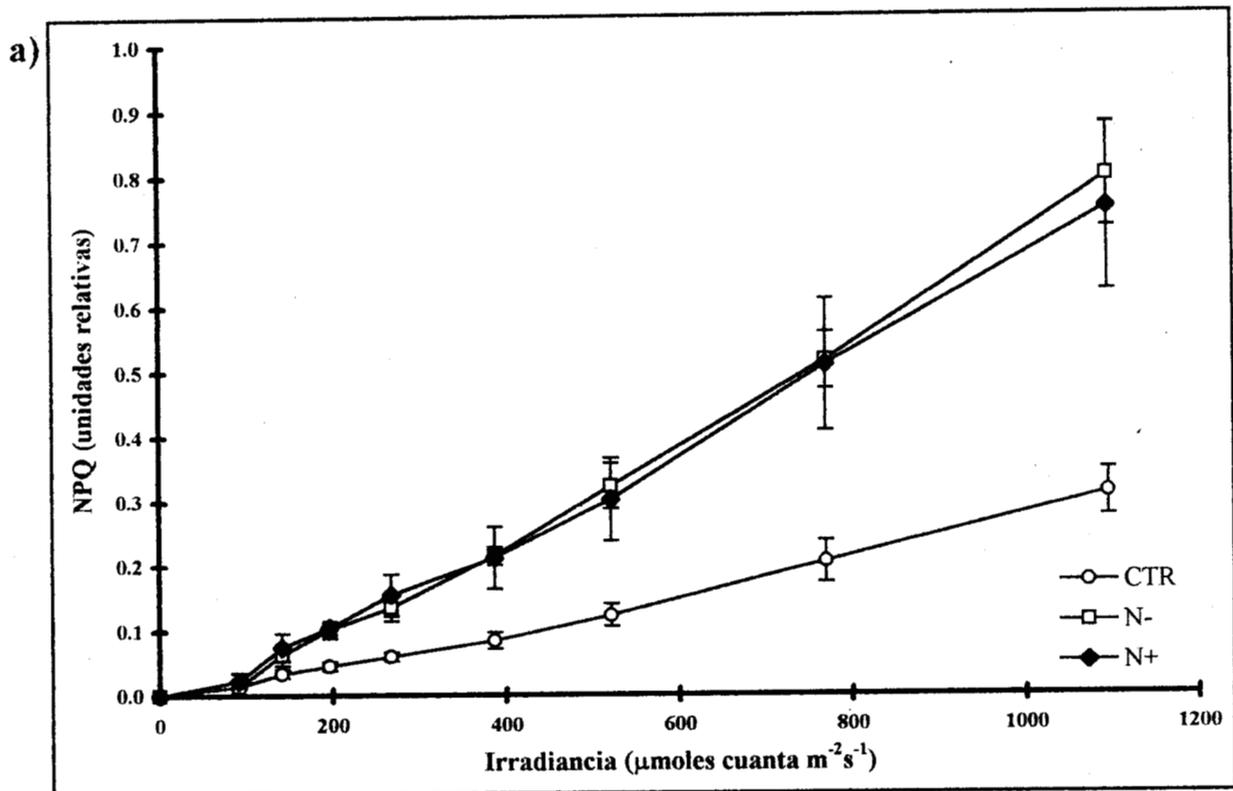
mayor que el del control. En el tratamiento N-, en donde se presenta la mayor tasa de transporte de electrones, no hay indicios de fotoinhibición; sin embargo, tanto en el control como en el tratamiento N+, se presenta fotoinhibición, siendo más acentuada en el control.

La inducción de desactivación no-fotoquímica en *S. pilosum* (fig. 16a) presentó un patrón bien definido. Al igual que para *S. kawagutii*, no se observó saturación tanto en las células provenientes de 465  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$ , como en las de 5.4  $\mu\text{M}$ . En el primer caso, el control presentó menor desactivación no-fotoquímica con respecto a los tratamientos, diferencia que fue evidente desde el inicio de la curva. En contraste, cuando el cultivo provino del medio con 5.4  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$  (fig. 16b), la diferencia entre la desactivación no-fotoquímica del control y los tratamientos no fue estadísticamente significativa.

### **Medidas de Fluorescencia Modulada después del cambio de medio a los tratamientos N- y N+.**

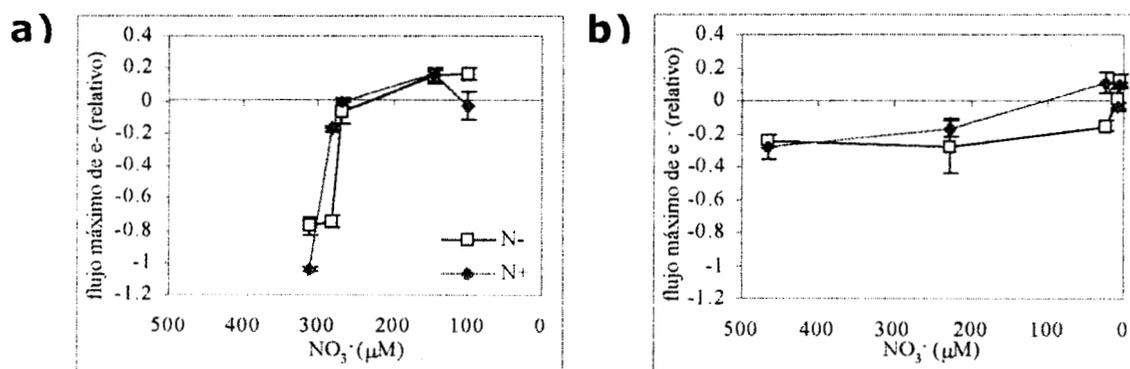
Los valores del flujo máximo de electrones de los tratamientos N- y N+ fueron comparados con respecto a los valores de los controles provenientes de distintas concentraciones de nitrógeno (fig.17). Se observa que el consumo de nitratos dado por la concentración en el medio de cultivo fue diferente entre las especies. El experimento final de *S. kawagutii* presentó una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (día 26 de cultivo), mientras que *S. pilosum* llegó a agotar el nivel de nitratos con una concentración de final de 5.4  $\mu\text{M}$  (el día 25).

El flujo de electrones máximo en el tratamiento N- fue estadísticamente menor con respecto al control en *S. kawagutii* en las dos concentraciones mayores de nitratos (313 y 283.1  $\mu\text{M}$ ) (fig. 17a). En *S. pilosum* esta disminución significativa ( $p < 0.05$ , ANOVA) se presenta bajo tres condiciones de nitratos (465.3, 226.6 y 23.26  $\mu\text{M}$ ) en los primeros experimentos (fig. 17b). Al final de la curva de crecimiento cuando se presentan las menores concentraciones de nitratos, ambas especies presentaron un aumento



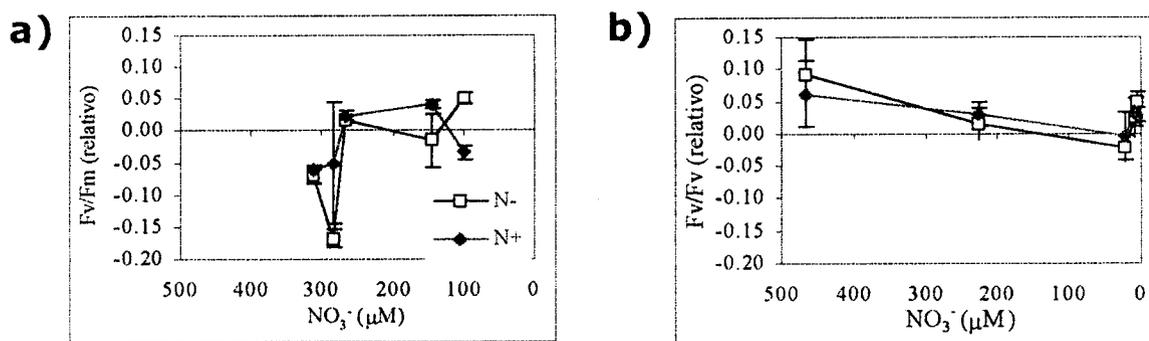
**Fig. 16.** Curvas de desactivación no-fotoquímica de tres réplicas  $\pm$  SEM con respecto a la irradiancia de *S. pilosum*. a) Cultivos donde la concentración inicial de nitratos fue de 465  $\mu\text{M}$ , del control (—○—), N- (—□—) y N+ (—◆—). b) Cultivos donde la concentración inicial de nitratos fue 5.4  $\mu\text{M}$ .

significativo ( $p < 0.05$ , ANOVA) del flujo máximo de electrones. El flujo de electrones en el tratamiento N+ para *S. kawagutii* fue estadísticamente menor con respecto al control únicamente en el primer experimento, en la mayor concentración de nitratos. Presentó un incremento significativo en  $145.7 \mu\text{M}$  de nitratos. Sin embargo, éste cayó al final de la curva de crecimiento, no presentando diferencias con respecto al control. En *S. pilosum* N+ fue estadísticamente menor que el control entre  $465.3$  y  $226.6 \mu\text{M}$  de nitrato y mayor que el control en  $23.26 \mu\text{M}$ . Al final de la curva de crecimiento en donde se registraron las menores concentraciones de nitratos, se presentó una caída al igual que en *S. kawagutii*, no siendo estadísticamente diferente del control.



