# Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR FACULTAD DE CTENCTAS EXACTAS Y NATURALES UBA

# **Tesis Doctoral**





# Schultz, Sabina

2016-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Schultz, Sabina. (2016-03-30). Estudios ecofisiológicos en microalgas del sistema ácido Río Agrio-Lago Caviahue (provincia del Neuquén, Argentina). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Schultz, Sabina. "Estudios ecofisiológicos en microalgas del sistema ácido Río Agrio-Lago Caviahue (provincia del Neuquén, Argentina)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-30.

# **EXACTAS** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA** Universidad de Buenos Aires

**Dirección:** Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar



Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

# Estudios ecofisiológicos en microalgas del sistema ácido Río

# Agrio - Lago Caviahue (provincia del Neuquén, Argentina)

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área de Ciencias Biológicas.

Lic. Sabina Schultz

Director de tesis: Dr. Gustavo Daniel Baffico

Consejero de estudios: Dra. Sara Maldonado

Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche-Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medio Ambiente, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Buenos Aires, 2016

Fecha de defensa: 30 de marzo de 2016

Lic. Sabina Schultz

# Índice de contenido

Índice de Figuras	3
Índice de Tablas	5
Resumen	6
Abstract	7
Agradecimientos	9
Introducción General	12
Objetivos generales	25
Objetivos particulares	
Hipótesis	
Materiales y Métodos Generales	27
Capítulo 1: Caracterización y Aislamiento de Cepas de Microalgas	35
Capítulo 2: Condiciones Físicas y Químicas de Cultivo	60
Capítulo 3: Fuentes de Nitrógeno y Fósforo	93
Capítulo 4: Fuentes de Carbono	
Conclusiones Generales	131
Referencias bibliográficas	134
Anexo	148

# Índice de Figuras

Figura 1. Mapa satelital de Cavihue-Copahue	.20
Figura 2. Panorámica del Lago Caviahue desde la naciente del Río Agrio Superior	20
Figura 3. Mapa de la cuenca	.22
Figura 4. Esquema de Keratococcus rhaphidioides	.32
Figura 5. Esquema de proceso de aislamiento de cepas	.41
Figura 6. Cepas aisladas de hábito cocoide	.51
Figura 7. Cepas aisladas de hábito filamentoso	.52
Figura 8. Fotomicrografías de TEM y SEM	.54
Figura 9. Densidad celular de K. rhaphidioides a diferentes valores de pH	69
Figura 10. Biovolumen de K. rhaphidioides a diferentes valores de pH	70
Figura 11.Concentración de clorofila $a$ (1 <sup>er</sup> extracción) a diferentes pH para	К.
rhaphidioides	. 71
Figura 12. Concentración de clorofila $a$ (2 <sup>da</sup> extracción) a diferentes pH para	К.
rhaphidioides	. 71
Figura 13. Concentración de clorofila <i>a</i> total a diferentes valores de pH para	К.
rhaphidioides	. 72
Figura 14. Contenido de clorofila $a$ total por célula a diferentes valores de pH para	К.
rhaphidioides	. 73
Figura 15. Mediciones diarias de fluorescencia in vivo de K. rhaphidioides para cada pH.	.74
Figura 16. Cociente entre fluorescencia in vivo y clorofila a extraída de K. rhaphidioide	es a
diferentes pH	. 74
Figura 17.Biomasa del inóculo inicial y de los diferentes valores de pH al final del ensa	ayo
	. 75
Figura 18. Tasas de crecimiento para los diferentes valores de pH calculadas a partir de	e la
densidad para K. rhaphidioides	.76
Figura 19. Tasa de fotosíntesis para <i>K. rhaphidioides</i>	.76
Figura 20. Tasas de crecimiento a bajas intensidades lumínicas para K. rhaphidioides	77
Figura 21. Transmitancias de los filtros utilizados en función de la longitud de onda	78
Figura 22. Fluorescencia in vivo de K. rhaphidioides a lo largo de la incubación o	con
diferentes espectros lumínicos	.79
Figura 23. Tasas de fotosíntesis con los diferentes espectros lumínicos para	К.
rhaphidioides	. 79
Figura 24. Fluorescencia in vivo a lo largo del ensayo a diferentes valores de pH para	ι <i>Ρ</i> .
simplex	. 80
Figura 25. Tasa de crecimiento de <i>P. simplex</i> a diferentes valores de pH	.81
Figura 26. Tasa de fotosíntesis para <i>P. simplex</i>	.82
Figura 27. Densidad celular total a diferentes valores de pH para W. caviahuensis	83
Figura 28. Tasa de crecimiento de W. caviahuensis a diferentes valores de pH	84
Figura 29. Densidad celular de K. rhaphidioides con diferentes fuentes de N	99
Figura 30. Densidad celular de K. rhaphidioides para KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> Cl y urea	100

Figura 31. Densidad celular de <i>P. simplex</i> para distintas fuentes de N100
Figura 32. Tasas de crecimiento de <i>P. simplex</i> para las diferentes fuentes de N101
Figura 33. Densidad celular para K. rhaphidioides con dos fuentes de fósforo. β-Gly,
corresponde al grupo estadístico A y PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> al B101
Figura 34. Tasas de crecimiento de K. rhaphidioides para las diferentes fuentes de P102
Figura 35. Densidad celular para <i>P. simplex</i> con dos fuentes de fósforo102
Figura 36. Tasas de crecimiento de <i>P. simplex</i> para las diferentes fuentes de fósforo103
Figura 37. Cultivo masivo de <i>K. rhaphidioides</i>
Figura 38. Crecimiento de K. rhaphidioides en cultivo masivo con tres diferentes
concentraciones de CO <sub>2</sub> 116
Figura 39. Fluorescencia in vivo para K. rhaphidioides en cultivo masivo con tres
concentraciones de CO <sub>2</sub>
Figura 40. Tasas de crecimiento para K. rhaphidioides en cultivo masivo con tres
concentraciones de CO <sub>2</sub> 117
Figura 41. Clorofila <i>a</i> para <i>K. rhaphidioides</i> en cultivo masivo con tres concentraciones de
CO <sub>2</sub>
Figura 42. Clorofila a por célula para K. rhaphidioides en cultivo masivo con tres
concentraciones de CO <sub>2</sub> 119
Figura 43. Densidad celular de K. rhaphidioides con dos concentraciones de nutrientes en el
medio de cultivo y con y sin CO <sub>2</sub> 120
Figura 44. Fluorescencia in vivo de K. rhaphidioides con dos concentraciones de medio de
cultivo y con y sin enriquecimiento con CO2
Figura 45. Tasas de crecimiento de K. raphidioides con dos concentraciones de medio de
cultivo y con y sin enriquecimiento con CO <sub>2</sub>
Figura 46. Fluorescencia in vivo de K. rhaphidioides creciendo con acetato de etilo (EtAc) y
glucosa (Glc) en luz y oscuridad
Figura 47. Fluorescencia in vivo de K. rhaphidioides creciendo con urea en luz y oscuridad
Figura 48. Concentración de clorofila $a$ de $K$ . rhaphidioides en las incubaciones con acetato
de etilo (Acetato) y glucosa (Glc), en luz (A) y en oscuridad (B)123
Figura 49. Concentración de clorofila <i>a</i> de <i>K. rhaphidioides</i> en el ensayo con urea en luz
(A) y oscuridad (B)
Figura 50. Densidad celular de K. rhaphidioides creciendo en acetato de etilo (EtAc) y
glucosa (Glc) en luz y oscuridad
Figura 51. Densidades celulares de K. rhaphidioides creciendo con urea en luz y oscuridad
Figura 52. Clorofila por célula para K. rhaphidioides cultivadas con glucosa y acetato de
etilo en luz (A) y oscuridad (B)125
Figura 53. Clorofila por célula para K. rhaphidioides cultivadas con urea en luz (A) y
oscuridad (B)
Figura 54. Tasas de crecimiento de K. rhaphidioides cultivadas con acetato de etilo (EtAc) y

glucosa (Glc) en luz y oscuridad	
Figura 55. Tasas de crecimiento de K. rhaphidioides en el ensayo co	n urea en luz y
oscuridad	

# Índice de Tablas

Tabla 1. Medios de cultivo empleados en cultivo y aislamiento	34
Tabla 2. Cepas de microalgas aisladas de los diferentes cuerpos de agua	44
Tabla 3. Porcentaje de transmitancia entre 400 y 750 nm, para cada uno de los	filtros
ensayados (papel celofán) con respecto al incoloro	78
Tabla 4. Anexo – Salidas estadísticas	148

#### Estudios ecofisiológicos en microalgas del sistema ácido Río Agrio -

# Lago Caviahue (provincia del Neuquén, Argentina)

## <u>Resumen</u>

Se realizaron aislamientos de 11 especies algales cocoides y filamentosas del Río Agrio-Lago Caviahue y del complejo termal Copahue (considerados ambientes extremos por su bajo pH y alta temperatura, respectivamente). Las especies se determinaron taxonómicamente al microscopio óptico y mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión. Las especies seleccionadas para los bioensayos (Keratococcus rhaphidioides, Pseudococcomyxa simplex y Watanabea caviahuensis) se llevaron a axenicidad. A cada una de ellas se les midió la tasa de fotosíntesis y se les determinó el óptimo de crecimiento en bioensayos con pH entre 2 y 7. El efecto de los nutrientes sobre el crecimiento algal se evaluó con dos fuentes de fósforo (fosfato y glicerofosfato), con distintas fuentes de nitrógeno (nitrato, nitrito, amonio, urea, leucina y ácido aspártico) y con distintas fuentes de carbono en luz y oscuridad (CO<sub>2</sub>, glucosa, acetato de etilo y urea). Las curvas de fotosíntesis revelaron que la irradiancia de saturación fue relativamente baja (100-200 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) así como el punto de compensación lumínica, mientras que el pH de crecimiento óptimo estuvo alrededor de 4. Con respecto a los nutrientes, el P no mostró mayores diferencias de crecimiento entre la fuente inorgánica y la orgánica, sin embargo con N las mayores densidades se obtuvieron con nitrato, urea y leucina. En cuanto al carbono, K. rhaphidioides lo incorporó principalmente de manera inorgánica (CO<sub>2</sub>) aunque fue capaz de crecer con fuentes orgánicas en presencia de luz. Fue notable que en oscuridad las células permanecieran en estado estacionario manteniendo constante la densidad a lo largo del experimento. K. rhaphidioides, la especie mayoritaria en biomasa y densidad del fitoplancton del lago Caviahue, mostró que no posee mecanismos de concentración de carbono, con lo que su tasa de fotosíntesis depende principalmente de la disponibilidad de CO<sub>2</sub> externo. Los hallazgos de laboratorio permitieron relacionar la distribución espacial y temporal de las especies estudiadas con las características ambientales observadas en el sistema ácido natural Río Agrio-Lago Caviahue.

#### Palabras clave: microalgas, acidófilas, pH, carbono, fósforo, nitrógeno

## Ecophysiological studies in microalgae isolated from the acidic system

# Río Agrio – Lago Caviahue (Neuquén Province, Argentina)

## <u>Abstract</u>

Eleven algal strains of cocoidal and filamentous habits, were isolated from the Rio Agrio-Lago Caviahue system. These environments are considered extreme due to its low pH and high temperature, respectively. The species were determined and characterized under light and electronic microscopy (SEM and TEM). Three strains were selected for the bioassays (Keratococcus rhaphidioides, Pseudococcomyxa simplex and Watanabea caviahuensis) and axenic cultures of these were obtained. The photosynthesis rate and optimal growth conditions were determined in bioassays with pH between 2 and 7. The effect of different nutrients was also addressed. Among them, two phosphorus sources (phosphate and glicerophosphate), six sources of nitrogen (nitrate, nitrite, ammonium, urea, leucine and aspartic acid) and four sources of carbon (CO<sub>2</sub>, glucose, etil-acetate and urea) were studied. The photosynthesis studies reveled that the light compensation point and irradiance saturation were low (100-200 µmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) while optimum pH was 4. Moreover, no significant differences were found for the growth with the different P sources, but for N, nitrate, urea and leucine yielded higher growth rates and cell densities. With regard to the carbon sources, K. *rhaphidioides* incorporated all the carbon sources under constant illumination, although the better growth parameters were obtained with CO<sub>2</sub>. Regardless of the source, no growth was registered in darkness, the algae were arrested for the whole experiment. K. rhaphidioides is the most abundant algal species of Lake Caviahue phytoplankton, in biomass and cell number. It was shown that this algae has no carbon concentrating mechanisms (CCM), reason why the photosynthesis rate depends only on the external CO<sub>2</sub> concentration. The laboratory findings of this thesys allowed to connect the seasonal and spatial distribution of the studied species with the environmental features of the Rio Agrio-Lake Caviahue system.

#### Keywords: microalgae, acidophilic, pH, carbon, phoshorous, nitrogen

A mi hijo Felipe y mi abuela Norma, extremos del amor.

A mi hermano Augusto, compinche incondicional del alma.

#### 1 <u>Agradecimientos</u>

Quiero agradecer en lo profesional a mis directores Gustavo Baffico y Mónica Diaz, que dedicaron su tiempo todas las veces que requerí de su atención, que me facilitaron todas los materiales y espacios que necesité y que me tuvieron mucha, mucha paciencia con todos los avatares que acontecieron a lo largo de estos cinco años.

A Fernando Pedrozo, director del grupo, que siempre se preocupó y se preocupa porque todos salgamos adelante con los planes, porque no nos falte nada, por leerme todas las presentaciones a las distintas instancias y dar siempre su opinión haciendo su aporte para que las cosas salgan bien.

A Juan Cabrera, "el compa", mi fiel compañero que me ayudó desde los comienzos de la tesis, que hicimos ambas tesis codo a codo, que a fuerza de trabajar juntos (miles de termos y unas cuantas birras), conseguimos una increíble amistad. Son innumerables las gauchadas y las manos que me ha dado.

A todo el grupo de Aguas: Guada, Pedro, Dani, Rubén, José, Romi, Xime (que está lejos) y Mayra (que recién llega), que estuvieron siempre que necesité ayuda, que me acompañaron en las largas horas de laboratorio, mates, almuerzos y alguna birra también.