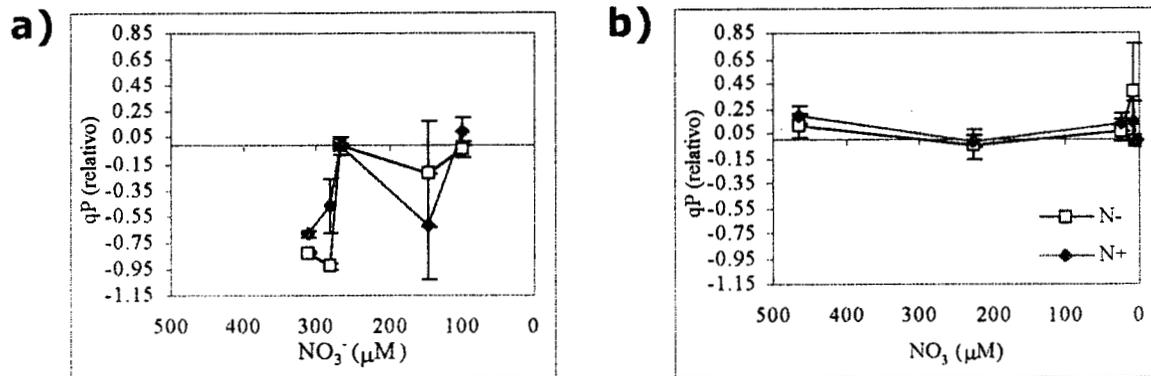
**Fig. 17.** Flujo máximo de electrones relativo (promedio  $\pm$  SEM) contra la concentración de nitratos en el medio. Los valores negativos indican una disminución con respecto al control. Los tratamientos están representados por ( $\square$ ) N- y ( $\blacklozenge$ ) para N+ de: a) *S. kawagutii* y b) *S. pilosum*.

Como se muestra en la figura 17, la caída en el flujo máximo de electrones en *S. kawagutii* fue más evidente que la presentada en *S. pilosum*. Cabe destacar que en las mayores concentraciones de nitratos los tratamientos N- y N+ tuvieron un efecto similar, a pesar de que el tratamiento N+ tiene nitrógeno.



**Fig. 18.** Eficiencia en la separación de cargas de FSII relativa (promedio  $\pm$  SEM) contra la concentración de nitratos en el medio. Mismos símbolos que en la figura 17. a) *S. kawagutii* y b) *S. pilosum*.

Los valores de Fv/Fm de *S. kawagutii* y *S. pilosum*, después del cambio de medio a los tratamientos N- y N+ con respecto al control y bajo distintas condiciones de nitratos se muestran en la figura 18. *S. kawagutii* presenta diferencias estadísticamente significativas, en la concentración mayor de nitratos, ambos tratamientos disminuyeron respecto al control (fig. 18a). En 283.1  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$  únicamente N- es estadísticamente menor que el control. A diferencia del flujo máximo de electrones al final de la curva de crecimiento, con 100  $\mu\text{M}$  de nitrato N- muestra un aumento significativo ( $p < 0.05$ , ANOVA) con respecto al control. Los valores de Fv/Fm de *S. pilosum* no muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en ninguno de los dos tratamientos, bajo diferentes concentraciones de nitrógeno (fig. 18b).

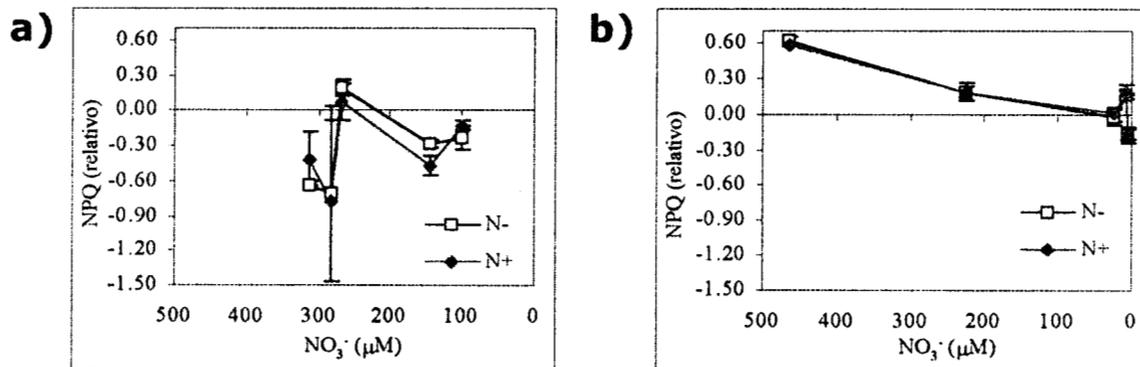


**Fig.19.** Desactivación fotoquímica relativa (promedio  $\pm$  SEM) con respecto a la concentración de nitratos en el medio. Mismos símbolos que en la figura 17. a) *S. kawagutii* y b) *S. pilosum*.

La desactivación fotoquímica en *S. kawagutii* (fig. 19a) presentó un patrón similar al de Fv/Fm (fig. 18a). Sin embargo, en el cuarto experimento se presentó una disminución con respecto al control en el tratamiento N+. En lo que se refiere a *S. pilosum* se observa en la figura 19b que únicamente en el tratamiento N+ se presenta un extraño aumento significativo en 465.3 μM de nitratos, posteriormente no se presentó variación significativa entre los tratamientos y el control, al igual que para Fv/Fm.

La desactivación no-fotoquímica relativa se presenta en la figura 20. En *S. kawagutii* a pesar de presentar una mayor disminución en el flujo máximo de electrones al inicio de la curva de crecimiento en 313 y 283.1 μM de nitratos, presenta una disminución en la inducción de desactivación no-fotoquímica (fig. 20a) de forma totalmente diferente a *S. pilosum*. Cabe resaltar que la mayor diferencia entre los tratamientos y el control en *S. kawagutii* fue hacia el decremento de la capacidad de inducción de desactivación no-fotoquímica, en cambio en *S. pilosum* fue hacia un incremento en dicha inducción. *S. pilosum* siguió un patrón bien definido. El cambio de medios a los tratamientos N- y N+ produjo un incremento en la inducción de la desactivación no-fotoquímica con respecto al control en 465.3 y 226.6 μM de nitratos (fig. 20b). En cambio en los tres experimentos restantes

no se presentó diferencia con respecto al control para ninguno de los dos tratamientos.



**Fig. 20.** Desactivación no-fotoquímica relativa (NPQ) (promedio  $\pm$  SEM) con respecto a la concentración de nitratos en el medio. Mismos símbolos que en la figura 17. a) *S. kawagutii* y b) *S. pilosum*.

## **Discusión.**

Durante la etapa inicial del presente trabajo se determinó la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) (fig.6) y la cuota celular de nitrógeno (fig. 10) de *Symbiodinium kawagutii* y *S. pilosum*. Aparentemente los valores de la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) obtenidos para ambas especies resultaron bajos con respecto a los de un estudio previo de Chang *et al.* (1983), en donde reportan valores en un intervalo de 0.22-0.43 d<sup>-1</sup> para tres especies de dinoflagelados simbiotes incluida *S. kawagutii*, bajo cuatro regímenes de luz (22, 57, 157 y 248  $\mu$ moles cuanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). En dicho trabajo, *S. kawagutii* presentó una tasa de crecimiento específico sensible a la cantidad de luz, disminuyendo su tasa de división con irradiancias por arriba de los 100  $\mu$ moles cuanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Sin embargo, el valor de 0.22 d<sup>-1</sup> bajo 250  $\mu$ moles cuanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiancia, contrasta con el valor obtenido en este estudio de 0.14 d<sup>-1</sup> bajo condiciones de irradiancia de 168-96  $\mu$ moles cuanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Si bien el caso de *S. pilosum* no ha sido muy documentado, la tasa de crecimiento de 0.18 d<sup>-1</sup> registrada también se encuentra muy por debajo de los valores obtenidos por Chang *et al.* (1983).

Los valores bajos de la tasa de crecimiento específico pudieron ser el resultado de un efecto combinado de variaciones en la temperatura y la irradiancia a las cuales se mantuvieron los cultivos. La temperatura osciló de 27  $\pm$  4.5 °C, lo que constituye una temperatura fluctuante comparada con la mantenida por Chang *et al.* (1983) de 27  $\pm$  1.5 °C. Como fue mencionado anteriormente (ver *Material y Método*) al inicio de la curva de crecimiento de ambas especies, la irradiancia promedio incidente fue de 168  $\mu$ moles cuanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> permaneciendo bajo estas condiciones 4 días *S. kawagutii* y 8 días *S. pilosum*. Posteriormente ésta fue disminuida a 96  $\mu$ moles cuanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> debido a que los valores de la eficiencia en la separación de cargas del fotosistema II dada por Fv/Fm de *S. kawagutii* fueron muy bajos (fig. 7). Es posible que para el caso de *S. kawagutii* estos 4d mantenidos por arriba de los 100  $\mu$ moles

cuanta  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  influyeran en el valor bajo de  $\mu$ , y que en *S. pilosum* el cambio de irradiancia también influyera pero de forma inversa debido a las características fotobiológicas de esta especie ya que se ha documentado que esta especie presenta una baja capacidad fotoaclimatatoria a bajas irradiancias (Iglesias-Prieto y Trench 1994;1997), es decir, que la disminución de la irradiancia a  $96 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  haya afectado negativamente la tasa de crecimiento.

Por otro lado, estas tasas de crecimiento pueden ser el resultado de modificaciones en el clon ya que tanto *S. kawagutii* como *S. pilosum* fueron aisladas hace más de 15 años.

En lo que respecta a la tasa de consumo y la cuota celular de nitrógeno, las diferencias entre ambas especies resultaron muy claras. El comportamiento de *S. pilosum* en el que a los 12 días de crecimiento los niveles de nitrógeno ya no son detectables (fig. 8b y 10) podría sugerir que las células se encontraban limitadas por nitrógeno desde el cultivo del cual fueron inoculados los experimentos, y una vez que se encontraron en condiciones ricas en nitrógeno lo incorporaron todo antes de iniciar la división, o bien que dicha especie presentó un consumo extra o de lujo. Este consumo extra de nitrógeno puede ser el resultado del llenado de una poza interna de nitratos. Se sabe que la concentración interna de nitratos varía entre especies de algas y ha sido documentada como una estrategia de crecimiento (Levasseur *et al.*, 1993).

Según los experimentos de Droop (1974), el consumo de lujo de un nutriente se presenta cuando el crecimiento es limitado por otro nutriente. En la figura 9b se observa que el fósforo no resultó limitante. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el cultivo estuviese limitado por algún micronutriente. Otra evidencia de que el fosfato no fue limitante en la fase inicial es el hecho de que la tasa de consumo de  $\text{PO}_4^-$  no se incrementó de manera significativa hasta que la concentración de nitrógeno llegó a los límites de detección entre los días 8 y 12 de cultivo (fig. 8b y 9b).

Por otro lado, la tasa de consumo de nitrógeno de *S. kawagutii* (fig. 8a y 10) se mantuvo relativamente constante a lo largo de la curva de crecimiento, hasta que en los últimos días registrados, se observó que el nitrógeno se dejó de incorporar totalmente, lo que podría sugerir que sus requerimientos de nitrógeno son menores.

La concentración de nitratos fue determinada de igual manera en el experimento final, encontrándose concentraciones de nitratos de 5.4  $\mu\text{M}$  el día 25 de cultivo para *S. pilosum*, y de 100  $\mu\text{M}$  para *S. kawagutii* el día 26 (fig. 17-20).

A partir del comportamiento del consumo de nitrógeno en ambos experimentos, es evidente que *S. pilosum* consume más rápido este nutriente que *S. kawagutii*, lo cual puede deberse al tamaño celular (que es mayor en *S. pilosum*), o bien al material exudado, ya que *S. pilosum*, a diferencia de *S. kawagutii*, promueve la agregación celular. Las diferentes especies del género *Symbiodinium* han sido caracterizadas desde el punto de vista bioquímico, fisiológico y molecular en diversos estudios (Trench y Blank, 1976; Chang et al 1983; Iglesias-Prieto y Trench, 1994; Iglesias-Prieto y Trench, 1997). Los resultados obtenidos aquí indican que sería interesante profundizar en el estudio de la incorporación y utilización de nitrógeno de las diversas especies de dinoflagelados simbiotes.

Como ya se mencionó, durante la curva de crecimiento de los cultivos se midió paralelamente la fluorescencia de la Chl *a*, obteniéndose entre otros parámetros la proporción Fv/Fm. Conviene destacar algunos puntos importantes de estos resultados. Según Iglesias-Prieto y Trench (1994, 1997), los simbiotes de invertebrados están sometidos a un régimen predecible de luz, y por tanto se puede hablar de adaptación (sensu Björkman 1981) a la luz en estos organismos, de tal forma que ellos caracterizan a *S. kawagutii* como una especie adaptada a baja luz y *S. pilosum* como adaptada a alta luz, lo cual corresponde con la distribución natural de sus hospederos.

El cambio de régimen de luz de 168 a 96  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fue determinado por los valores de Fv/Fm de *S. kawagutii*, los cuales mostraban claros indicios de estrés por exceso de luz independientemente de sus condiciones nutricionales, ya que las medidas fueron realizadas en diversos frascos de cultivo con medio fresco. Según Kolber *et al.* (1988), en microalgas de vida libre (*Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana* y *T. weissfogli*) no existen cambios significativos en los valores de Fv/Fm con respecto a la irradiancia (en un intervalo de 12-1040  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) bajo condiciones suficientes de nitrógeno. Sin embargo, cuando las células se encuentran limitadas por este nutriente, estos autores proponen que existe una relación entre la concentración de nitrógeno y los valores de Fv/Fm.

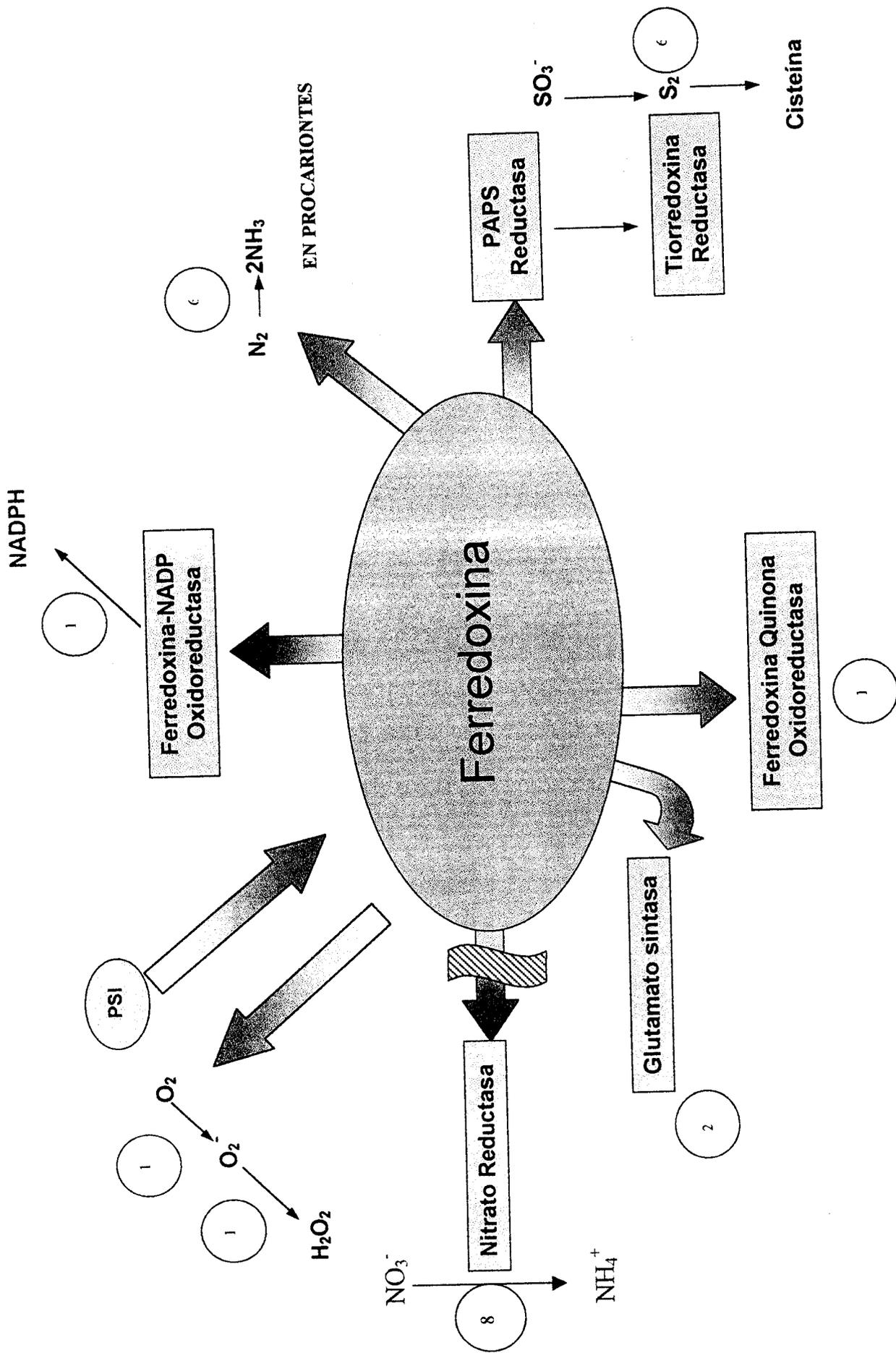
Los resultados aquí obtenidos contradicen la existencia de esta relación, ya que el comportamiento de Fv/Fm a lo largo de la curva de crecimiento parece haber estado controlado más por las condiciones de luz que por la concentración de nitrógeno en el medio (fig. 7 y 11). Después de la disminución a 96  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , Fv/Fm aumentó en *S. kawagutii*, y posteriormente continuó incrementándose a la par de la densidad celular (autoensombrecimiento), mientras que con respecto a los niveles de  $\text{NO}_3^-$  no existió correlación alguna. Más aún, el valor máximo de Fv/Fm se alcanzó para esta especie cuando se registraron las menores concentraciones (30  $\mu\text{M}$ ) de nitrato (fig. 11a), mientras que para *S. pilosum* los valores se mantuvieron sin cambios significativos 11 días después de que los nitratos estuvieron por debajo del límite de detección (fig. 11b).