A Pepe que acompañó todas las campañas, colaborando en todo, desde acarrear equipo hasta friccionarme los pies congelados y siempre con todo el ánimo y el mejor humor.

Al grupo de suelos: Paula, Patricia, Eli y Marina, con quienes filosofamos en la mesada y en los almuerzos, siempre colaborando con las dudas, los reactivos y algún que otro matraz. En este grupo quiero agradecerle especialmente a Marianita, con quien establecimos una muy linda amistad, que me ayudó con la bibliografía.

A Carlos Vélez que en los comienzos me enseñó las técnicas de aislamiento, cultivo y manejo de programas de imágenes, pero fundamentalmente supo transmitirme la pasión por estos pequeños seres verdes.

A Laura Lorenzo que cuando recién llegué al CRUB, me prestó la cámara de flujo laminar y el microscopio y el porta graduado.

A Alejandra Ruffini que siempre puso toda su voluntad a disposición para conseguir los reactivos y usar el microscopio del laboratorio de mediana complejidad.

A Claudio Lutterbeck, por todo el trabajo de gestión que representó, seguramente un esfuerzo extraordinario.

Quiero agradecer con mucho amor a mis viejos que me ayudaron desde la primera hora, que siempre estuvieron para apuntalarme, que me alentaron a más, a todo, que no dudaron de mi. Cada uno a su manera, compartiendo cosas distintas, pero ambos incondicionales. Gracias a mi papá que se sentó conmigo como cinco horas y me ayudó con las traducciones de las descripciones de las algas desde el alemán (¡Y eso que no le gustan las algas!).

A Felipe, mi hijito del alma que soportó estoicamente la carrera, el doctorado y la insondable distancia. Pero aquí está y sé que siempre me apoya incondicionalmente cuando desde su escuela primaria pregunta "¿Y cómo va la tesis, ma?".

A Augusto, mi hermano que siempre está toda su alegría y es mi absoluto compinche, con quien nos miramos y está todo dicho, que se juega por mi a ciegas y que siempre me dio toda la fuerza y el apoyo del mundo.

A mi abuela Norma y mi tío Néstor que confían ciegamente en mi, que me dieron todo cuanto pudieron de lo que llegara a necesitar y que festejamos cada mínimo logro como si fuera el descubrimiento de la pólvora y desde ya, nobleza obliga, un merecido brindis.

A Paula "mi mujer", que me apoyó en todo, que me hizo las compras, me ofreció su casa, su computadora, me esperó y me cocinó mil veces, me llamó a las 8 am para que me pusiera a laburar y no me quede dormida (me trepanó un poco el cráneo también, pero los agujeritos de la amistad, regeneran), me bancó los llantos y los malos humores del trabajo y del alma, con quien pasamos muy buenas y muy malas, pero que por sobre todas las cosas me honró con su amistad y me dio toda la fuerza y el apoyo sobre todo en el último tirón.

A Julián, "el Gato" que después de tantísimos años está al pie del cañón, que me prestó la silla mágica desde la que escribí toda la tesis, que me vino a buscar (como dice Charly, "que me de la inyección a tiempo, antes que se me pudra el corazón"), que me

sacó cuando no podía más y me ayudó a ordenarme cuando las prioridades se desbandaron, que mantiene toda su confianza y el cariño que me ayudó a volver a ser.

A Leo que cambió su salida al cerro Bastión, lugar ignoto y salvaje si los hay por el dictado de palabras para 6º grado de la escuela y siempre, siempre con su buen humor.

A la banda descontrolada: la Changa, JP, Ceci, Monty Phyton, Cacheda, Fato, Maca, Raca, el Negro, Rota y Nela, que me han hecho reír y aflojar mil tensiones, con quienes compartí muchas salidas, noches y días, que me han escuchado y han festejado conmigo, que como sea, siempre están. Especialmente quiero agradecerles a la Changa y JP, que me han buscado, llevado, traído y me han dado de comer, cuando el agotamiento no me dejaba ni hervir un arroz.

A Diego y AnaP que con absoluto conocimiento de causa, siempre ofrecieron todo lo que estuviera a su alcance para aportar.

A Anabella que me salvó con el mapa.

A Estela que siempre tuvo todo cuanto pudo a disposición, desde una cabeza de ajo hasta la compu y el rígido externo.

A todos quienes no estoy nombrando y sin embargo, siempre preguntaron por mi, por mi trabajo, que sé que me quieren y que comparten mis logros.

Agradezco en lo económico a la ANPCyT y CONICET que financiaron las dos instancias de beca (Inicial y Tipo II) que me permitieron hacer esta tesis.

Introducción General

# 2 Introducción General

#### 2.1 Los ambientes extremos

En nuestro planeta existe una gran diversidad de climas y ambientes y cada uno tiene asociada una biodiversidad que le es propia. Esta biodiversidad está dada por el conjunto de recursos y condiciones que ofrece cada ambiente. A medida que los recursos se hacen más escasos y las condiciones más inhóspitas, usualmente la biodiversidad disminuye. Cuando la diversidad de organismos que logra vivir y desarrollarse es mínima, podría decirse que ese ambiente es "extremo" y que dichos organismos son "extremófilos". Esto se apoya en el análisis que realizan Rothcshild & Mancinelli (2001) acerca de lo que representa un organismo extremófilo. Estos autores plantean tres aspectos filosóficos: 1. ¿Qué es "extremo"? Si las condiciones físicoquímicas que permiten la existencia de vida constituyen un *continuum*, todo lo que se ubique en los sectores más alejados de la media de dicho continuum y dificulte la supervivencia, representa un "extremo". 2. Un organismo extremófilo ¿Debe "amar" (de acuerdo con la etimología del término), el ambiente que habita o con ser tolerante es suficiente? Si bien la gran cantidad de organismos "extremófilos" descubiertos permiten ser estrictos en materia lingüística, es común que se incluya en esta denominación a los organismos "extremo-tolerantes". 3. Cuando se habla de un organismo extremófilo ¿Lo es en todas las facetas del ciclo de vida? Es sabido que las semillas, huevos y esporas suelen ser mucho más resistentes a condiciones extremas que las formas vegetativas y en general una estructura de resistencia no convierte en "extremófilo" al organismo en su forma vegetativa.

Los organismos extremófilos se encuentran asociados a una gran variedad de ambientes "extremos". Así, quienes se desarrollan a altas temperaturas (>80 °C) se

denominan termófilos, por ejemplo la bacteria Thermus aquaticus aislada de surgencias de aguas termales en el Parque Nacional Yellowstone (Brock & Freeze, 1969). Por el contrario, los organismos que poseen sus óptimos de crecimiento a temperaturas menores a 15 °C, se denominan psicrófilos. Un ejemplo extremo son los quironómidos del Himalava que viven a -18 °C (Kohshima, 1984). Otros ambientes extremos son los de alta presión como las Fosas Marianas y los organismos que se encuentran allí se llaman piezófilos, pudiendo crecer a 70 – 80 MPa pero no por debajo de 50 MPa (Rothschild & Mancinelli, 2001). La salinidad es otro factor que puede volverse extremo, aquí hay dos tipos de filias: osmófilos, que son los organismos que requieren de determinada presión osmótica para desarrollarse y halófilos, que requieren de una elevada salinidad en el medio, este requerimiento indefectiblemente incluye a la filia anterior, va que el exceso de salinidad en el medio implica una fuerte presión osmótica. Un ejemplo de estos organismos es Dunaliella salina (Rothschild & Mancinelli, 2001). Los organismos que toleran la desecación se los conoce como xerófilos y en algunas ocasiones deben protegerse también de la radiación solar. A los organismos que viven en condiciones extremas de pH se los denomina alcalófilos o acidófilos de acuerdo al pH del medio en el que se desarrollan (alto o bajo, respectivamente). En esta tesis nos ocuparemos de los últimos.

Los ambientes acuáticos ácidos están ampliamente distribuidos en el planeta, y su origen puede ser antrópico, por lluvia ácida o actividad minera, ó natural, por ejemplo debido a la actividad volcánica (Brock, 1978; Albertano, 1995). Son ejemplo de cuerpos de agua acidificados por actividad antrópica los lagos de la región de Ontario en Canadá (Beamish, 1976) y Noruega (Wright & Henriksen, 1978), los lagos ácidos de mina de Alemania en la región de Lusatia (Nixdorf *et al.*, 1998) y el río Tinto en España (Fernández-Remolar *et al.*, 2005). Y como ejemplo de ambientes ácidos naturales se

puede citar el lago Ijen en Indonesia (Delmelle & Bernard, 1994), el Parque Nacional Yellowstone en USA (Allen & Day, 1935), el lago Usoriko en Japón (Satake *et al.*, 1995), los lagos ácidos salinos del sudeste australiano (Benison *et al.*, 2007) y la cuenca influenciada por el volcán Copahue en la Patagonia Argentina, que es donde se sitúa este trabajo.

## 2.2 Los microorganismos extremófilos

El estudio de los microorganismos que habitan en ambientes extremos se ha ido incrementado significativamente durante los últimos años. Una razón es la idea de que son representativos de las formas de vida arcaicas que debieron enfrentar las características propias de la superficie terrestre en etapas tempranas de la vida en nuestro planeta (Johnson, 1998; Javaux, 2006). Otra razón para su estudio es la búsqueda de aplicaciones como fuente de enzimas u otros productos celulares con una gran variedad de aplicaciones en investigación, en procesos industriales y en biotecnología. Por ejemplo, la enzima térmicamente estable DNA (Taq) polimerasa utilizada en la técnica de PCR, fue aislada originalmente de la bacteria termófila Thermus aquaticus (Brock & Freeze, 1969; Chien et al., 1976). Con respecto a las microalgas, las aplicaciones biotecnológicas más conocidas son la extracción de astaxantina, un pigmento con gran poder antioxidante empleado en la industria farmacéutica y alimentaria, a partir del alga verde unicelular cocoide Haematococcus pluvialis (Olaizola, 2000). Pero hay otros ejemplos como la producción de biomasa de especies oleaginosas para la producción de biodiesel, la producción de alcohol o de papel a partir de la celulosa de las paredes celulares, la producción de caucho empleando polvo de algas verdes como aditivo de la mezcla que se utiliza en la fabricación de neumáticos y la alimentación animal con el *pellet* resultante de diversos procesos (Chisti, 2007; 2008; Carrasco, 2008; Mata et al., 2010).

En el caso de los ambientes extremos ácidos, es posible realizar una diferenciación de los organismos que los habitan: "acidófilo extremo" a aquel que tiene su óptimo de crecimiento a (o por debajo de) pH 3, "moderadamente acidófilo" cuando el óptimo de crecimiento se encuentre entre 3 y 5 y "ácidotolerante" para los casos en los que si bien el pH óptimo está por encima de 5, sobrevive a valores menores; de acuerdo con el criterio de Johnson (2008).

Aunque en los ambientes ácidos la biodiversidad es baja, están citados representantes de varios grupos taxonómicos. Así por ejemplo es posible encontrar entre los microorganismos heterótrofos a macroinvertebrados (dípteros, coleópteros, heterópteros, ácaros acuáticos), rotíferos, protozoos (flagelados y ciliados), hongos filamentosos, levaduras y varias especies de bacterias (Johnson, 1998; Sabater *et al.*, 2003). Los autótrofos, en cambio se encuentran representados en su mayor parte por microalgas, tanto de hábito cocoide como filamentoso y es posible encontrar típicamente representantes de Bacillariophyta, Chlorophyta, Rhodophyta, Euglenophyta y Cyanobacteria (Johnson, 1998; Pedrozo *et al.*, 2001; Sabater *et al.*, 2003).

## 2.3 Los nutrientes en ambientes ácidos

En los ambientes extremos ácidos iluminados, la producción primaria puede estar mediada por fotótrofos acidófilos. La mayoría son microalgas eucariotas, que incluyen formas filamentosas o unicelulares (Johnson, 1998) y poseen adaptaciones para evitar que las altas concentraciones de protones destruyan a las células (baja permeabilidad en la membrana plasmática, alta capacidad buffer interna, etc.) (Pick, 1999). Pero además, las altas concentraciones de protones favorecen la solubilidad o asociaciones particulares de los diferentes elementos, que pueden modificar su biodisponibilidad.

Una de estas modificaciones en la biodisponibilidad que afecta a los organismos

autótrofos, es la baja concentración de carbono inorgánico disuelto (CID) para la fotosíntesis (Schindler & Holmgren, 1971; Nixdorf *et al.*, 1998). Por ejemplo, muchas de las generalizaciones respecto a la limitación por C provienen de estudios en lagos acidificados por lluvia ácida o minería (Stumm & Schnoor, 1995). A valores bajos de pH (< 4), el carbono inorgánico disuelto sólo está presente como CO<sub>2</sub> molecular y ácido carbónico, y su concentración no debería exceder los 0,31 mg C l<sup>-1</sup> (0 °C y a nivel del mar) si solo estuviera regulado por la ley de Henry (Mackereth *et al.*, 1978). Sin embargo, Satake & Saijo (1974), realizaron mediciones de CID en ambientes ácidos encontrando concentraciones superiores a las esperadas debido a la respiración de organismos heterotróficos (bacterias, hongos). Otra consecuencia de la acidez es que la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) es relativamente baja (< 20 mg l<sup>-1</sup>) debido a las reacciones fotoquímicas que transforman la materia orgánica disuelta oxidándola a CO<sub>2</sub> y que finalmente se pierde a través del epilimnion como gas (Friese *et al.*, 2002).

En el caso del fósforo (P) pueden ocurrir dos procesos: 1. que el pH del ambiente se encuentre por debajo de 3,5 y entonces, en presencia de oxidación de pirita el P esté sujeto a una serie de reacciones que favorecen su solubilidad dejándolo biodisponible (Geller *et al.*, 1998) y 2. que el pH sea mayor a 3,5 entonces precipitan oxihidróxidos de Fe, que secuestran P disuelto (Wetzel, 2001), lo que lleva a una menor biodisponibilidad para las algas (Tate *et al.*, 1995). Sin embargo esto puede verse afectado por la luz, ya que el Fe en su estado reducido (Fe II) es capaz de oxidarse (Fe III) secuestrando iones  $PO_4^{3-}$ , pero en presencia de radiación solar se genera un proceso de fotorreducción con la consecuente liberación de iones  $PO_4^{3-}$  quedando nuevamente biodisponibles para las algas (Tate *et al.*, 1995; Niyogi *et al.*, 1999).