En un experimento previo, Iglesias-Prieto (no publicado) observó que el tiempo que tarda en presentarse la caída de Fv/Fm para estas mismas especies varía con las condiciones de luz. En cultivos sometidos a alta irradiancia (250  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) la caída se presenta a los 30 días de haber inoculado, mientras que para baja luz (40  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) se presenta a los 60 días aproximadamente. En este caso, dicha caída se presentó el día 41 de cultivo para *S. kawagutii* cuando Fv/Fm se redujo 25 % con respecto a su valor máximo (Fig. 11a), mientras que para *S. pilosum* la caída fue de tan solo el 13 % el día 61 de

cultivo (Fig. 11b). Estos resultados son consistentes con los del experimento previo bajo el supuesto de que  $96 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  aún fueran condiciones supersaturantes para *S. kawagutii*.

Se han realizado esfuerzos (Olaizola *et al.*, 1996) en condiciones naturales para probar la relación entre la eficiencia en la separación de cargas de FSII y la concentración externa de nitrógeno, propuesta por Kolber *et al.* (1988). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora no han respaldado dicha correlación. Por ello, a pesar de que la proporción  $F_v/F_m$  es un parámetro relativamente fácil de obtener, se debe tener gran cuidado al hacer extrapolaciones, ya que la variación de dicho parámetro no depende exclusivamente de las condiciones nutricionales, sino también de las características fotobiológicas de las especies involucradas y de la historia de los organismos, tanto condiciones de luz como de nutrientes.

Por otro lado, es importante mencionar que se han hecho muchas extrapolaciones a la naturaleza a partir de resultados obtenidos en condiciones experimentales controladas, bajo las cuales pueden confundirse los efectos de estrés y limitación. La asimilación de algunos nutrientes como los  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NO}_3^-$ , son procesos incluidos entre las múltiples funciones de la ferredoxina presentando un gasto considerable de poder reductor (fig. 21). De tal forma que la pérdida abrupta de algún elemento que funciona como aceptor final de electrones repercute en la tasa de transporte ya que el flujo de electrones a través de la cadena de transporte está modulado por la tasa de consumo de NADPH y ATP (Alberts *et al.*, 1998; Wykoff *et al.*, 1998). El poder reductor utilizado en la reducción de dichos elementos se acumulará, ya que éste no puede ser utilizado de forma rápida en otras vías, debido a que el flujo de electrones destinado a otras funciones es dependiente de la disponibilidad de enzimas. Por ejemplo, en el caso de la fijación de carbono dependería de la cantidad de RUBISCO activa excedente.



**Fig. 21.** Esquema de las funciones de la ferredoxina. El flujo de electrones hacia la nitrato reductasa (NR) se presenta bloqueado. Los números encerrados en círculos representan la cantidad de electrones necesarios para cada función.

Esta acumulación ocasionada por la pérdida de un aceptor final puede ser considerada como un estrés, mientras que, la limitación por nutrientes dependería concretamente de la disponibilidad del nutriente a través del tiempo, es decir, de su historia.

La composición del material particulado y fitoplanctónico en las aguas marinas es muy cercana a la proporción de Redfield ( $C_{106}:N_{16}:P_1$ ). De esta forma los organismos fitoplanctónicos que crecen con nitratos como única fuente de nitrógeno emplean en su reducción un tercio del poder reductor generado. Ya que la proporción C:N de Redfield es de 7:1, y cada molécula de carbono fijado tiene un gasto de energía de 2 e-, mientras que para la asimilación de una molécula de nitratos llevada hasta aminoácido se consumen 10 e-. La pérdida abrupta de nitrógeno en forma de amonio representaría un estrés por acumulación de más de un tercio del poder reductor.

La distinción entre el estrés generado por una pérdida abrupta de nitratos en el medio (cambio al medio N-) y la limitación (cambio al medio N+) pudieron ser separadas, ya que se midieron diferentes características de la actividad fotosintética bajo dos condiciones: generando en N- estrés y limitación y en N+ generando únicamente estrés (sin limitación). Aparentemente las modificaciones en la maquinaria fotosintética son debidas principalmente a la acumulación de poder reductor por la pérdida de un aceptor final de electrones y no a la pérdida de nitrógeno como elemento esencial.

Se obtuvieron espectros de absorción *In vivo* bajo las dos condiciones experimentales: N-, N+ y el control, en diversos puntos de la curva de crecimiento del cultivo de *S. kawagutii* y *S. pilosum*. La comparación de los espectros de absorción entre tratamientos y el control no mostró diferencias, aparentemente debido a que las 10 hrs de duración del experimento no fueron suficientes para observar cambios en la composición de pigmentos (los datos no se presentan). Sin embargo dado que no se realizó la cuantificación de pigmentos accesorios por HPLC, que es una técnica más precisa, pudo suceder que las concentraciones de

éstos hayan variado pero que no hayan sido evidentes en el espectro de absorción.

Por otro lado, si se apreciaron modificaciones notables en la composición de pigmentos, al comparar los espectros de absorción *In vivo* del inicio de la curva de crecimiento contra los espectros al final de ésta (fig. 12). Los picos en 440 y 460.5 nm observados en *S. kawagutii* (fig. 12b), aparentemente corresponden a una mayor proporción de peridina y *c2*, los cuales son componentes del principal complejo colector de luz de dinoflagelados (acpPC) (Iglesias-Prieto *et al.* 1993; Hiller *et al.* 1993). A pesar de que al inicio de la curva de crecimiento la cantidad de luz recibida en el cultivo es mayor, el espectro de diferencia no presenta, al igual que en lo reportado anteriormente, un cambio en la composición de pigmentos con funciones fotoprotectoras (Iglesias-Prieto y Trench, 1997). En cambio el pico observado en 485 nm en *S. pilosum* (fig. 12c) parece ser el resultado de una mayor concentración de algún pigmento del tipo de las xantofilas con funciones fotoprotectoras, ya que éste desaparece conforme la densidad de cultivo aumenta. En un espectro de diferencia de acpPC bioquímicamente aislado de células aclimatadas a alta y baja luz de esta especie presenta un pico en 465 nm (Iglesias-Prieto y Trench, 1997). Si bien hay 20 nm de diferencia entre este pico y el aquí reportado, este pigmento se encuentra en la banda donde absorben pigmentos del tipo de las xantofilas y esta diferencia también puede deberse a que se trata de un espectro de absorción *In vivo*, mientras que el caso citado corresponde a un espectro de absorción de un complejo clorofila-proteína aislado.