Con respecto al N, la nitrificación está inhibida a bajo pH con lo cual la principal

forma inorgánica esperable del N en condiciones ácidas será el ion amonio (Schindler *et al.*, 1985).

# 2.4 La nutrición en los microorganismos fotosintéticos

El modo predominante de nutrición de las algas, como todos los organismos fotosintéticos, es la autotrofia, es decir la síntesis mediada por luz de compuestos orgánicos a partir de moléculas inorgánicas (Wetherell, 1958), y las algas que habitan en ambientes ácidos no son la excepción.

Debido a la baja disponibilidad de C en ambientes ácidos, se sabe que algunas especies de algas acidófilas poseen eficientes mecanismos para incorporar CO<sub>2</sub> (Diaz & Maberly, 2009). Son llamados mecanismos de concentración de carbono (Carbon Concentration Mechanisms, CCMs) y favorecen la carboxilación fotosintética por la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) y minimizan su actividad oxidasa (Raven, 1997; Colman et al., 2002). Así la presencia de CCMs explicaría el ingreso al ecosistema, vía fotosíntesis oxigénica de CID en contra de gradiente.

Asimismo, algunas microalgas poseen la capacidad de utilizar COD o carbono orgánico particulado (COP) como fuente de energía (Neilson & Lewin, 1974; Rivkin & Putt, 1987), por lo que esta adaptación les permite contrarrestar la limitación por CID . Según la descripción de los tipos de nutrición propuesta por Neilson & Lewin (1974), serían organismos mixótrofos, es decir que combinan estrategias de auto y heterotrofía. A su vez, las estrategias de heterotrofía se clasifican de acuerdo a la forma del C orgánico que es incorporado en osmotrofía para COD y fagotrofía para COP. Así, Tittel *et al.* (2003 y 2005) observaron mixotrofía en algunas especies de los géneros *Chlamydomonas* y fagotrofía en el de *Ochromonas*. En dichos lagos los picos

de clorofila en profundidad se explicaron por el comportamiento mixotrófico del fitoplancton (Tittel *et al.*, 2003).

Nixdorf *et al.* (2001), plantearon en su trabajo que los organismos mixótrofos son comunes en los lagos ácidos de mina. Por otra parte Tilzer *et al.* (1977) proponen la mixotrofia dentro de algunos posibles mecanismos para la supervivencia del fitoplancton bajo condiciones afóticas. Además estos autores sugieren en el mencionado trabajo, otras estrategias que incluyen fotosíntesis en intensidades lumínicas muy bajas y reducción del metabolismo, por lo cual los procesos catabólicos son más lentos.

#### 2.5 <u>Área de estudio</u>

El Río Agrio y el Lago Caviahue se encuentran localizados en el Parque Provincial Copahue–Caviahue (37° 53' S; 71° 02' W), Departamento de Ñorquín, Provincia del Neuquén, Argentina. El volcán Copahue es un estrato volcán y tanto el Río Agrio como el Lago Caviahue están localizados en una gran caldera de 20 x 15 km (Figura 1) formada por el complejo efusivo Copahue-Caviahue durante el Plioceno-Holoceno (Pesce, 1989). El cono del volcán es el punto más alto de la cuenca y posee un pequeño lago de cráter que se alimenta por el deshielo del glaciar que lo rodea y las precipitaciones, por lo tanto su nivel y su composición fluctúan de acuerdo a la estación del año y la actividad volcánica (Gammons *et al.*, 2005).

Los materiales predominantes en la cuenca son la andesita y la lava piroclástica (Pesce, 1989). Sin embargo, los sedimentos del lago presentan un enriquecimiento en SiO<sub>2</sub> respecto de la composición promedio de la andesita (Temporetti *et al.*, 2013).



Figura 1 Mapa satelital de Caviahue-Copahue. Se observa el volcán Copahue y el lago Caviahue dentro de la caldera volcánica (delimitada por la línea de puntos). Imagen, cortesía de Anabella Fantozzi.

El Lago Caviahue (Figura 2) se encuentra localizado a 1600 m s.n.m., es de origen glaciar y posee las siguientes características: largo de 9,7 km, ancho máximo de 4,7 km, perímetro de 22,3 km, área total de 9,2 km<sup>2</sup>, volumen total de 0,47 km<sup>3</sup> y un tiempo de residencia del agua de 2,6 años (Rapacioli, 1985). El lago tiene forma de herradura con dos brazos (Norte –BN– y Sur –BS–) de 90 y 70 m de profundidad respectivamente y dos afluentes mayoritarios, el Río Dulce y el Río Agrio Superior (RAS) (Figura 3).



Figura 2 Panorámica del Lago Caviahue desde la naciente del Río Agrio Superior. Foto: Juan Cabrera, 2015.

El Río Dulce, es un río de deshielo que llega al lago con un pH = 6,5 mientras que el

RAS posee un rango de pH entre 0,80 a 2,20 desde su naciente hasta su desembocadura en el lago. Este último nace a 2740 m s.n.m. en la ladera este del Volcán Copahue con una temperatura de 82°C y una conductividad de 560 mS cm<sup>-1</sup> (Pedrozo et al., 2002). A lo largo de sus 12 km de recorrido recibe tres afluentes principales, el Río Jara, el Rojo y el Blanco (Pedrozo et al., 2008). Todos presentan variaciones de caudal estacionales y diarias (dependiendo de la estación) dado que los afluentes más pequeños se congelan durante las frías noches de invierno. Se presume que estos ríos también tienen su origen en surgencias volcánicas debido a su carácter ácido, aunque con pH mayor que el del RAS y menor carga de sólidos disueltos. Por ejemplo, el Río Rojo nace a pH 4,26 y su cuenca debe su color a la precipitación de óxidos de hierro. Estos afluentes también alimentan y atraviesan mallines cargándose de materia orgánica disuelta que acabará por llegar al lago (Cabrera, com. pers.). Tanto el Río Agrio Superior como el Dulce descargan en el BN, aunque el RAS lo hace muy cerca de la confluencia de ambos brazos (Figura 3). El RAS le confiere al lago su carácter ácido, que se evidencia en su bajo pH=2,2-3 (en los últimos 15 años), alta conductividad de 1600 µS cm<sup>-1</sup> y altas concentraciones de diversos elementos como: P ( $210 - 240 \mu g l^{-1}$ ), Fe ( $20 m g l^{-1}$ ), Al (27mg l<sup>-1</sup>), Mn (1 mg l<sup>-1</sup>), Cl (95 mg l<sup>-1</sup>), F (6,7 mg l<sup>-1</sup>), Si (17 mg l<sup>-1</sup>), SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (400 mg l<sup>-1</sup>), Na (14 mg l<sup>-1</sup>), K (6 mg l<sup>-1</sup>), Ca (22 mg l<sup>-1</sup>) y elementos traza (Pedrozo et al., 2001, Pedrozo et al., 2008, Varekamp 2008). Todas estas concentraciones son relativamente altas cuando se las compara con las de otros lagos andino-patagónicos oligotróficos y neutros (Diaz et al., 2007). La alta carga de elementos disueltos en el RAS se debe a la alta solubilidad de los metales al bajo pH que posee el sistema (Pedrozo et al., 2001).



Figura 3 Mapa de la cuenca. En el lago se indican con números los sitios de muestreo, 1) Brazo Sur,
2) Centro y 3) Brazo Norte. Se observa el río Agrio Superior desde las nacientes hasta la desembocadura en el lago y el río Agrio Inferior en el tramo que va desde la naciente en el lago hasta la confluencia con el río Ñorquín. Mapa cortesía de Gustavo Baffico.

El efluente del sistema es el Río Agrio Inferior (RAI) que posee un pH levemente superior a 3 en su naciente. Hasta el punto de su neutralización este río recibe dos tributarios principales, el Río Trolope y el Río Ñorquín (40 km río abajo) y finalmente confluye con el Río Neuquén 200 km río abajo, recibiendo varios tributarios más a lo largo de su recorrido. A medida que el RAI recibe los tributarios y va incrementando su pH alcanza el umbral de precipitación del hierro (pH~3,50) y el de aluminio (pH~5,00) produciendo coloraciones naranja y blanco en su cauce, debido a los oxihidróxidos de hierro y óxidos de aluminio respectivamente (Gammons *et al.*, 2005; Varekamp *et al.*, 2009).

Con respecto a la luz, el lago presenta características ópticas particulares. Si bien su coeficiente de atenuación es comparable con lagos someros que poseen una alta cantidad de materia orgánica disuelta, Caviahue es un lago profundo y con baja concentración de COD (Beamud *et al.*, 2007; Baffico, 2013). Si se lo compara con otros lagos del norte patagónico, Caviahue presenta una alta atenuación de la luz tal que el la

máxima profundidad de penetración de la luz se encontró alrededor de los 13 m de profundidad en el rango de 544–577 nm. El resto del espectro visible se extingue a los 1,7, 10, 9 y 4,8 m para 400, 500, 600 y 700 nm, respectivamente (Baffico, 2013).

Térmicamente se trata de un lago monomíctico, el agua de superficie puede alcanzar 18 °C y la termoclina se encuentra alrededor de los 35 m de profundidad (Varekamp, 2008), aunque en las mediciones de Beamud *et al.* (2010) el metalimnion se extiende desde los 10 a los 35 m. El período de mezcla ocurre en los meses de invierno (Varekamp, 2008; Beamud *et al.*, 2010). Durante la estratificación la superficie del lago se encuentra sometida a fuertes vientos, casi diariamente, que ocasionan cierto grado de homogeneización de la columna de agua, sin embargo dicha estratificación es rápidamente restaurada (Varekamp, 2008). En cuanto a las especies químicas disueltas, el lago se comporta como un sistema holomíctico, pese a ser monomíctico con respecto a la temperatura (Varekamp, 2008).

Nutricionalmente, este sistema se caracteriza por tener baja concentración de CID (Beamud *et al.*, 2007) ya que la acidez sólo permite CO<sub>2</sub> como única forma de CID y es esperable que se encuentre en equilibrio con la concentración atmosférica (Mackereth *et al.*, 1978). Como se indicó más arriba, también la concentración de COD es baja (Beamud *et al.*, 2007). En cuanto al P, se distinguen dos sectores: RAS y lago con pH < 3,5 y RAI, que luego del aporte del Trolope su pH es > 3,5 (Baffico, 2010). La biodisponibilidad es mayor en el RAS y en el lago (Pedrozo *et al.*, 2001), pero debido a la relación entre el P, el Fe y la luz, en el RAI la biodisponibilidad es menor (Parker *et al.*, 2008; Baffico, 2010). El N está caracterizado como el nutriente más escaso, ya que la acidez impide los procesos de nitrificación, encontrándose principalmente como NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y su concentración es baja (Beamud *et al.*, 2007).

Dentro de la gran caldera Copahue-Caviahue se encuentra el Complejo Termal Copahue ubicado 18 km al norte del lago Caviahue y a 2010 m. s.n.m. Este complejo posee diferentes surgencias termales, algunas formando lagunas, con características fisicoquímicas contrastantes. Es un centro especializado en la atención de pacientes con diversas afecciones, a través de terapias en las que se emplea tanto el agua como los barros y las algas que crecen en dichas lagunas. La actividad del complejo es temporaria, desde diciembre a mayo, y los meses restantes la localidad se encuentra inmersa en la nieve (Monasterio, 2008).

#### 2.6 Los microorganismos del río Agrio-lago Caviahue

Debido a las condiciones ambientales extremas es esperable una baja diversidad de organismos (Whitton & Diaz, 1981; Blouin, 1989; Lessman *et al.*, 2000). El Sistema del Río Agrio y Lago Caviahue ha sido objeto de estudio desde el año 1998 habiendo realizado Pedrozo *et al.* (2001) la primera descripción limnológica de esta cuenca y su posterior seguimiento abarcando sendos períodos pre y posteruptivo del Volcán Copahue (Pedrozo *et al.*, 2002). En las muestras recolectadas en la zona de Caviahue durante campañas previas, se registró la presencia de las siguientes microalgas: *Euglena mutabilis, Keratococcus rhaphidioides, Chlamydomonas* sp., *Pseudococcomyxa* sp., *Watanabea* sp. y *Ulothrix* sp. y una única especie de rotífero del género *Philodina* sp. (Pedrozo *et al.*, 2001; Beamud *et al.*, 2007). La diversidad fitoplanctónica encontrada en el lago Caviahue es baja y la mayoría de las especies microalgales pertenecen al grupo de las Chlorophyta, siendo *Keratococcus rhaphidioides* (Hansgirg) Pascher la especie dominante (abundancia > 90%, Beamud *et al.*, 2007). Con respecto al único representante del zooplancton es importante mencionar que no se alimenta de las microalgas presentes en el lago Caviahue (Beamud, 2009).

La taxonomía de las especies algales de este sistema, involucra grupos particularmente complejos. Por ejemplo, los géneros *Keratococcus* y *Pseudococcomyxa* pertenecen a la clase Trebouxiophyceae (Chlorophyta), la cual, aunque bien separada filogenéticamente de las otras clases, aún mantiene sin resolver su circunscripción y estructura filogenética interna (Friedl y Rybalka, 2012). En el caso de las Chlorophyta filamentosas simples como *Ulothrix* (Ulvophyceae), resulta muy difícil de separar por microscopía óptica, de géneros como *Uronema* (Chlorophyceae) y *Klebsormidium* (Charophyceae) como han notado varios autores (*cf.* Novis, 2006). Debido a que sus caracteres con valor taxonómico tradicionales no son convergentes, se hace imprescindible el uso de técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) y técnicas moleculares de identificación.