Las concentraciones de Chl *a* y *c2* extraídas en acetona (tabla 3) estuvieron muy por debajo de la concentración reportada por Iglesias-Prieto y Trench (1994) para estas dos especies. Dado que los análisis fueron llevados a cabo un mes después de realizarse el experimento, las bajas concentraciones y el extraño comportamiento pueden ser explicados principalmente por dicho retraso. En *S. kawagutii*, el comportamiento de la concentración de clorofila fue contrario a lo esperado, ya que, además de no presentarse las mayores diferencias entre el control y los tratamientos al inicio de la curva de

crecimiento (día 7), la concentración de clorofila *a* en el control cayó el día 22 y subió hacia el día 26. Sin embargo, ésta se mantiene por debajo de la concentración registrada el día 7, en contraposición a la hipótesis, planteada en la página 40, de la atenuación de la irradiancia por autoensombrecimiento, que de ser cierta, debió reflejarse en un incremento de Chl *a* por célula el día 26 de cultivo. La concentración de Chl *c2* mostró un comportamiento similar al obtenido para la concentración de Chl *a*, sin embargo, cabe destacar que en el día 22 el tratamiento N- presentó un ligero incremento con respecto al control, de forma inversa al comportamiento de la Chl *a* durante ese día. Al igual que para *S. kawagutii*, la concentración de Chl *a* en *S. pilosum* disminuye en el tiempo y durante el día 12 se presentan las menores concentraciones.

Mientras que el comportamiento de la proporción Chl *a*: Chl *c2* si presentó el patrón esperado, incrementándose en los tratamientos N- y N+ durante los primeros días y disminuyendo a través del tiempo.

Las nuevas técnicas de fluorescencia han facilitado considerablemente el estudio de la maquinaria fotosintética. No obstante, es conveniente destacar que la obtención sencilla y rápida de esta información puede favorecer la interpretación equivocada de datos tomados de manera también errónea, por lo cual es necesario tomar en cuenta diversos requerimientos antes de utilizar dicha técnica (Bilger *et al.*, 1995). En el análisis de desactivación de la fluorescencia, es necesario considerar la medida inicial de  $F_v/F_m$  absoluta, es decir, con un periodo de adaptación a oscuridad, tomando en cuenta las cinéticas de relajación de la desactivación no-fotoquímica, si las medidas son en campo, es necesario tomar dicha medida antes del amanecer. El diseño de cámaras (mediciones en solución) o clip sujetadores (mediciones en campo) debe de considerar la colocación adecuada de la fibra óptica y del sensor de luz, por ejemplo.

Los fluorómetros de pulso modulado permiten la obtención de la eficiencia en la separación de cargas de fotosistema II bajo condiciones de luz

natural, denominando a ésta cosecha cuántica efectiva  $\Delta F/F_m'$ . En condiciones de iluminación, la eficiencia cuántica de PSII depende del consumo de energía de las reacciones oscuras. De esta manera, el monitoreo de la actividad de FSII por mediciones de fluorescencia puede proveer información de la tasa de transporte de electrones y, bajo ciertas suposiciones también puede usarse para estimar la fijación de CO<sub>2</sub> (Weis y Berry, 1987; Genty *et al.*, 1989; Edwards y Baker, 1993; Oberhuber *et al.*, 1993 In: Bilger *et al.*, 1995). De esta forma, la cosecha cuántica relativa para el cálculo del flujo de electrones vs irradiancia puede resultar una buena aproximación a una curva fotosíntesis-irradiancia obtenida mediante el seguimiento de la producción de oxígeno o de la fijación de carbono, que son métodos más laboriosos, lentos y, en el caso de utilización de carbono radiactivo, destructivo.

Sin duda alguna, el punto que más puede dificultar el cálculo correcto de esta tasa de transporte de electrones vs irradiancia es la obtención de la absorptancia. En los trabajos realizados con plantas superiores ésto no representa mayor problema ya que dicho valor es de aproximadamente 0.80. Sin embargo, la medición de la absorptancia en organismos acuáticos y especialmente en algas fitoplanctónicas puede resultar complicada. En este trabajo se ha propuesto un método sencillo, utilizando al mismo fluorómetro para obtener una estimación de dicho valor. Esta aproximación mostró una buena correlación ( $R^2=0.8315$ ;  $p<0.01$  prueba de F; fig. 5) con los valores obtenidos a partir de espectros de absorción realizados con un espectrofotómetro AMINCO DW2. El principio para la medición es muy simple, ya que todo lo que hay que hacer es colocar el sensor de luz plano corregido por coseno del mismo fluorómetro enfrente de la fibra óptica conectada a la fuente de luz y al detector de fluorescencia e inmediatamente después de la cuvette. La medición de luz actínica se realiza bajo dos condiciones: con medio de cultivo sin células y con medio de cultivo con células, y de aquí se estima la cantidad bruta de luz absorbida. La importancia de esta propuesta es que permite que en un futuro el cálculo de la absorptancia para microalgas sea más cercano al valor real, sin necesidad de contar con un espectrofotómetro.

Por otro lado, la tasa de transporte de electrones (ETR) obtenida aquí fue calculada a partir de la fórmula propuesta por Brodribb y Hill (1997), en donde la absorptancia se divide por la constante 2, asumiendo un flujo lineal de electrones entre los dos fotosistemas. Es probable que la tasa de transporte de electrones esté sobrestimada bajo algunas condiciones, en donde dicho supuesto no se cumpla, es decir, donde se presente flujo cíclico de electrones en FSII o FSI. La existencia de un flujo cíclico a través del fotosistema II ha sido propuesta como un mecanismo de regulación del exceso de energía de excitación, posiblemente mediado por Cyt b559 (Falkowski *et al* ,1986). Así mismo, en torno a la limitación por nitrógeno, Berger *et al.* (1996) encuentran evidencias de un flujo cíclico significativo en microalgas marinas creciendo en condiciones deficientes de nitrógeno.

La producción de oxígeno estimada mediante la tasa de transporte de electrones por célula obtenida aquí, resultó mayor a las obtenidas por mediciones polarográficas en ambas especies por Iglesias-Prieto y Trench (1994) y con la reportada para *S. kawagutii* en el trabajo de Chang *et al.* (1983). Por ello, es conveniente que en futuras investigaciones ambas mediciones se realicen en paralelo, acoplando el fluorómetro de amplitud modulada a una cámara con electrodo de oxígeno con el fin de calibrar la medición del flujo de electrones obtenida por medio de mediciones de fluorescencia. Independientemente de esta sobrestimación, las curvas de flujo de electrones vs irradiancia proporcionan información de la maquinaria fotosintética, la cual puede ser interpretada a partir de los parámetros típicos que arroja una curva fotosíntesis-irradiancia (P-I), calculando ETR max (como Pmax), la tasa de absorción de energía dependiente de la cantidad de luz como  $\alpha$  y la cantidad de luz a la cual se satura el transporte de electrones como  $I_k$ , sin olvidar que se trata de aproximación.

Las curvas de flujo de electrones vs irradiancia obtenidas para ambas especies (figs. 13a y 15a) cambiando el medio de cuando las células crecían bajo concentración de nitratos alta de 313 y 465  $\mu\text{M}$ , para *S. kawagutii* y *S. pilosum*

respectivamente (en fase de crecimiento exponencial), a un medio carente de nitrógeno (N-) presentan una caída del flujo máximo similar a la producida cuando las células son cambiadas a un medio con nitrógeno pero en forma más reducida (medio N+, con nitrógeno en forma de acetato de amonio).

Las condiciones al inicio de la curva de crecimiento son similares a las presentadas en la mayoría de los trabajos que han sido interpretados como limitación por nutrientes, es decir, células creciendo en un medio rico en nutrientes y en fase de crecimiento exponencial que son cambiadas drásticamente a un medio carente del nutriente en estudio (Rhiel *et al.*, 1986, Geider *et al.*, 1993; LaRoche *et al.*, 1993, Wykoff *et al.*, 1998). Siendo el cambio al tratamiento N- similar al de trabajos previos, pero descartando la limitación de nitrógeno como elemento con el cambio al medio N+.

A partir de estos resultados, podemos interpretar que después de 10 hrs del cambio de medio, bajo un régimen idéntico de luz ( $96 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), el efecto de la pérdida drástica de nitrógeno, como aceptor final de electrones y no como elemento, causa una disminución en la tasa máxima de transporte de electrones, en  $\alpha$  y en  $I_k$  (la cantidad de luz a la cual se satura el transporte de electrones) (fig. 13a y 15a), produciéndose efectos similares a los de estrés por luz (fig. 22). Este comportamiento es similar al obtenido por Wykoff *et al.* (1998) para la curva fotosíntesis vs irradiancia de *Chlamydomonas reinhardtii* sometida a una disminución de P y S.

La disminución del flujo de electrones en la curva de los tratamientos N- y N+ con respecto a la curva control fue más acentuada en *S. kawagutii* (fig. 13a) que la obtenida en *S. pilosum* (fig. 15a). Al inicio de la curva de crecimiento la caída en el flujo de electrones en *S. kawagutii* estuvo acompañada de una caída en  $F_v/F_m$  (fig. 18a), la cual es comparable con la caída observada en microalgas creciendo en fase exponencial sometidas a cambios de medios carentes de diversos nutrientes como P, N, S y Fe (Geider *et al.*, 1993; LaRoche *et al.*, 1993; Wykoff *et al.* 1998), así como de una disminución en la desactivación fotoquímica

(fig. 19a), mientras que ambos parámetros no presentaron variaciones en *S. pilosum* (figs. 18b y 19b). Estas diferencias son consistentes con la propuesta de que *Symbiodinium kawagutii* es una especie adaptada a bajo régimen lumínico. La menor diferencia entre el control y los tratamientos en el flujo de electrones de *S. pilosum* puede ser consecuencia de dos factores: la estrategia de incorporación de nitratos o la adaptación (*sensu* Darwin) a alta densidad de flujo de fotones, mostrada con su alta capacidad de inducción de desactivación no-fotoquímica (fig. 20b) o bien, si esta especie incorpora nitratos para llenar una poza, el cambio abrupto en el medio externo no provocaría una acumulación de poder reductor, ya que dicha acumulación estaría más en función del tamaño de la poza interna. Sin embargo, los resultados de desactivación no-fotoquímica parecen mostrar un estrés por luz durante la pérdida abrupta (fig. 16b).

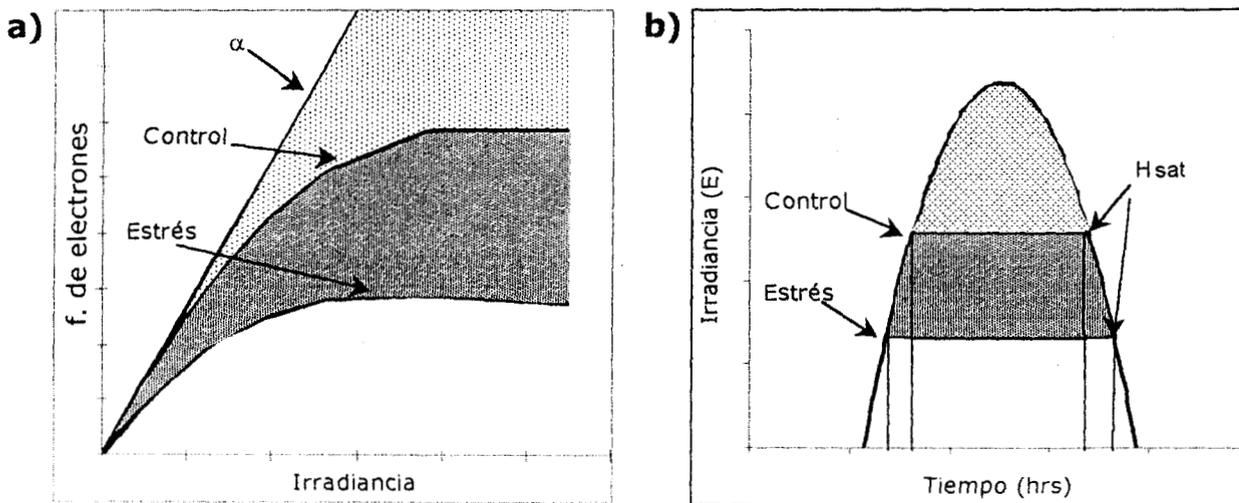


Fig. 22. a) Curva de flujo de electrones vs irradiancia para cualquier tipo de estrés. La línea recta representa la pendiente de absorción de luz ( $\alpha$ ), en la curva superior se presenta una curva de células sin estrés (control) y la curva inferior una curva de células bajo estrés. La suma de las áreas punteada y oscura representa la cantidad de energía absorbida que no es utilizada por las reacciones de fotoquímica de células bajo estrés. b) Traducido a un ciclo diurno de variación de la irradiancia, las células bajo estrés saturan el flujo de electrones con menor cantidad de luz y están sometidas a un exceso en la densidad de flujo de fotones mayor número de horas ( $H_{sat}$ ).

A diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y durante el experimento inicial, las diferencias de  $F_v/F_m$  entre *S. kawagutii* y *S. pilosum* fueron evidentes (figs. 7, 11

y 18). Mientras que para la primera especie es un factor acentuadamente variable en función de las condiciones de luz, la segunda muestra fluctuaciones menos severas. A partir de los espectros de absorción obtenidos aquí (fig.12), y de acuerdo con Iglesias-Prieto y Trench, (1997), la carencia de pigmentos del tipo de las xantofilas en *S. kawagutii* resulta un reflejo de la baja capacidad para inducir desactivación no-fotoquímica. Se ha demostrado que la inhibición de enzimas involucradas en la epoxidación-depoxidación de pigmentos del ciclo de las xantofilas en vegetales superiores, conduce a una disminución de Fv/Fm del 34.9% después de un tratamiento fotoinhibitorio en contraste con el 4.7 % del control (Bilger y Björkman, 1990), lo que podría explicar el hecho de que Fv/Fm es más sensible en *S. kawagutii* que en *S. pilosum*.

Esta baja capacidad de inducción de desactivación no-fotoquímica se aprecia en la fig. 14a, donde a pesar de ser evidente la caída en el flujo de electrones para *S. kawagutii* al cambio de medio durante la etapa inicial de la curva de crecimiento, el control presenta mayor desactivación no-fotoquímica que N- y N+. Paralelamente, la desactivación no-fotoquímica no presenta un patrón bien definido en cultivos bajo diferentes concentraciones de nitratos (fig. 20). Una evidencia más de la baja capacidad de inducción no-fotoquímica resulta de lo observado en mediciones realizadas inmediatamente después del cambio de medio y sin someter a iluminación, en donde ambos tratamientos presentaron mayor desactivación no-fotoquímica que el control (los resultados no se presentan). Sin embargo, dichas diferencias desaparecieron después de 10 hrs de luz.

La capacidad de inducción de desactivación no-fotoquímica de *S. pilosum* es evidente, a pesar de que la disminución en la tasa de transporte de electrones para N- y N+ fue menor que para *S. kawagutii* (figs. 13a y 15a), los tratamientos inducen respectivamente 57 y 41 % más desactivación no-fotoquímica que el control (fig. 16a).

Como es de esperar según la hipótesis de trabajo, estas condiciones se deben invertir al final de la curva de crecimiento, en donde la concentración de nitratos ya ha sido consumida por las células en cultivo, debido a que el flujo de electrones utilizado para la reducción de nitratos fue desviado paulatinamente hacia otras vías. En el caso de *S. pilosum* sucedió así (fig. 15b), sin embargo se presentó un incremento en la tasa de transporte de electrones en ambos tratamientos, lo que resulto extraño para N-. Esto podría sugerir que el cambio a un medio rico en los demás nutrientes aunque sin ninguna fuente de nitrógeno favorece el estado fisiológico de la maquinaria fotosintética. Bajo la misma hipótesis de la distribución de poder reductor desde las múltiples funciones de la ferredoxina, en donde una mayor disponibilidad de aceptores de electrones dados por el medio nuevo libera la presión sobre el FSII. Para *S. kawagutii*, aún al final de la curva de crecimiento el tratamiento N+ presentó un flujo de electrones menor que el control (fig. 13b).

Resultaría un error interpretar el cambio de medio a N+ bajo los mismos términos para *S. kawagutii* que para *S. pilosum*, ya que en el primer caso parece que el amonio tuvo un efecto distinto. Ha sido demostrado que el  $\text{NH}_4^+$  en altas concentraciones es tóxico. El daño a nivel de la maquinaria fotosintética es específicamente en el lado donador de electrones del fotosistema II, que puede ser cuantificado a partir de la curva de inducción de fluorescencia con el fluorómetro PEA (HANSATECH) (King-Díaz, *et al.*, 1998). Por ello, se sugiere la realización de dicha medición para interpretar correctamente los resultados correspondientes a estas dos especies.

De esta forma, según lo propuesto aquí, sería lógico esperar una respuesta común de la fotosíntesis en la mayoría de los experimentos realizados hasta ahora en torno a la limitación por nutrientes, ante la carencia en un lapso de tiempo corto de cualquier elemento que requiera consumo de poder reductor y ATP. En el caso de los nutrientes se ha establecido que existen variaciones en la fotosíntesis y en la tasa de crecimiento. Las modificaciones de la tasa de crecimiento parecen ser nutriente específicas.