# 2.7 Naturaleza del aporte original proyectado

El estudio ecofisiológico de las especies de microalgas de este sistema con características tan particulares, cobra importancia debido a que se trata de un ambiente natural y la mayoría de los estudios de organismos acidófilos han sido realizados en lagos acidificados por minería (Spijkerman, 2008). Por otra parte, es original el hecho de trabajar con las especies aisladas en cultivo, debido a que hay muy pocos antecedentes de estudios experimentales de laboratorio sobre aspectos nutricionales, de crecimiento y fisiológicos de estas microalgas extremófilas.

# 2.8 **Objetivos generales**

Estudiar las respuestas fisiológicas de cepas microalgales seleccionadas del sistema ácido Río Agrio - Lago Caviahue, particularmente aspectos nutricionales relacionados con la incorporación y asimilación de C, N y P, cuya biodisponibilidad podría verse afectada debido a las condiciones ambientales extremas.

# 2.9 **Objetivos particulares**

 Aislar y determinar taxonómicamente especies microalgales recolectadas en el sistema Río Agrio – Lago Caviahue.

2. Estudiar en cultivo las condiciones óptimas de crecimiento (pH, luz, temperatura) y seleccionar cepas.

3. Estudiar la utilización de distintas fuentes de macronutrientes (C, N y P), tanto inorgánicas como orgánicas.

4. Evaluar la relación entre las características fisiológicas observadas en laboratorio con la distribución de las especies en el sistema espacio-temporal, la abundancia, las condiciones naturales y parámetros medidos *in situ*.

# 2.10 Hipótesis

1. Las algas del sistema río Agrio – lago Caviahue son acidófilas.

- Las algas del sistema río Agrio lago Caviahue se encuentran adaptadas a las condiciones de rápida extición de la luz del ambiente.
- 3. Las algas del sistema río Agrio lago Caviahue son microorganismos autótrofos estrictos por lo tanto el C, N y P son incorporados de manera inorgánica.

26

Materiales y Métodos Generales

# 3 Materiales y Métodos Generales

En esta sección se detallan los materiales y métodos comunes a todos los ensayos realizados a fin de simplificar la lectura de los capítulos.

#### 3.1 <u>Cultivos</u>

Se trabajó en todos los casos con tres réplicas y las tareas de aislamiento y siembra de inóculos fueron realizadas en esterilidad, para ello se utilizó una cámara de flujo laminar horizontal CASIBA. Tanto los cultivos como los bioensayos que requirieron una temperatura diferente de la presente en el ambiente, se realizaron utilizando una cámara de cultivo Neo Line con control de temperatura y con luz continua de distintas intensidades. Durante los bioensayos, los cultivos se rotaron periódicamente. Cada caso particular se especifica en su sección correspondiente.

Los medios de cultivo y los materiales de vidrio empleados en la preparación y cultivos, se esterilizaron por autoclavado durante 30 minutos a 120°C.

#### 3.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados durante la etapa de aislamiento se listan en la Tabla 1. Para la mayoría de los bioensayos se empleó el medio de cultivo denominado 7L+ μ(A) que se trata de una modificación del medio A (Hill, 1970).

El pH de los medios se ajustó cuando fue necesario. En la mayoría de los casos, debido a que los micronutrientes son una solución ácida, no se requirió tal ajuste, ya que el pH resultante era aproximadamente 3 y se simbolizó con el agregado de "CS" a la denominación del medio de cultivo (*i.e.* 7LCS +  $\mu$ (A)). Cuando se ajustó el pH, esto se realizó agregando NaOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En todos los casos el pH fue medido con un pHmetro (Orion 920 A) previamente calibrado con buffers conocidos.

Para los medios agarizados se agregó ágar 1,5 % m/v al medio mineral. Cuando el pH del medio era menor a 5, para lograr la solidificación del ágar, se preparó la solución mineral con el doble de concentración por un lado y el ágar con agua por otro, se esterilizaron ambas soluciones y se dejaron enfriar. Cuando el ágar alcanzó la temperatura de "*melting point*" se mezclaron.

### 3.3 <u>Recuentos celulares</u>

Los recuentos celulares se realizaron por el método de Utermöhl (1958). Consiste en colocar en una cámara de decantación, con superficie conocida, un determinado volumen de muestra (cultivo, en este caso), dejar decantar el tiempo necesario para que no haya células en suspensión (toda una noche) y contar en microscopio invertido la cantidad de células de cada especie presente por campo o transectas a lo largo de la cámara. Luego se calculó la densidad celular (D) de la muestra aplicando la siguiente fórmula:

$$D = \frac{N_{c\acute{e}l} x S_{c\acute{a}mara} x V_{mtra}}{N_{campos} x S_{campo}}$$
(1)

Donde:

- N<sub>cél</sub>: número de células contadas
- S<sub>cámara</sub>: superficie de la cámara
- V<sub>mtra</sub>: volumen de la muestra tomado
- N<sub>campos</sub>: número de campos contados
- S<sub>campos</sub>: superficie del campo

Los recuentos se realizaron con microscopio invertido Leica DMIL Led.

#### 3.4 Medición de fluorescencia *in vivo*

Se realizaron mediciones de fluorescencia *in vivo* (FIV) a fin de monitorizar el desarrollo de los cultivos empleando un fluorímetro digital (modelo 10-AU, Turner Designs) equipado con un kit óptico 10-037R (Turner Designs).

## 3.5 <u>Tasa de crecimiento</u>

A partir de los datos de densidad celular o de fluorescencia *in vivo* de los cultivos, se calcularon las tasas de crecimiento (r) como:

$$r = \frac{\log C_f - \log C_i}{t} \tag{2}$$

Donde

- *C<sub>i</sub>* es la densidad celular o fluorescencia *in vivo* del cultivo del día a partir del que se toma la tasa de crecimiento
- *C<sub>f</sub>* es la densidad celular o fluorescencia *in vivo* del cultivo del día final para la medición de la tasa
- *t* es el tiempo transcurrido (en días) entre las mediciones

Las tasas se calcularon para los días en los que se desarrolló la fase exponencial de las curvas de crecimiento.

#### 3.6 Concentración de clorofila a

La concentración de clorofila a se determinó siguiendo la metodología de APHA (1992): se filtró un volumen conocido de muestra con filtros de fibra de vidrio (tipo Whatman GF/F, aprox. 0,7 µm de diámetro de poro), que fueron doblados a la mitad (con el filtrado hacia dentro), envueltos en papel de aluminio y preservados en freezer hasta la extracción. Para ello se colocó cada filtro en un tubo de centrífuga de 15 ml y se

agregaron 7 ml de acetona 90%. Se los dejó toda la noche en heladera (4°C) y en oscuridad. Luego se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos y se midió la absorbancia o la fluorescencia del sobrenadante, con un espectrofotómetro (Metrolab) o con fluorímetro digital (modelo 10-AU, Turner Designs) equipado con un kit óptico 10-037R (Turner Designs). Las mediciones se realizaron antes y 90 segundos después del agregado de 170  $\mu$ l de HCl 0,12 N, con el fin de diferenciar clorofila *a* de feopigmentos (APHA, 1992).

La cantidad de clorofila *a* determinada con espectrofotómetro, se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$Clorofila a = \frac{26,7.A_{665b}.A_{665a}.Vol_{extracto}}{Vol_{filtrado}.long_{celda}}$$
(3)

Donde:

- 26,7: coeficiente de absorción específica de la clorofila en una solución de acetona 90%
- A<sub>665b</sub>: Absorbancia a 665 nm antes de acidificar (descontada la absorbancia a 750 nm)
- A<sub>665a</sub>: Absorbancia a 665 nm después de acidificar (descontada la absorbancia a 750 nm).

Cuando la medición se realizó con fluorímetro, la fórmula empleada fue:

$$Clorofila \, a = Fs \, \cdot \frac{r}{r-1} \, \cdot \left(R_b - R_a\right) \, \cdot \frac{Vol_{extracto}}{Vol_{filtrado}} \tag{4}$$

Donde:

- Fs: factor de sensibilidad del equipo
- r: relación entre antes y después de acidificar una solución pura de clorofila

- R<sub>b</sub>: fluorescencia del extracto antes de acidificar
- R<sub>a</sub>: fluorescencia del extracto después de acidificar.

# 3.7 <u>Biovolumen</u>

En el caso de *Keratococcus rhaphidioides* se trabajó con biovolumen en varios ensayos. Para calcularlo, se tomaron fotografías al microscopio invertido de las alícuotas tomadas para recuento celular. Se utilizó una cámara de fotos digital Cannon. Para ello se estableció primero una equivalencia de tamaños entre pixeles y longitudes (µm), fotografiando un portaobjetos graduado. Dicha equivalencia se estableció procesando las imágenes con el programa Adobe Photoshop<sup>®</sup>. Luego en las fotos, se midieron 10 células de cada réplica y se calculó el biovolumen según el método de aproximación a formas geométricas de Hillebrand *et al.* (1999). La forma más afín con esta especie es la medialuna y su volumen (V) se calculó con la siguiente fórmula:

$$V = \frac{d^2}{8} \cdot (2b - d + a) \cdot (\frac{\pi^2}{6} + 1)$$
(5)

Las dimensiones a determinar para el empleo de la ecuación (5) se esquematizan en la Figura 4.



# 3.8 Análisis estadísticos

En todos los experimentos las diferencias entre tratamientos se analizaron por medio de ANOVA de una vía, previa comprobación de los supuestos de normalidad. *A posteriori* se compararon las medias con el test de comparaciones múltiples de Bonferroni para detectar grupos homogéneos. Cuando p < 0,05, se rechazaron las hipótesis nulas. Estos análisis fueron realizados con el programa InfoStat y las salidas del programa se encuentran en el anexo.

	A	A15L N	7L	7L/2	7L/4	7L/8	С	C NH4 <sup>+</sup>	Satake	Allen	Allen NO3 <sup>-</sup>	BG11
Macronutrientes												
NaNO <sub>3</sub>												1,7E <sup>-2</sup>
KNO3	2,0E <sup>-2</sup>	1,5E <sup>-3</sup>	1,0E <sup>-3</sup>	5,0E <sup>-4</sup>	2,5E <sup>-4</sup>	1,3E <sup>-4</sup>	1,0E <sup>-4</sup>		1,5E <sup>-3</sup>		5,0E <sup>-6</sup>	
$Ca(NO_3)_2$							6,4E <sup>-4</sup>	6,4E <sup>-4</sup>	7,5E <sup>-4</sup>			
(NH4)2SO4								1,0E <sup>-3</sup>		1,0E <sup>-5</sup>	5,0E <sup>-6</sup>	
CaCl <sub>2</sub>	5,0E <sup>-4</sup>	5,0E <sup>-4</sup>	2,5E <sup>-5</sup>	1,3E <sup>-5</sup>	6,3E <sup>-6</sup>	3,1E <sup>-6</sup>				5,0E <sup>-7</sup>	5,0E <sup>-7</sup>	2,5E <sup>-4</sup>
MgSO <sub>4</sub>	1,0E <sup>-3</sup>	1,0E <sup>-3</sup>	5,0E <sup>-4</sup>	2,5E <sup>-4</sup>	1,3E <sup>-4</sup>	6,3E <sup>-5</sup>	1,6E <sup>-4</sup>	1,6E <sup>-4</sup>	1,6E <sup>-4</sup>	1,0E <sup>-6</sup>	1,0E <sup>-6</sup>	3,1E <sup>-4</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>										2,0E <sup>-6</sup>	2,0E <sup>-6</sup>	2,3E <sup>-4</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0E <sup>-3</sup>	1,0E <sup>-3</sup>										
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			1,0E <sup>-4</sup>	5,0E <sup>-5</sup>	2,5E <sup>-5</sup>	1,3E <sup>-5</sup>						
Na <sub>2</sub> -							1.6E <sup>-4</sup>	1.6E <sup>-4</sup>	2 3E <sup>-4</sup>			
glicerofosfato							1,02	1,02	2,51			
Iris base							4,1E-3	4,1E-3				
Na <sub>2</sub> EDTA							8 1 E <sup>-6</sup>	81E <sup>-6</sup>	1 5E <sup>-6</sup>			2 7E <sup>-6</sup>
Fe-Na-FDTA							0,112	0,112	1,51	7 2E <sup>-8</sup>	7.2E <sup>-8</sup>	2,712
N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>2</sub>	4 0E <sup>-5</sup>	4 0E <sup>-5</sup>	1 0E <sup>-5</sup>	5.0E <sup>-6</sup>	2 5E <sup>-6</sup>	1 3E <sup>-6</sup>				7,20	7,21	
FeSO4	1.0E <sup>-5</sup>	1.0E <sup>-5</sup>	2.5E <sup>-6</sup>	1.3E <sup>-6</sup>	6.3E <sup>-7</sup>	3.1E <sup>-7</sup>						
FeCla	1,01	1,01	2,51	1,51	0,51	5,12	2 2E <sup>-6</sup>	2.2E <sup>-6</sup>	2 7E <sup>-7</sup>			2 1E <sup>-5</sup>
H <sub>2</sub> BO <sub>2</sub>			2.4E <sup>-5</sup>	1 2E <sup>-5</sup>	6.0E <sup>-6</sup>	3 0E <sup>-6</sup>	2,212	2,21	2,712	4 7E <sup>-8</sup>	4 7E <sup>-8</sup>	2,12 4 5E <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	2.0E <sup>-6</sup>	2.0E <sup>-6</sup>	5.0E <sup>-7</sup>	2.5E <sup>-7</sup>	1.3E <sup>-7</sup>	6.3E <sup>-8</sup>				7.7E <sup>-10</sup>	7.7E <sup>-10</sup>	7.7E <sup>-7</sup>
ZnCl2	_,	_,•	-,	_,	- ,	- ,	2.3E <sup>-7</sup>	2.3E <sup>-7</sup>	2.8E <sup>-8</sup>	,,,_	,,,	,,,
MnCl	2.0E <sup>-6</sup>	2.0E <sup>-6</sup>	5.0E <sup>-7</sup>	2.5E <sup>-7</sup>	1.3E <sup>-7</sup>	6.3E <sup>-8</sup>	5.5E <sup>-7</sup>	5.5E <sup>-7</sup>	1.6E <sup>-7</sup>	9.0E <sup>-9</sup>	9.0E <sup>-9</sup>	9.2E <sup>-6</sup>
Na2MoO4	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	, -	- ) -	<u>y</u> -	<u>y</u> -	- 9-	1.6E <sup>-7</sup>	1.6E <sup>-7</sup>	1.2E <sup>-8</sup>	- ) -	- ) -	- )
(NH4)6M07O24	2,8E <sup>-7</sup>	2,8E <sup>-7</sup>	7,0E <sup>-8</sup>	3,5E <sup>-8</sup>	1,8E <sup>-8</sup>	8,8E <sup>-9</sup>	,			1,1E <sup>-9</sup>	1,1E <sup>-9</sup>	1,4E <sup>-6</sup>
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	2,4E <sup>-5</sup>	2,4E <sup>-5</sup>	-	-	-	-				-	-	-
CuSO <sub>4</sub>	2,0E <sup>-6</sup>	2,0E <sup>-6</sup>	5,0E <sup>-7</sup>	2,5E <sup>-7</sup>	1,3E <sup>-7</sup>	6,3E <sup>-8</sup>				3,2E <sup>-10</sup>	3,2E <sup>-10</sup>	3,2E <sup>-7</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>												1,4E <sup>-7</sup>
CoCl <sub>2</sub>	2,0E <sup>-6</sup>	2,0E <sup>-6</sup>	5,0E <sup>-7</sup>	2,5E <sup>-7</sup>	1,3E <sup>-7</sup>	6,3E <sup>-8</sup>	5,1E <sup>-8</sup>	5,1E <sup>-8</sup>	6,3E <sup>-9</sup>			
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>										2,0E <sup>-10</sup>	2,0E <sup>-10</sup>	
Vitaminas												
Tiamina (B1)							3,0E <sup>-8</sup>	3,0E <sup>-8</sup>	3,0E <sup>-8</sup>	3,0E <sup>-8</sup>	3,0E <sup>-8</sup>	3,0E <sup>-8</sup>
Biotina (H) Ciano							4,1E <sup>-9</sup>	4,1E <sup>-9</sup>	4,1E <sup>-9</sup>	4,1E <sup>-9</sup>	4,1E <sup>-9</sup>	4,1E <sup>-9</sup>
cobalamina	7E <sup>-13</sup>	7E <sup>-13</sup>	7E <sup>-13</sup>	7E <sup>-13</sup>	7E <sup>-13</sup>	7E <sup>-13</sup>	7E <sup>-11</sup>	7E <sup>-11</sup>	7E <sup>-10</sup>	7E <sup>-11</sup>	7,4E <sup>-11</sup>	7E <sup>-10</sup>
(B12)												