La respuesta fotosintética es común para todos los nutrientes analizados y muy similar a la presentada durante el estrés por alta irradiancia, con una disminución en la tasa máxima de fotosíntesis y de Fv/Fm; así como la pérdida de pigmentos fotosintéticos (Herzig y Falkowski, 1989; Kolber *et al.*, 1989; LaRoche, *et al.*, 1993; Geider *et al.*, 1993). La variación de estos parámetros con respecto al tiempo o a la magnitud del cambio mismo ha sido interpretada como diferencias nutriente-específicas (Geider *et al.*, 1993), negándose la similitud con la respuesta fotosintética a altas irradiancias. Sin embargo, es evidente que en función del consumo de poder reductor o de ATP asociado al uso del nutriente en cuestión se generará mayor o menor estrés.

En el trabajo realizado por Wykoff *et al.* (1998), la disminución drástica de P y S en *Chlamydomonas reinhardtii*, genera claras diferencias en la tasa de evolución de oxígeno con respecto al tiempo. La caída del 75 % para cultivos empobrecidos en S se presenta el primer día, mientras que para cultivos empobrecidos en P se presenta hasta el cuarto día. Resultados similares fueron obtenidos bajo la carencia de P, N y Fe (Geider *et al.*, 1993) en términos de Fv/Fm y de la abundancia de proteína D1 (componente del centro de reacción de FSII), así como de la disminución en la concentración de clorofila y el incremento de pigmentos con características fotoprotectoras. En dicho trabajo, las células desprovistas de P, presentaron la menor variación en todos los parámetros, seguidas por las células empobrecidas en Fe, para finalmente presentarse las mayores diferencias en las células privadas de nitrógeno, al igual que en el caso del S. Las diferencias para el S y el N, que muestran los efectos más drásticos pueden deberse al poder reductor requerido en su asimilación (6 y 8 e<sup>-</sup> respectivamente) (fig. 21). Por otro lado, el hierro es un elemento necesario en algunos sistemas de acarreadores de electrones, lo cual puede generar una disminución en la tasa de transporte traduciéndose también como un exceso de energía luminosa. Finalmente, el fósforo puede presentar los menores efectos debido a que de todos los elementos presenta una mayor remineralización.

Estas respuestas son similares a la presentada ante otros tipos de estrés. Ha sido demostrado que el estrés por disminución en la temperatura genera una respuesta similar a la presentada por estrés a alta irradiancia (Maxwell *et al.*, 1996; Law y Crafts-Brandner, 1999), y ante una disminución de CO<sub>2</sub> (Bilger y Björkman, 1990).

De tal forma que a partir de la interpretación de los resultados obtenidos aquí es posible explicar que la respuesta a distintos tipos de estrés sea común. Se postula que cualquier tipo de estrés en la maquinaria fotosintética causa una acumulación de poder reductor, el cual desencadena los mecanismos de regulación empleados ante un estrés lumínico. Por medio de las técnicas de fluorescencia se ha sugerido que el principal sitio de daño de la limitación por nutrientes, y en general para cualquier tipo de estrés, es el fotosistema II. Solo en algunos casos se ha identificado al FSI como el sitio de daño, especialmente en un estrés combinado de luz y temperatura de congelación en vegetales superiores. Sin embargo, el daño en FSI estuvo acompañado por daño en FSII con una disminución de la proporción  $F_v/F_m$  (Tjus *et al.*, 1998).

De esta forma la evidencia de daño a nivel de fotosistema II ante cualquier estrés, sugiere que es éste el sitio principal de la regulación de la actividad fotosintética. Y únicamente cuando el exceso de energía de excitación supera la capacidad de regulación del FSII, se inician los mecanismos de regulación en el FSI.

## **Conclusiones.**

La tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de *Symbiodinium kawagutii* fue menor que la de *S. pilosum*. Ambas especies presentaron valores por debajo de los reportados anteriormente para el género *Symbiodinium*.

Aparentemente la oscilación en la temperatura y la irradiancia fueron los factores determinantes de la tasa de crecimiento baja.

La incorporación de nitrógeno fue más rápida en *S. pilosum* estando por debajo de los límites de detección en tan sólo 12 días, la velocidad del consumo de nitratos se vio reflejada en la cuota celular de nitrógeno siendo del orden de 33.34 pg N cél<sup>-1</sup>.

*S. kawagutii* incorpora nitrógeno lentamente presentando cuotas celulares homogéneas a lo largo de toda la curva de crecimiento.

La relación entre la concentración externa de nitrógeno y la eficiencia en la separación de cargas del FSII dada por Fv/Fm documentada en la literatura no se presentó. Fv/Fm mostró ser un factor que no depende únicamente de las condiciones nutricionales de las células.

La variación de Fv/Fm mostró una relación más estrecha con respecto a la irradiancia: durante el cambio de régimen luminoso y con la atenuación de la irradiancia incidente por el incremento de la densidad celular (autoensombrecimiento).

Así mismo, la variación de Fv/Fm también es dependiente las características fotobiológicas de cada especie, mostrando mayores variaciones en *S. kawagutii* especie adaptada *sensu* Darwin a baja irradiancia, que en *S. pilosum* adaptada a una alta densidad de flujo de fotones.

El flujo máximo de electrones de ambas especies presentó comportamientos similares en los tratamientos N- y N+ al inicio de la curva de crecimiento (alta concentración de  $\text{NO}_3^-$  y en fase de crecimiento exponencial).

Por lo que se puede decir, que es la pérdida de nitrógeno como aceptor final de electrones y no como elemento lo que induce una disminución de la actividad fotosintética.

El comportamiento del flujo máximo de electrones se fue invirtiendo conforme a lo esperado según la hipótesis de trabajo a través de la curva de crecimiento con el abatimiento paulatino de la concentración de nitrato.

La capacidad de inducir desactivación no-fotoquímica en *S. pilosum* fue evidente ya que a pesar de presentar menores variaciones del flujo máximo de electrones en los tratamientos N- y N+, presentó diferencias significativas y un patrón a través de la curva de crecimiento de la desactivación no-fotoquímica.

En *S. pilosum* la desactivación fotoquímica y la proporción  $F_v/F_m$  de los tratamientos N- y N+ no fueron estadísticamente diferentes del control bajo ninguna circunstancia.

*S. kawagutii* mostró baja capacidad de inducir desactivación no-fotoquímica ante el estrés por acumulación de poder reductor. Las mayores modificaciones en el aparato fotosintético de *S. kawagutii* se presentaron en cuanto a la desactivación fotoquímica y la proporción  $F_v/F_m$ .

La disminución en la disponibilidad de nitrógeno en forma de nitratos desencadenó un efecto similar al presentado durante un estrés por exceso de luz, el cual también se presenta bajo distintas condiciones como temperatura, presión parcial de  $\text{CO}_2$  y diversos nutrientes.

De esta forma, cualquier tipo de estrés se ve reflejado en la maquinaria fotosintética aparentemente como un estrés por exceso de luz.

Si todo estrés se traduce como un exceso de luz, el FSII se postula como el sitio principal de regulación de la actividad fotosintética. Y únicamente cuando el estrés excede la capacidad de regulación de éste, tiene lugar la regulación de la actividad del FSI.

## ***Literatura Citada.***

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson, 1994. Molecular Biology of the Cell. 3th Edit. Garland Publishing Inc. New York and London.
- Bilger, W. y O. Björkman, 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynth. Res. 25**: 173-185.
- Bilger, W., U. Schreiber y M. Bock 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia 102**: 425-432.
- Berges, J.A., D.O. Charlebois, D.C. Mauzerall y P.G. Falkowski, 1996. Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. **Plant Physiol. 110**: 689-696.
- Björkman, O., 1981. Responses to different quantum flux densities. **Encycl. P. Physiol (New Ser) 12 A**: 57-107.
- Britaintais, J.M., C. Vernotte, G.H. Krause, y E. Weis, 1986. Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In: Light Emission by Plants and Bacteria. Edited by Govindjee, Amesz. J. and Fork, D.J. pp 539-583. Academic Press, New York.
- Brodribb, T. y R.S. Hill, 1997. Light response characteristics of a morphologically diverse group of southern hemisphere conifers as measured by chlorophyll fluorescence. **Oecologia 110**: 10-17.

- Chang, S. S., B.B. Prézelin and R.K. Trench, 1983. Mechanims of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. **Mar. Biol.** **76**: 219-229.
- Chitnis, P.R., 1996. Photosystem I. **Plant. Physiol.** **111**: 661-669.
- Demmig-Adams, B., 1990. Carotenoid and photoprotection in plants: a possible role for the xanthophyll zeaxanthin. **Biochim. Biophys. Acta** **1020**: 1-24.
- Droop, M.R., 1974. The nutrient status of algal cells in continuous culture. **J.Mar. Biol. Assoc. UK** **54**: 825-855.
- Edwards, G.E. y N.R. Baker, 1993. Can CO<sub>2</sub> assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? **Photosynth. Res.** **37**: 89-102.
- Falkowski, P.G, Y. Fujita, A. Ley y D.C. Mauzerall, 1986. Evidence for cyclic electron flow around photosystem II in *Chlorella pyrenoidosa*. **Plant Physiol.** **81**: 310-312.
- Geider, R.J., J. La Roche, R. Greene y M. Olaizola, 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum triconutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron staration. **J. Phycol.** **29**: 755-766.
- Genty, B., J.M Braintais y N.R. Baker, 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophylls fluorescence. **Biochim. Biophys. Acta** **990**: 87-92.
- Greene, R.M., R.J. Geider y P.G. Falkowski, 1991. Effect to iron limitation on photosynthesis in marine diatom. **Limnol. Oceanogr.** **36**:1772-1782.
- Gregory, R.P.F., 1989. Photosynthesis. Blackie and Son Ltd. New York.