 Tabla 1 Medios de cultivo empleados en cultivo y aislamiento. Los valores están expresadas en concentraciones molares en el medio de cultivo.

34

Capítulo 1:

Caracterización y Aislamiento de Cepas de Microalgas
# 4 <u>Capítulo 1: Caracterización y Aislamiento de Cepas de</u> <u>Microalgas</u>

## 4.1 Introducción

Como se señaló en la introducción general, si bien los ambientes ácidos extremos son numerosos en el planeta, ya sea de origen natural o antrópico (Brock, 1978; Albertano, 1995), los organismos que en ellos habitan se reducen a unas pocas especies, comparado con la diversidad existente en los cuerpos de agua neutros (Whitton & Satake, 1996). Debido a que estos ambientes, para algunos investigadores, se asemejan a los comienzos de nuestro planeta, los organismos que allí viven ayudan a comprender cómo estas formas de vida arcaicas han enfrentado las características propias de la superficie terrestre en etapas tempranas de la vida en la tierra (Johnson, 1998; Javaux, 2006). Además el estudio de organismos extremófilos contribuye a las investigaciones acerca de la probabilidad de la existencia de vida extraterrestre (Rothschild & Mancinelli, 2001; Cavicchioli, 2002; Javaux, 2006).

Se trata fundamentalmente de microorganismos y dentro de ellos la mayoría de los que pueden habitar este tipo de ambientes pertenecen al dominio Archea (Cavicchioli, 2002). También existe una variedad de eucariotas y, aunque son muy raros los organismos superiores, eventualmente es posible hallar plantas vasculares a pH cercanos a 3 (Whitton & Diaz, 1981).

En la zona eufótica de los ambientes ácidos, la producción primaria se encuentra mediada por microalgas eucariotas tanto de hábito cocoide, como filamentoso (Gyure *et al.*, 1987 y Lopez-Archilla *et al.*, 2001). Los fotoautótrofos más frecuentemente encontrados en estos ambientes pertenecen a las siguientes divisiones: Rhodophyta

(*Cyanidium caldarium*), Bacillariophyta (*Pinnularia* sp., *Eunotia* sp.), Euglenophyta (*Euglena mutabilis*) y Chlorophyta (*Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Ulothrix* sp. y *Klebsormidium* sp., principalmente) (Brock, 1973). En el caso de las cyanobacterias para ambientes con pH  $\leq$  4,5 los registros son escasos, excepto alguna especie filamentosa ácidotolerante (Steinberg *et al.*, 1998).

En los trabajos realizados por Beamud *et al.* (2007) y Baffico (2010) en el sistema río Agrio - lago Caviahue, se hallaron representantes de los siguientes géneros de los que sólo para algunos se identificaron las especies: en el RAS, *Euglena mutabilis*, una especie de la clase Primnesiophyceae y *Navicula* sp.; en el río Agrio Inferior, *Ulothrix* sp., *Mougeotia* sp. *Klebsormidium* sp. y *Keratococcus rhaphidioides* y en el lago Caviahue, el fitoplancton se encontró dominado por *K. rhaphidioides*, apareciendo esporádicamente *Chloridella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Viridiella* sp. y *E. mutabilis*. Asimismo, es posible encontrar en el lago algunas especies de diatomeas así como la clorofita filamentosa *Ulothrix* sp., y en el RAI se encuentran especies que resultan dominantes en el lago, pero en menor proporción.

El aislamiento y mantenimiento en cultivos en el laboratorio es el primer paso para comprender la taxonomía, la filogenia y la fisiología de estos organismos. Además de los aspectos conservacionistas, está el hecho de poder cultivarlos para optimizar la producción de biomasa en el caso de tener alguna aplicación biotecnológica, ya que al desarrollarse en condiciones particulares cuentan con ventajas competitivas con respecto a otros organismos, por ejemplo frente a contaminantes.

# 4.1.1 Objetivos

El objetivo de este capítulo fue aislar en cultivo axénico cepas de microalgas del sistema río Agrio - lago Caviahue para realizar bioensayos que aporten al conocimiento de la clasificación taxonómica y de la fisiología de estos organismos poco conocidos. Asimismo, se planteó como objetivo obtener cultivos unialgales cuando no fue posible lograr la axenicidad.

#### 4.2 <u>Materiales y Métodos</u>

## 4.2.1 Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas en el lago Caviahue, en diferentes sitios: en la zona pelágica de ambos brazos, en superficie y en el fondo; en la zona litoral y en un arroyo de aguas neutras, afluente del lago en el Brazo Sur (Arroyo Portezuelo). También se recolectaron muestras del río Agrio Superior e Inferior, así como de varias lagunas del complejo termal Copahue. Se obtuvieron muestras de otros dos cuerpos de agua de la Patagonia, lago Puelo en Chubut y río Chimehuín en Neuquén, a fin de contar con cultivos de otros organismos de la región que permitieran las comparaciones con la cepa de *K. rhaphidioides*, aislada del lago Caviahue.

### 4.2.2 Caracterización

Las muestras fueron observadas y fotografiadas bajo microscopio óptico (Olympus BX51, Japón) para una primera identificación morfológica y así iniciar el aislamiento de las cepas. Una vez aisladas las cepas, se complementó la identificación con microscopía electrónica de transmisión y de barrido en los casos que fue necesario.

## 4.2.3 Aislamiento de cepas

Se tomaron alícuotas de cada una de las muestras y se colocaron en cajas de Petri estériles con diferentes medios minerales de cultivo (líquidos) esterilizados, los que se detallan en la sección Materiales y Métodos generales. Las cajas de Petri se colocaron en cámara de cultivo a 13°C con iluminación continua. La intensidad lumínica empleada para el aislamiento se varió en función de la evolución de los cultivos utilizándose valores entre 2 y 80 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Transcurridos 4-5 días se observó en cada placa qué especies se habían desarrollado. Se preparó medio mineral de cultivo

agarizado de la combinación nutricional de la que se hubieran obtenido los mejores resultados, en cuanto al crecimiento de las cepas. Las cepas se colocaron nuevamente en placas de Petri estériles y se procedió de dos modos distintos para el aislamiento de algas cocoides y filamentosas. Para las primeras, se tomó una alícuota de la placa donde crecían (500 µl), previa homogeneización, se adicionó igual cantidad de agua destilada estéril, se esparció uniformemente por la placa, se dejó secar el exceso de líquido a fin de que las células quedaran sobre el ágar lo más separadas posible. Se fue controlando bajo lupa binocular (Leica EZ4, China) el desarrollo de distintas colonias. Al cabo de 4-5 días, bajo lupa también, se levantaron con un ansa las colonias que se encontraban libres de bacterias y hongos y fueron transferidas a placas de cultivo multipozos con el medio mineral de cultivo líquido, en el que se había observado crecimiento inicialmente. Las placas fueron observadas a través de un microscopio invertido (Leica DMIL Led) para corroborar tanto el crecimiento como la pureza del cultivo, y este procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario hasta obtener colonias axénicas (Hoshaw & Rosowski, 1973). Un esquema del proceso empleado se puede observar en la Figura 5. A fin de asegurar la axenicidad, una vez que las colonias crecieron en las placas a las que fueran transferidas, se repitió el procedimiento de la placa de Petri con medio agarizado, pero esta vez adicionando una parte de medio nutritivo para bacterias al medio mineral.

En el caso de *Watanabea caviahuensis*, se utilizó la cepa aislada originalmente del lago Caviahue y depositada en la Colección de Cultivo de Algas y Protozoos (CCAP), Scottish Association for Marine Science, Escocia. La cepa se mantuvo en medio mineral  $(7LCS + \mu(A))$  en cámara de cultivo a 8 °C y luz continua (80 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Para las algas filamentosas, se colocó un grupo de filamentos y bajo la lupa binocular, con un ansa, se seleccionaron varios de estos y se arrastraron por el ágar,

llevando a cabo así una limpieza mecánica (Andersen & Kawachi, 2005). Luego los filamentos fueron transferidos a cámaras de cultivo con el medio mineral líquido identificado previamente como óptimo. En este caso el procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario hasta obtener cultivos unialgales. Para ambos procedimientos, se verificó al microscopio óptico la pureza de los cultivos. Una vez logrados los cultivos unialgales, se mantuvieron en frascos Erlenmeyer de 1 litro, en cámara de incubación bajo condiciones de aireación, 10 °C de temperatura e iluminación constante (~ 90  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).



Figura 5 Esquema del proceso de aislamiento de cepas. 1. De la muestra tomada en el ambiente se transfiere una parte a cajas de Petri con medio de cultivo mineral líquido. 2. Luego de 4-5 días se expande una alícuota en cajas de Petri con medio de cultivo agarizado. 3. Al obtener el crecimiento de las diferentes colonias algales, se seleccionan y se transfieren a placas multipozos con medio líquido nuevamente. 4. Una vez obtenido crecimiento se transfieren a placas de Petri con medio líquido para crecimiento a mayor escala y conservación. 5. Si aún la cepa no está pura, se repiten los pasos 2 – 4.

## 4.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido

Tanto para las fijaciones como para las deshidrataciones se procedió modificando levemente el protocolo de Letcher & Powell (2005). Para la fijación se tomó una alícuota de 1ml del cultivo y se colocó en un tubo Eppendorf, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min y se descartó el sobrenadante. Luego se agregó una mezcla de glutaraldehído al 2,5 % y paraformaldehído al 2% preparado con el medio de cultivo a modo de buffer y se dejó una noche en heladera. Luego las muestras fueron centrifugadas nuevamente a 4000 rpm durante 15 min, el sobrenadante fue descartado y se enjuagaron con buffer (medio de cultivo) tres veces. A continuación las muestras fueron deshidratadas con acetona. Se aumentó gradualmente la concentración de acetona desde 20% hasta 100% mediante goteo en el Eppendorf, con intervalos de 10 s entre gotas. Al llegar al 100% de concentración de acetona las muestras fueron decantadas y transferidas a otro tubo Eppendorf con acetona 100%, dejadas durante 50 min. Luego las muestras se tomaron con pipeta Pasteur y se montaron sobre un cubreobjetos con una fina capa de polilisina y se llevaron a punto crítico (Mazia et al., 1975). Posteriormente, las muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-6490LV) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis (MEByM), CONICET-UNCuyo, Mendoza.

# 4.2.5 Microscopía Electrónica de Transmisión

Se procedió de la misma manera que para microscopía electrónica de barrido para el cultivo y la fijación de las cepas. Una vez fijadas se agregó a las muestras OsO<sub>4</sub> al 1% preparado en buffer fosfato 0,1 M (pH= 6,5) y se dejaron 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. La deshidratación también se realizó como para SEM, pero los intervalos fueron de 15 min. para todas las concentraciones excepto para las últimas fases que

fueron de 20 min. Luego se incluyeron en resina tipo Spurr<sup>®</sup>, se dejaron una noche a temperatura ambiente y se secaron 48h en estufa a 70°C (Letcher & Powell, 2005). Para el corte de las secciones se empleó un ultramicrótomo y los cortes se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y luego con Reynolds (Reynolds, 1963). Las muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión (Philips 301 EM) en el Centro de Microscopías Avanzadas, FCEN,UBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

# 4.3 <u>Resultados</u>

Las especies de microalgas identificadas al microscopio óptico se encuentran listadas en la Tabla 2.

Tabla 2 Cepas de microalgas aisladas de los diferentes cuerpos de agua. U indica cultivo unialgal yA indica cultivo axénico.

Cuerpo de agua	Especie	Clase (División)	U/A
Cuenca Agrio-Caviah	ue		
Río Agrio Superior	Euglena mutabilis	Euglenophyceae (Euglenophyta)	U
	Klebsormidium sp.	Klebsormidiophyceae (Charophyta)	U
Lago Caviahue	Keratococcus rhaphidioides	Trebouxiophyceae (Chlorophyta)	А
	Klebsormidium sp.	Klebsormidiophyceae (Charophyta)	U
	Pseudococcomyxa simplex	Trebouxiophyceae (Chlorophyta)	Α
	Chlamydomonas acidophila	Chlorophyceae (Chlorophyta)	А
	Dichranochaete quadriseta	Chlorophyceae (Chlorophyta)	U
	Ochromonas sp.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	U
Río Agrio Inferior	<i>Ulothrix</i> sp.	Ulvophyceae (Chlorophyta)	U
	Uronema sp.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	U
	Klebsormidium sp.	Klebsormidiophyceae (Charophyta)	U
Arroyo Portezuelo	<i>Monoraphidium</i> sp.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	U
Complejo Termal Copahue			
Laguna Verde	Klebsormidium sp.	Klebsormidiophyceae (Charophyta)	U
	Uronema sp.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	U

Cuerpo de agua	Especie	Clase (División)	U/A
	<i>Pseudococcomyxa</i> sp.	Trebouxiophyceae (Chlorophyta)	А
	Ecdisichlamys sp.	Trebouxiophyceae (Chlorophyta)	А
Agua del Mate	Uronema sp.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	U
Vertiente Ferruginosa	<i>Ulothrix</i> sp.	Ulvophyceae (Chlorophyta)	U
Otros ambientes			
Río Chimehuín	<i>Ankistrodesmus</i> sp1.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	А
	<i>Ankistrodesmus</i> sp2.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	А
	<i>Ankistrodesmus</i> sp3.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	А
Lago Puelo	<i>Monoraphidium</i> sp.	Chlorophyceae (Chlorophyta)	U

# 4.3.1 Microscopio Óptico

En esta sección se describen las cepas aisladas, de acuerdo a la determinación taxonómica alcanzada a través de microscopía óptica. Se muestran las imágenes tomadas al microscopio óptico de las cepas aisladas en cultivo y se indica para cada figura la especie y el aumento.

Keratococcus rhaphidioides (Hansgirg) Pascher, 1915. (Figura 6 A y B)

Células angostas alargadas ahusadas rectas o con diferentes curvaturas o sigmoideas, ambos extremos hialinos y delicados, a menudo fuertemente curvados. Cloroplasto parietal reniforme, en el centro, nunca en los extremos, a menudo con un pirenoide difícil de ver. Reproducción 4 – 8 autosporas. Dimensiones: long. (12-) 25 – 65  $\mu$ m; diám. (1,5-) 2,4 - 3,5  $\mu$ m (Komarek &Fott, 1983). Es un género muy difícil de distinguir de *Ankistrodesmus* (Bourrelly, 1972).

#### Pseudococcomyxa simplex (Mainx) Fott, 1981. (Figura 6 C-E)

Células solitarias o en grupos, elipsoidales a oboviformes, a veces ligeramente asimétricas débilmente curvadas. Poseen un pie mucilaginoso en la parte basal. Pueden formar colonias de 2 – 4 células, por lo tanto sus extremos quedan unidos. Cloroplasto parietal escotado en el medio abarcando aproximadamente la mitad de la célula. Reproducción por 2 – 4 – (8) autosporas que salen de la célula madre a través de una ruptura de la pared apical o subapical. Dimensiones: long. (4,6-) 6 – 11 (-12,6) µm; diám. 2 – 4,5 (-6,5) µm (Komarek & Fott, 1983).

#### Watanabea caviahuensis Brankatschk, Diaz & Groben, 2004. (Figura 6 F-H)

Células solitarias que presentan dos morfologías: elipsoidal y esférica. Las células elipsoidales jóvenes son cilíndricas, elipsoidales angostas o elipsoidales, rectas o curvadas y sus extremos suelen no ser simétricos. Cuando maduran son elipsoidales anchas o elipsoidales y sus extremos son simétricos. En la forma esférica, cuando son jóvenes las células son esféricas, ovoides y a veces completamente poliédricas. Cuando maduran son esféricas. La pared celular en ambas formas es lisa y está compuesta por una única capa gruesa (0,04-0,11  $\mu$ m). El cloroplasto de las células jóvenes, en ambas formas, es parietal laminar o discoide, con sus márgenes lisos y en las células maduras parietal laminar o cupuliforme, con profundas incisiones, a veces fragmentado, ocupando la periferia de la célula casi por completo (Hanagata *et al.*, 1998). Son capaces de crecer a pH 2. Dimensiones: células elipsoidales long. 3,5 – 6,5  $\mu$ m; diám. 1 – 4  $\mu$ m. Células esféricas diám. 6 – 18  $\mu$ m (Brankatschk, 2007).

Ecdysichlamys sp. G.S. West, 1912. (Figura 6 I-K)

Células raramente solitarias, usualmente en mucílagos densos agregados formando capas sobre un sustrato. Células estrechas o ampliamente elipsoidales,  $6-24 \times 2-20 \mu m$ ,

levemente asimétricas con un lado hinchado, ápices redondeados o apiculados con uno o ambos extremos engrosados. Paredes celulares lisas, relativamente gruesas, indistintamente estratificadas. Núcleo singular excéntrico, cloroplasto único, parietal masivo con márgenes ondulados o lobulados, un pirenoide (raramente dos) con una distintiva capa de almidón. Reproducción asexual por formación de 2-8 (-16) autosporas, liberadas por ligera disolución y ruptura de la pared celular madre. Reproducción sexual y estadios flagelados ausentes (Guiry & Guiry, 2016).

#### Chlamydomonas acidophila Negoro. (Figura 6 L y M)

Células ovoides, ampliamente redondeadas en la base, claramente afinadas hacia el ápice, a veces aplanadas, lado ventral angosto y dorsal arqueado. Membrana fina sin papila, en algunos casos inflada. Cloroplasto parietal, cupuliforme, dorsal, abierto hacia el lado ventral. Pirenoide relativamente largo, lateral rodeado de almidón, a veces desplazado hacia abajo asumiendo una posición basal. Estigma en la parte superior del cloroplasto. Dos flagelos, 1,5 - 2 veces más largos que el cuerpo. Reproducción asexual a través de 4 zoosporas y sexual con isogamia. Dimensiones: long. 8,4 - 11,8 µm; diám. 5 - 8,4 µm (Fott & McCarthy, 1964; Rhodes, 1981).

#### Ankistrodesmus sp. Corda, 1838. (Figura 6 N y Ñ)

Células solitarias o en haz, fusiformes muy alargadas, en agujas rectas o ligeramente curvadas a veces sigmoideas. La reproducción se da por formación de 2, 4, 8 autosporas de la misma forma que la célula madre y continúan dentro de su pared celular. El plasto es parietal y puede presentar un pirenoide, raramente varios. Algunas especies mantienen los haces de células en un mucílago. En algunos casos se observa una tendencia a la fijación por un puente y la formación de arbúsculos (Bourrelly, 1972).

Monoraphidium sp. Komarkova-Legnerova, 1969. (Figura 6 O y P)

Este género comparte las características morfológicas de *Ankistrodesmus*, pero con la salvedad de que no forma colonias, sino que sus células son solitarias. Una vez que se produce la autosporulación, las células hijas salen de la madre y se dispersan (Bourrelly, 1972).

#### Euglena mutabilis Schmitz, 1884. (Figura 6 Q)

Células muy delgadas, aproximadamente cilíndricas, con el extremo anterior redondeado y el extremo posterior ahusado. Cutícula finamente estriada en espiral. 2-8 cromatóforos verde-amarillentos, comúnmente 4, en forma de láminas cuadrangulares a rectangulares, delgados, curvados, ubicados inmediatamente por debajo de la cutícula, ocupando aproximadamente 2/3 de la circunferencia de la célula. Un pirenoide en cada cromatóforo, muy raramente dos. Numerosos cuerpos de paramilon rectangulares, de aproximadamente 2  $\mu$ m de longitud. Estigma carmín brillante. Núcleo central. Células muy metabólicas. Dimensiones: long. 70 - 122  $\mu$ m; diám. 4-11  $\mu$ m (Tell & Conforti, 1986).

#### Ochromonas sp. Wyssotski, 1887. (Figura 6 R)

Células solitarias que nadan libremente ayudadas por dos flagelos diferentes, heteromorfos. Poseen uno o varios plastos con un único pirenoide, a menudo un estigma y dos vacuolas contráctiles. Son más o menos metabólicas, piriformes, globulosas, elipsoidales, poco o nada aplanadas. Células desnudas. Los quistes silíceos y los estadios palmeloides se observan en muchas especies. Las características sistemáticas importantes son las siguientes: forma, metabolismo y tamaño de la célula; pirenoides presentes o ausentes; largo de los flagelos, coloración de los plastos (de marrón a verde); presencia y estructura de los cuerpos mucíferos (reacción con colorantes y con lugol); forma y número de plastos y estructura de los quistes (Bourrelly, 1981).

Dichranochaete quadriseta. (Korschikoff, 1953) Nováková & Popovsky 1972. (Figura 6 S)

Células con forma de cebolla, con las partes anchas fijadas fuertemente a sustratos. La parte apical rejuvenecida y más o menos puntiaguda. Pared celular compuesta por tres capas de las cuales la pared exterior queda libre y la siguiente con forma de cono puntiagudo y más gruesa. Las células se encuentran rodeadas de mucílago con cuatro flagelos ramificados dicotómicamente dispuestos en cruz que nacen cerca de la base de la célula, pero en el borde de la pared externa. Cloroplasto cupuliforme con una apertura hacia abajo dirigida hacia el sustrato. Sin pirenoide. El núcleo en el lúmen del cloroplasto, no se observan vacuolas contráctiles. La reproducción no está descripta, sin embargo Korschikoff encontró zoosporas. Dimensiones: células, long. hasta 28 µm; diám. hasta 23 µm, flagelos, long. 50 µm. Frecuentemente creciendo sobre *Sphagnum* en turberas.

#### Klebsormidium sp. Silva, Mattox & Blackwell, 1972. (Figura 7 A y B)

Hábito filamentoso. Los filamentos no ramificados, siempre flotan libremente y se disgregan muy fácilmente. Carecen de vaina mucilaginosa. Células uninucleadas, presentan un plasto parietal que rodea apenas la mitad de la circunferencia de la célula. Un único pirenoide. Reproducción por formación de zoosporas biflageladas. Se observan frecuentemente aplanosporas y acinetas. Se han observado gametas biflageladas de diferente tamaño (anisogamia) que se fusionan en una cigota. Las zoosporas son aplanadas dorsoventralmente y salen del esporocisto a través de un poro como en *Ulothrix*. Las principales características que la diferencian de *Ulothrix* son 1. Filamentos flotando libremente. 2. Plasto reducido con un solo pirenoide. 3. Ausencia de vaina mucilaginosa. 4. Disociación frecuente de filamentos y 5. zoosporas con dos flagelos (Bourrelly, 1972).

#### *Ulothrix* sp Kützing, 1836. (Figura 7 C)

Hábito filamentoso, los filamentos jóvenes crecen fijos, sin célula apical diferenciada y flotan libremente cuando envejecen. Filamentos cilíndricos o un poco moniliformes uniseriados. A veces rodeados de una vaina mucilaginosa, amorfa estriada longitudinal o transversalmente. La membrana delicada o gruesa, presenta muy raramente un tabique que tiene forma de H en sección óptica longitudinal. Células uninucleadas con un plasto parietal que envuelve más de la mitad o <sup>3</sup>/<sub>4</sub>, de la circunferencia de la célula. Los plastos están muy a menudo en un anillo cerrado o casi cerrado. Uno o varios pirenoides. En algunas especies una vacuola que contiene un gránulo ocupa los dos polos de la célula. Cada célula puede dividirse transversalmente o producir zoosporas. Hay tres tipos de zoosporas: macrozoosporas con 4 flagelos iguales, microzoosporas con 4 flagelos también, más pequeñas que las anteriores y microzoosporas con 2 flagelos. Estas zoosporas pueden germinar en un nuevo filamento después de su liberación o permanecer dentro de la célula madre y transformarse en aplanosporas. Las células pueden producir gametas biflageladas que por fusión isogámica generan cigotas que germinan en aplanosporas. La meiosis tiene lugar en algún momento de la germinación y los filamentos nacidos de aplanosporas son haploides (Bourrelly, 1972).

#### Uronema sp. Lagerheim, 1887. (Figura 7 D)

Filamentos uniseriados, células con un plasto parietal reducido con 1-4 pirenoides. Los filamentos se fijan por una célula basal y terminan en una célula apical de forma especial un poco curvada y más o menos ahusada. La reproducción es por zoosporas vegetativas con 4 flagelos que germinan inmediatamente en nuevos filamentos. No se conoce reproducción sexual (Bourrelly, 1972).



Figura 6 Cepas aisladas de hábito cocoide. A. K. rhaphidioides, aspecto general. B. K. rhaphidioides, célula madura. C. P. simplex, aspecto general. D. P. simplex, autosporas saliendo de la célula madre. E. P. simplex, célula madura. F. W. caviahuensis, aspecto general. G. W.

*caviahuensis*, células esféricas maduras. H. *W. caviahuensis*, células elipsoidales jóvenes. I. *Ecdysichlamys* sp., aspecto general con células en división. J. *Ecdysichlamys* sp., autosporas dentro de la célula madre. K. *Ecdysichlamys* sp., célula madura. L. *C. acidophila*, autosporas dentro de la célula madre. M. *C. acidophila*, célula madura. N. *Ankistrodesmus* sp., autosporas dentro de la célula madre. Ñ. *Ankistrodesmus* sp., células maduras. O. *Monoraphidium* sp., autosporas dentro de la célula madre. P. *Monoraphidium* sp., célula madura. Q. *E. mutabilis*, célula madura. R. *Ochromonas* sp. célula madura. S. *Dichranochaete quadriseta*, célula madura. Escalas: A, C, F, 50 μm; B, D, E, G – R, 5 μm; S, 10 μm.