Hall, D.O. y Rao, K.K., 1994. Photosynthesis. Fifth Edition. Cambridge University Press. London.

Havaux, M., Greppin, H., y Strasser, R. J., 1991. Functioning of photosystems I and II in pea leaves exposed to heat stress in the presence or absence of light. **Planta** **186**: 88-98.

Herzing, R. y P.G. Falkowski, 1989. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. **J. Phycol.** **25**: 462-471.

Hiller, R.G., P.M.. Wrench, A.P. Gooley, G. Shoebridge y J. Breton, 1993. The major intrinsic light-harvesting protein of *Amphidinium*: characterization and relation to other light-harvesting proteins. **Photochem. Photobiol.** **57**:125-131.

Horne, R.A., 1969. Marine Chemistry. Wiley-Interscience. New York. 568 pp.

Horton, P., Aa.V. Ruban y R.G. Walters, 1996. Regulation of light harvesting in green plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **47**: 655-684.

Huppe, H.C. y D.H. Turpin, 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolisms in plant and algal cells. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.** **45**: 577-607.

Iglesias-Prieto, R., J. Matta, W. Robins y R.K. Trench, 1992. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**:10302-10305.

Iglesias-Prieto, R., N.S. Govind y R.K. Trench, 1993. Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes

- from four dinoflagellate species. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** **340**:381-392.
- Iglesias-Prieto, R y R.K. Trench, 1994. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Response of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** **133**: 163-175.
- Iglesias-Prieto, R y R.K. Trench, 1997. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Response of chlorophyll-protein complex to different photon-flux densities. **Mar. Biol.** **130**: 23-33.
- Iglesias-Prieto, R y R.K. Trench, 1997b. Photoadaptation, photoacclimation and niche diversification in invertebrate-dinoflagellate symbioses. **Proc. 8th Int. Coral Reef Sym 2**: 1319-1324.
- Jeffrey, S.W. y G.F. Humphry, 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochim. Physiol. Pflanz.** **167**: 191-198.
- King-Díaz, B., N. Barba-Behrens, J. Montes-Ayala, S. Castillo-Blum, C. Escartín-Guzmán, R. Iglesias-Prieto y B. Lotina-Hennsen, 1998. Interference by Nickel (II) salts and their 5-methylimidazole-4 carboxylate coordination compounds on the chloroplast redox chain. **Naturforsch** **11-12**: 987-994.
- Kolber, Z., J. Zehr, y P.G. Falkowski, 1988. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. **Plant Physiol** **88**:923-929.
- Krause, G.H y Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.** **42**: 313-349.

- La Roche, J., R.J. Geider, L.M. Grazziano, H. Murray y K. Lewis, 1993. Induction of specific proteins in eukaryotic algae grown under iron-, phosphorus-, or nitrogen-deficient conditions. **J. Phycol.** **29**: 767-777.
- Law R.D. y S.J. Crafts-Brandner, 1999. Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. **Plant Physiol.** **120**: 173-181.
- Lázar, D., 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. **Biochim. Biophys Acta** **1412**: 1-28.
- Levasseur, M., P.A. Thompson y P.J. Harrison, 1993. Physiological acclimatation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. **J.Phycol** **29**:587-595.
- Marra, J. 1980. Vertical mixing and primary production. pp 121-137. In: Falkowski, P.G. (Ed) Primary productivity in the sea. Enviromental science research Vol. 19. Plenum Press.
- Maxwell, D.P., S. Falk, C.G. Trick y N.P. Huner, 1994. Growth at low temperature mimics high-light acclimation in *Chlorella vulgaris*. **Plant Physiol.** **105**: 535-543.
- Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. **Ann. Rev. Microbiol.** **3**: 371-394.
- Olaizola, M., R.J. Geider, W.G. Harrison, L.M. Graziano, G.M. Ferrari y P.M. Schlittenhardt, 1996. Synoptic study of variations in the fluorescence-based maximum quantum efficiency of photosynthesis across the North Atlantic Ocean. **Limnol. Oceanogr.** **41**:755-765.

- Osmod, C.B., Austin, M.P., Berry, J.A., Billings, W.D., Boyer, J.S., Dacey, G.W.H., Nobel, P.S., Smith, S.D. y Winner, W.E., 1987. Stress physiology and the distribution of plants. **Bioscience** **37**:38-48.
- Owens, N.J.P., 1993. Nitrate cycling in marine waters. In: Nitrate: Processes, Patterns and Management.
- Renger, G. y U.Schreiber, 1986. Practical applications of fluorometric methods to algae and higher plants research. In: Light Emission by Plants and Bacteria. Edited by Govindjee, Amesz. J. and Fork, D.J. pp 597-619. Academic Press, New York.
- Rhiel, E., E. Mörschel y W. Wehrmeyer, 1985. Correlation of pigment deprivation and ultrastructural organization of thylakoid membranes in *Cryptomonas maculata* following nutrient deficiency. **J. Protoplasma** **129**: 62-73.
- Rhiel, E., K. Krupinska y W. Wehrmeyer, 1986. Effects of nitrogen starvation on the function and organization of the photosynthetic membranes in *Cryptomonas maculata* (Cryptophyceae) **Planta** **169**: 361-369.
- Riley, J.P. y R. Chester, 1971. Introduction to marine chemistry. Academic Press. New York. 465 p.
- Rutherford, A.W., 1989. Photosystem II, the water-splitting enzyme. **TIBS** **14**: 227-232
- Sevilla, M. L., 1976. Introducción a la Ecología Marina. IPN 220p.
- Schlegel, H.G., 1979. Microbiología General. 2da Edición. Omega. Barcelona 448p.
- Schreiber, U., U. Schliwa y W. Bilger, 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynth. Res.** **10**: 51-62.

- Schreiber, U. y C. Neubauer, 1990. O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membrane energization and the mechanisms of non-photochemical quenching of chlorophylls fluorescence. **Photosynth. Res.** **25**: 279-293.
- Schreiber, U., T. Endo, H. Mi y K. Asada, 1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. **Plant Cell Physiol.** **36**: 873-882.
- Strickland J.D.H. y T.R. Parson, 1972. A manual of sea water analysis. Fisheries Research board of Canada. No. 125. Second Edicion. 203 p.
- Trench, R.K., 1974. Nutritional potentials in *Zoanthus sociatus* (Coelenterata, Anthozoa). **Helgoländer wiss Meeresunters** **26**: 174-216.
- Trench R.K. y R.J. Blank, 1987. *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, *S. goreauii* sp. nov., *S. kawagutii* sp. nov. And *S. pilosum* sp. nov.: gymnodinioid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates. **J. Phycol** **23**: 469-481.
- Tjus, S.E., B.L. Møller y H.V. Scheller, 1998. Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. **Plant Physiol.** **116**: 755-764.
- Valiela, I., 1984. Marine ecological processes. Springer-Verlag. New York. 546 p.
- Vergara, J.J., K. T. Bird y F.X. Niell, 1995. Nitrogen assimilation following NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pulses in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: effect on C metabolism. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** **122**: 253-263.

Weis, E. y J. Berry, 1987. Quantum efficiency of photosystem II in relation to energy-dependent quenching of chlorophylls fluorescence. **Biochim. Biophys. Acta 894**: 198-208.

Wykoff, D.D., J.P. Davies, A. Melis y A.R. Grossman, 1998. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol. 117**: 129-139.

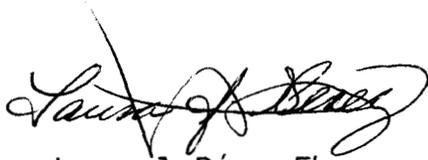
Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 17 de marzo de 2000.

ROBERTO IGLESIAS D.

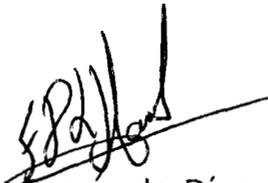
Dr. Roberto Iglesias Prieto



Dr. Martín Merino Ibarra



Dra. Laura J. Pérez Flores



M.en C. Fernando Díaz de León