Figura 7 Cepas aisladas de hábito filamentoso. A. *Klebsormidium* sp., aspecto general. B. *Klebsormidium sp.*, detalle de deformaciones en el filamento rodeadas de mucílago. C. *Ulothrix* sp., aspecto general. D. *Uronema* sp., extremo del filamento en el que se observa la característica célula apical puntiaguda. Escalas: A, 25 μm; B, D, 10 μm; C, 5 μm.

## 4.3.2 Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Las cepas que requirieron de esta técnica para precisar detalles de ultraestructura de valor taxonómico fueron *K. rhaphidioides, P. simplex, W. caviahuensis, Klebsormidium* sp., *Ulothrix* sp. y *Uronema* sp. En la Figura 8 pueden verse detalles claves que serán descriptos a continuación. En la Figura 8 A y B la cepa es *P. simplex*. En la primera foto se observan las estructuras internas de la célula: el cloroplasto laminar parietal con gránulos de almidón dispersos ya que carece de pirenoide, la membrana nuclear de forma cuadrada con el nucleolo en el centro de dicha membrana y una vacuola con

material electrodenso en su interior. En la imagen siguiente se observa un detalle de la pared celular formada por tres capas (trilaminar), una característica importante para diferenciar esta especie de *W. caviahuensis* en su forma elipsoidal. En la Figura 8 C se ve claramente ese detalle, ya que la pared celular mostrada corresponde a *W. caviahuensis* y sólo posee una capa, es decir que es lisa. En la imagen siguiente (Figura 8 D) se representa un aspecto general de *W. caviahuensis*. En este caso hay seis células contenidas en la pared celular madre, esta especie también tiene un cloroplasto laminar parietal y carece de pirenoide por lo tanto el almidón se encuentra como gránulos dispersos en el plasto. Aquí también es posible observar algunas vacuolas con material electrodenso. Al igual que las algas recientemente descriptas, *K. rhaphidioides* (Figura 8 E) posee un cloroplasto laminar parietal y una pared celular lisa, pero a diferencia de las otras especies tiene un pirenoide que es una estructura de alto valor taxonómico, al cual se encuentran asociados los gránulos de almidón.

Por otra parte, en las fotomicrografías tomadas para las algas de hábito filamentoso se observa claramente que en *Ulothrix* sp. el pirenoide es liso, rodeado por almidón formando calotas y el cloroplasto es parietal (Figura 8 I). En cambio en *Klebsormidium* sp. (Figura 8 J) el pirenoide si bien también se encuentra rodeado por el almidón en gránulos, no es liso sino que está atravesado por la membrana de los tilacoides.

# 4.3.3 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

En las fotos tomadas con SEM pueden apreciarse características externas de las células. En el caso de *P. simplex* (Figura 8 F) puede apreciarse que la pared celular es lisa y se observan también algunas leves líneas blancas que son restos de mucílago. Dicho mucílago es conspicuo en la parte apical de la célula, como se muestra en la Figura 8 G y resulta de alto valor taxonómico. La Figura 8 H corresponde a *K*.

*rhaphidioides* y como en *P. simplex* sus paredes son lisas, pero en este caso no existe mucílago ni ningún tipo de estructura de fijación.



Figura 8 Fotomicrografías de TEM (A, B, C, D, E, I, J) y SEM (F, G, H). A – H, algas de hábito cocoide y I, J algas de hábito filamentoso. A. *P. simplex*, corte longitudinal de la célula. Se indica con un rectángulo el sector de la pared ampliado. B. *P. simplex*, detalle de la pared celular trilaminar, indicada con puntas de flecha. C. *W. caviahuensis*, detalle de la pared celular monocapa y lisa, indicada con puntas de flecha. D. *W. caviahuensis*, autosporas dentro de la célula madre. Se indica con un recuadro el sector de pared celular ampliado en el detalle (C). E. *K. rhaphidioides*, corte longitudinal de la célula. F. *P. simplex*, célula madura. Se puede

observar que si bien el mucílago se encuentra en toda la célula, está concentrado en el ápice. G. *P. simplex*, detalle del mucílago apical. H. *K. rhaphidioides*, aspecto general. I. *Ulothrix* sp., corte longitudinal de la célula, puede verse que el cloroplasto no atraviesa el pirenoide. J. *Klebsormidium* sp., corte longitudinal de la célula, a diferencia de la anterior, es posible observar el pirenoide atravesado por los tilacoides. Escalas: A, D, E, 0,5 μm. B, C, I, J, 0,1 μm. F, G, 1 μm. H, 5 μm. Referencias: c: cloroplasto, v: vacuola, s: almidón, Nu: nucleolo, Py: pirenoide, T: tilacoides.

## 4.4 Discusión

El aislamiento y mantenimiento en cultivo de cepas provenientes del sistema río Agrio-lago Caviahue, tiene dos connotaciones principales: una referida al conocimiento de la flora de estos ambientes en sí misma y la otra referida a la taxonomía y filogenia de estos microorganismos.

De las cepas aisladas, varias son compartidas con otros ambientes ácidos, al menos a nivel genérico. Por ejemplo *Euglena* spp., *Chlorella* spp., *Chlamydomonas acidophila*, *Ulothrix zonata* y *Klebsormidium fluitans*, son especies normalmente citadas así como también otros representantes de los dos últimos géneros mencionados (Johnson, 1998; Novis, 2006). La particularidad que posee el lago Caviahue es que la especie dominante es *K. rhaphidioides* (Beamud *et al.*, 2010). Tanto *K. rhaphidioides*, como otras especies de este género, han sido descriptas para ambientes terrestres (Neustupa, 2004; Klemenčič & Balabanič, 2008) y ambientes acuáticos alcalinos (Van Meel, 1960). En el caso de *K. rhaphidioides*, además de no estar descripta para ambientes ácidos, no se encontró en ningún otro cuerpo de agua de las inmediaciones del lago Caviahue, donde sí apareció una especie de *Monoraphidium*.

En la mayoría de las especies aisladas se logró alcanzar una clasificación taxonómica con el microscopio óptico, aunque algunas como *Klebsormidium* y *Ulothrix* fueron de difícil diferenciación (Novis, 2006) y fue necesario el uso del microscopio electrónico. Ambos géneros son algas filamentosas simples y generalmente *Klebsormidium* crece flotando libremente mientras que *Ulothrix* tiene un período de crecimiento adherido a sustrato, pero sus filamentos se sueltan con facilidad y se presta a confusión. En el lago Caviahue así como en el río Agrio, se encontraron estas especies. En el río Agrio Superior y en la zona litoral del lago aparecieron flotando sueltas o levemente adheridas

a las rocas. Las observaciones de campo y posteriores observaciones de los aislamientos en cultivo concordaron con *Klebsormidium*, pero a diferencia de lo que se describe para el género, esta cepa no se disgrega fácilmente, lo que la hace muy fácil de confundir con filamentos maduros de *Ulothrix*. En el río Agrio Inferior las matas de algas crecieron adheridas al sustrato tapizando el lecho del río. En este caso, las observaciones de campo y las posteriores observaciones de los aislamientos en cultivo concordaron con *Ulothrix*. Al aislar en cultivo ambas especies, se encontró que presentaron mejor crecimiento (*i.e.* biomasa y morfología de las células) a pH cercanos a 7,0 (6,5 – 6,8), aunque provenían de un ambiente ácido. Otra diferencia fundamental entre ambas filamentosas es que en *Klebsormidium* el pirenoide se encuentra atravesado por los tilacoides, por lo que resultó imprescindible el uso de técnicas de microscopía electrónica para su diferenciación.

Debido a que el género *Klebsormidium* se encuentra muy relacionado filogenéticamente con el género *Interfilum* (Rindi *et al.*, 2011) y que se encontró que la especie acidófila *K. fluitans* es polifilética (Rindi *et al.*, 2011), resulta importante haber aislado las especies presentes en Caviahue y el mantenimiento de las cepas aisladas en cultivo, para su posterior estudio filogenético.

En las muestras tomadas del río Agrio Inferior se encontró *Uronema* sp. (con su característica célula apical) y se pudo aislar la cepa. Se desarrolló mucho mejor en medio de cultivo con pH 6,5. La clasificación taxonómica se pudo asegurar cuando se logró que el cultivo zoosporulara y se observara que todas los nuevos filamentos poseían la célula apical característica del género.

Las cepas de hábito cocoide también presentaron dificultades para su determinación ya que pertenecen a grupos taxonómicos que se encuentran en revisión constante, y poseen grandes similitudes entre sí lo que las hace difíciles de diferenciar al microscopio óptico. *Keratococcus* es un género conflictivo, usualmente difícil de separar de *Monoraphidium* y *Ankistrodesmus*, que presentan células solitarias, cocoides, con forma de medialuna en la mayoría de los casos. Como las características morfológicas no siempre son suficientes para distinguir entre estos géneros (Krienitz *et al.*, 2001), a medida que se van secuenciando las especies, son reubicadas y los árboles van siendo reestructurados (Hegewald *et al.*, 2013). Por lo tanto, serán necesarios estudios moleculares para resolver inequívocamente la identidad de la especie aislada del lago Caviahue.

*Pseudococcomyxa* es una especie ubicua que resultó difícil de separar morfológicamente de la forma elipsoidal de *Watanabea. Pseudococcomyxa* posee un mucílago apical visible por SEM y la forma de reproducción es por formación de 4 autosporas. En *Watanabea* no se observa polaridad en las células y la reproducción es por numerosas autosporas. En el presente caso, *W. caviahuensis*, se observaron los dos morfotipos característicos del género, aunque las células no alcanzaron el mismo tamaño en cada uno de ellos. Las células esféricas fueron las que desarrollaron mayor volumen y las elipsoidales pudieron observarse únicamente en células hijas recién salidas de la célula madre. A medida que las células elipsoidales maduraron se volvieron esféricas. Otro dato que resultó fundamental en la diferenciación de estas especies fue la pared celular sólo visible por TEM, donde se observó que la pared de *P. simplex* estaba compuesta por tres capas, mientras que la de *W. caviahuensis* sólo por una. A nivel filogenético el clado de *Watanabea* aún no está resuelto (Neustupa *et al.*, 2011).

Por su parte, *Chlamydomonas* es un género que pertenece a un clado que está resuelto (Pröschold et al., 2001), aunque posee tantos representantes que todo nuevo aislamiento y posterior caracterización molecular es de gran valor para continuar con el

crecimiento de los árboles filogenéticos. *Ecdysichlamys* es un género que estuvo unido a *Oocystis* debido a la similitud entre cepas tanto en la morfología como en la forma de reproducción y continúan siendo especies muy difíciles de separar morfológicamente (Stoyneva *et al.*, 2007).

*Dichranochaete* es un género que posee hasta ahora cuatro especies descriptas: *D. reniformis* Hieron. Ex Cohn., *D. bohemica* Nov. & Pop., *D. quadriseta* (Kors) Nov. & Pop. y *D. brittanica* West (Francke & Kooijman-van Blokland, 1985). Se trata de un género poco estudiado (Caisová, 2015) que suele hallarse epífita en hojas de *Sphagnum* sp., por lo que su aislamiento en cultivo podría aportar a la taxonomía y posterior caracterización molecular del género. Por otra parte, aunque el género ya se encontró en turberas de Tierra del Fuego (Tell, 1973), la especie aislada en Caviahue podría tratarse de la primera cita para la Argentina.

Por último, los géneros *Ochromonas* así como *Euglena* poseen representantes que se encuentran con frecuencia en ambientes ácidos, con lo que su aislamiento y caracterización aporta a la conservación *ex situ* y a la descripción y conocimiento general de estos ambientes.

Capítulo 2:

Condiciones Físicas y Químicas de Cultivo

## 5 <u>Capítulo 2: Condiciones Físicas y Químicas de Cultivo</u>

## 5.1 Introducción

Tanto el pH como la luz son factores íntimamente relacionados con la incorporación de nutrientes en las algas. Como se expuso en la introducción general, cuando el pH es menor a 4 el 99% del CID está en forma de  $CO_2$ , mientras el  $HCO_3^-$  está ausente. Por lo tanto, el  $CO_2$  es la especie de CID que los organismos fotosintéticos incorporan, en cuyo caso se hace innecesaria una estrategia de captura de  $CO_2$ , como por ejemplo una anhidrasa carbónica (CA) de superficie (Geib et al., 1996). Por otra parte, si la única forma de CID es el  $CO_2$ , éste generalmente está en equilibrio con la concentración atmosférica, hecho que podría volverlo un nutriente limitante. Sin embargo, es sabido que en varias microalgas y cianobacterias la afinidad fotosintética por el  $CO_2$  es mayor en células adaptadas a bajas concentraciones del mismo (Aizawa & Miyachi, 1986).

Además de la relación directa que existe entre el pH y la disponibilidad de C inorgánico, este factor afecta de modo indirecto a la captación de N inorgánico, pues el C está íntimamente relacionado con la incorporación de dicho nutriente. Esto ocurre debido a que la asimilación de N genera un incremento en la tasa de síntesis de aminoácidos, la cual produce un aumento en la demanda de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y para suplir dicha necesidad se incrementa el consumo de CO<sub>2</sub> (Turpin *et al.*, 1988).

Por su parte, la concentración de H<sup>+</sup> también puede afectar la incorporación de P, ya sea de forma directa en los sitios de captación o indirectamente determinando la especiación química del pool de metales disueltos, ya que puede favorecer la presencia de cationes libres que también compiten con el sitio de captación de P en las células (Peterson et al. 1984).

Con respecto a la luz, la adaptación fisiológica a cambios en la intensidad lumínica y la calidad espectral (fotoadaptación) es un factor importante que determina variaciones en la respuesta fotosintética y las tasas de crecimiento en las algas (Falkowski, 1980; 1984). Sukenik *et al.* (1990), proponen que la fotoadaptación no es más que un redireccionamiento del C en la célula. Estos autores observaron que *Dunalliela tertiolecta* (Chlorophyta) cuando se transfería de mayor a menor irradiancia, la síntesis de biomoléculas era inicialmente desviada de lípidos e hidratos de carbono a la síntesis de proteínas que forman parte del fotosistema II. Una vez estabilizada la cantidad así como la superficie de esas proteínas, el C era redireccionado a la síntesis de lípidos que regulan la distancia de los fotosistemas en la membrana de los tilacoides.

## 5.1.1 Objetivos

Considerando las condiciones de bajo pH y la rápida extinción del PAR en el lago Caviahue, los objetivos de este capítulo fueron: hallar las mejores condiciones de crecimiento en cultivo de las cepas seleccionadas a partir de los aislamientos realizados y analizar los efectos de dichos factores sobre las tasas de crecimiento.

#### 5.2 <u>Materiales y Métodos</u>

De las cepas aisladas del lago Caviahue (Capítulo 1), se realizaron los ensayos de los efectos del pH y la luz (intensidad y espectro lumínico) en tres cepas seleccionadas por su importancia en el sistema (*K. rhaphidioides*, *P. simplex* y *W. caviahuensis*).

En todos los casos, el medio de cultivo utilizado fue 7LCS +  $\mu(A)$  que fue ajustado a los diferentes valores de pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. y NaOH, antes de ser esterilizado. La esterilización se realizó en frascos de vidrio de 500 ml y se verificó el pH de cada medio después del autoclavado (en general, no hubo necesidad de reajustar el pH). En tubos de ensayo de vidrio de 50 ml previamente esterilizados, se colocó el medio de cultivo estéril y se sembraron los inóculos algales. Los tubos se cerraron con Parafilm® y durante el ensayo se los agitó de forma manual, diariamente. El método de esterilización del medio de cultivo y el material de vidrio se describe en Materiales y Métodos generales.

El seguimiento de los ensayos se realizó a través de diferentes mediciones: recuentos celulares bajo microscopio invertido (densidad algal), fluorescencia *in vivo* y concentración de clorofila *a*. La descripción detallada de los métodos se encuentra en la sección de Materiales y Métodos generales.

# 5.2.1 Keratococcus rhaphidioides

#### 5.2.1.1 <u>pH</u>

Los valores de pH ensayados para esta cepa fueron los siguientes: 2,05; 3,01; 4,01; 5,09; 6,00; 6,99 y las réplicas contenían 38 ml de medio de cultivo mineral y 1 ml de inóculo (*ca.* 300 000 cél ml<sup>-1</sup>). El experimento se llevó a cabo durante 17 días y se desarrolló en cámara de cultivo a 8 °C y luz continua (80  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Una vez

sembrados los tubos, se tomó una alícuota de 1 ml para recuento celular y luego se midió fluorescencia *in vivo* con fluorímetro. Se prepararon tres réplicas extra del control (pH 3), que fueron filtradas para obtener el dato inicial de concentración de clorofila *a*.

La fluorescencia *in vivo* se midió diariamente durante todo el ensayo, mientras que los recuentos celulares y la extracción de clorofila se hicieron el primero y el último día del experimento.

Para los recuentos celulares del último día se tomó una alícuota de 0,5 ml de cada réplica y se emplearon placas multipozos como cámara de decantación de 176,7 mm<sup>2</sup> de superficie. Para las extracciones de clorofila se filtraron 20 ml de cada cultivo.

En la extracción de clorofila del final del experimento, después de retirar el sobrenadante de los tubos, estos fueron reservados en el freezer con los filtros dentro para realizar una segunda extracción con ruptura mecánica de células. Entonces los filtros fueron machacados en mortero con  $N_{liq}$  y luego se procedió a realizar una nueva extracción de clorofila con el mismo método.

A partir de los datos de densidad celular se calcularon las tasas de crecimiento (r) como se indicó en Materiales y Métodos generales.

Por otra parte, a partir de las fotografías tomadas para recuentos celulares se calculó el biovolumen para cada uno de los pH al final del experimento. Luego, con el biovolumen y la densidad celular se calculó la biomasa en peso fresco como el producto de dichas mediciones. Se utilizó en este cálculo un factor de conversión de volumen a masa de  $10^6 \mu m^3 = 1\mu g$ .

#### 5.2.1.2 <u>Luz</u>

#### Tasa de fotosíntesis:

Las tasas de fotosíntesis se determinaron como la evolución del oxígeno disuelto en función de la luz. Para la medición del oxígeno se utilizó un medidor de oxígeno con microsensor (Microx TX3, Presens, Alemania). Tres repeticiones del cultivo se incubaron a 20 °C, luego se transfirió una alícuota de cada réplica a cámaras de 2 ml cerrada herméticamente y sin dejar espacio de aire. Para evitar microgradientes de oxígeno dentro de la cámara, la misma se agitó suavemente mediante un agitador magnético. Para estimar la tasa de fotosíntesis la cámara fue iluminada a niveles crecientes de radiación lumínica fotosintéticamente activa (PAR) a los siguientes valores: 0; 7,7; 17,1; 34,3; 59,3; 101,5; 250 y 655 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (medidos con medidor de luz Li-250A, LI-COR, USA). Cada nivel de intensidad se logró empleando filtros compuestos de sucesivas láminas de papel vegetal ubicado entre la fuente de luz y la cámara de medición. Para lograr el nivel 0 µmol fotón m-2 s-1 se cubrió completamente la cámara con papel de aluminio. Cada uno de los niveles se mantuvo hasta que se observó una producción estable de oxígeno (ca. 5 min). Al finalizar las mediciones, se filtró el contenido de la cámara para realizar la determinación de la concentración de clorofila a.

Para describir la relación entre fotosíntesis e irradiancia se utilizó la ecuación de ajuste a la función tangente hiperbólica de Jassby & Platt (1976):

$$PR = P_{max} \cdot \tanh \frac{\alpha \cdot E}{P_{max}} + R \tag{6}$$

Donde:

• PR: tasa de fotosíntesis por unidad de clorofila *a*.

- α: pendiente inicial de la curva P-E
- E: densidad del flujo de fotones (intensidad de luz)
- P<sub>máx</sub>: tasa máxima de fotosíntesis bruta
- R: tasa de respiración en oscuridad

El punto de compensación lumínica ( $I_k$ ), se calculó como la relación  $P_{máx}$ :  $\alpha$  (Talling 1957) y corresponde al punto en el cual la pendiente lineal de la curva de saturación de luz intersecta al plateau. Los datos fueron ajustados por cuadrados mínimos utilizando el programa QtiPlot.

#### Efecto de la baja intensidad lumínica:

Para probar la tasa de crecimiento de las algas a bajas intensidades de luz por tiempos prolongados, se incubaron las mismas a 0, 12, 30 y 70  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Se trabajó en frascos de cultivo estériles descartables (Nunclon® de 40 ml). Allí se colocaron 20 ml del medio de cultivo mineral y 1 ml de inóculo (*ca.* 40 000 cél. ml<sup>-1</sup>), luego los frascos fueron dispuestos en la cámara de cultivo (8 °C) a diferentes distancias de los tubos fluorescentes. Los frascos que fueron expuestos a 12  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> se cubrieron con una malla tipo "mediasombra" mientras que se envolvieron en papel de aluminio los que quedaron en oscuridad. El experimento duró 24 días y el seguimiento se realizó a través de recuentos celulares tomando alícuotas de 0,5 ml (incluido el inóculo inicial). Se utilizaron cámaras multipozos de 176,7 mm<sup>2</sup> de superficie como cámara de decantación.

#### Efecto de la calidad espectral:

Para este experimento se trabajó con tubos de ensayo envueltos con papel celofán de diferentes colores para simular diferentes espectros lumínicos. Los colores ensayados fueron: rojo, verde, amarillo, azul e incoloro (control). Los tubos se llenaron con 40 ml

de medio mineral de cultivo y se agregaron 2 ml de inóculo (*ca.* 50 000 cél. ml<sup>-1</sup>). Fueron incubados en cámara de cultivo a 8 °C y luz continua (80  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante 26 días. El crecimiento de los cultivos se siguió por medio de la fluorescencia *in vivo* y recuentos celulares, para los cuales se fijaron alícuotas de 1 ml. Además, se midieron las tasas de fotosíntesis a la misma intensidad lumínica de cultivo y en oscuridad (cubriendo el tubo con papel de aluminio).

# 5.2.2 <u>Pseudococcomyxa simplex</u>

#### 5.2.2.1 <u>pH</u>

En este caso los valores de pH ensayados fueron: 3,02; 4,00; 5,11; 6,03; 7,01. Las réplicas contenían 40 ml de medio de cultivo mineral y 2 ml de inóculo (*ca.* 20 000 cél. ml<sup>-1</sup>). El experimento se desarrolló en cámara de cultivo a 8 °C y luz continua (80  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), durante 28 días. Una vez sembrados los tubos, se tomó una alícuota de 1 ml para recuento celular y luego se midió fluorescencia *in vivo*.

A lo largo del experimento se midió fluorescencia diariamente durante los primeros 10 días, luego el día 12 y el 19, de modo de asegurarse estar en la fase exponencial de crecimiento para el cálculo de la tasa de crecimiento. Por su parte, los recuentos celulares se hicieron el primero, y el último día mientras que las tasas de crecimiento (r) se calcularon a partir de los datos de fluorescencia *in vivo*.

#### 5.2.2.2 <u>Luz</u>

#### Tasa de fotosíntesis:

Se procedió del mismo modo que para *K. rhaphidioides*, pero las intensidades de luz con las que se trabajó fueron las siguientes: 0; 0,3; 0,7; 1,0; 2,2; 4,6; 7,4; 13,0; 28,0; 64,0; 105,0 (µmol fotón m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Las mediciones para cada intensidad también se

realizaron a intervalos de 5 minutos y luego se filtró el cultivo para extracción de clorofila *a*.

# 5.2.3 Watanabea caviahuensis

## 5.2.3.1 <u>pH</u>

Se ensayaron para esta cepa los siguientes valores de pH: 1,98; 3,05; 4,04; 5,02; 5,99; 6,92. Las réplicas contenían 20 ml de medio de cultivo mineral y 0,5 ml de inóculo (*ca.* 75 000 cél. ml<sup>-1</sup>). El experimento se desarrolló a temperatura ambiente y luz continua (80  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), en frascos de cultivo estériles descartables (Nunclon® de 40 ml) y duró 14 días. Una vez sembrados los inóculos, se tomó una alícuota de 1 ml para recuento celular.

Los recuentos celulares se realizaron directamente en los frascos de cultivos, por lo tanto la superficie de la cámara empleada fue de 2500 mm<sup>2</sup>. Debido a que esta especie presenta dos morfologías celulares (esféricas y elipsoidales) los recuentos se realizaron para cada una de las formas.

A partir de los datos de densidad celular se calcularon las tasas de crecimiento con la misma fórmula empleada en *K. rhaphidioides*.

# 5.3 <u>Resultados</u>

# 5.3.1 K. rhaphidioides

### 5.3.1.1 <u>pH</u>

Al final del experimento se pudo ver que las mayores densidades celulares se obtuvieron a pH 4 seguido de pH 3 (Figura 9), sin diferencias significativas entre ellos (p<0,05). Los pH 2, 5, 6 y 7 formaron grupos estadísticos solapados, aunque observando las medias, se puede ver que resultaron similares las de los pH 2 y 6 por un lado y 5 y 7 por otro. En estos últimos las densidades celulares fueron menores que a pH 3 y 4, pero resultaron mayores que en el inóculo inicial, evidenciando un crecimiento del cultivo. Tanto para pH 2 como 6 los cultivos finalizaron con una densidad celular menor que el inóculo inicial, es decir que los cultivos no prosperaron en esa condición.



Figura 9 Densidad celular de *K. rhaphidioides* a diferentes valores de pH. Se observa la densidad del inóculo inicial y las densidades al cabo de 18 días de incubación. Las letras indican los grupos homogéneos.

A pH 6 se registraron irregularidades entre las réplicas que generaron un gran error y

un resultado que no guardó relación con la tendencia del resto de los tratamientos. Es decir, a pH 6 se esperaba que el cultivo se comportara de manera similar a los pH 5 y 7, pero resultó comparable al tratamiento a pH 2 (Figura 9).

Con respecto al biovolumen, se observó una variación a los diferentes pH ensayados. A mayor valor de pH las células resultaron de mayor biovolumen (Figura 10). A pH 2 se registró el menor volumen celular, resultando menor que el inicial. Por su parte, a pH 3 se mantuvo el biovolumen celular similar al inicial y para el resto de los valores de pH se observaron volúmenes celulares cada vez mayores (Figura 10).



Figura 10Biovolumen de K. rhaphidioides a diferentes valores de pH (inóculo inicial y<br/>finales para cada tratamiento). Las letras indican los grupos homogéneos.

En la Figura 11 es posible observar que la concentración de clorofila *a*, en la extracción sin ruptura mecánica, fue significativamente mayor en pH 4 y menor en pH 2, seguido por los pH 3, 5, 6 y 7. Aunque estadísticamente estos últimos tratamientos de pH se encuentren solapados, la media de pH 6 fue la mitad que las de 5 y 7, mientra que fue 1/3 que la media de pH 3.



Figura 11 Concentración de clorofila *a* (primera extracción) a diferentes valores de pH para
*K. rhaphidioides.* Valor del inóculo inicial y valores finales para cada uno de los pH ensayados.
Las letras indican los grupos homogéneos.

En la extracción de clorofila con ruptura mecánica de células, las concentraciones resultaron semejantes para todos los pH, excepto pH 2 y 3 (Figura 12), las que difirieron significativamente del resto y entre sí. Asimismo, la concentración de clorofila determinada para cada tratamiento, prácticamente superó en un orden de magnitud a la determinada en la primera extracción, excepto para pH 2.



Figura 12 Concentración de clorofila *a* (segunda extracción) a diferentes valores de pH para
*K. rhaphidioides.* Valor del inóculo inicial y valores finales para cada uno de los pH ensayados.
Las letras indican los grupos homogéneos.

Debido a que se realizaron dos extracciones para cada uno de los filtros, y que se
obtuvieron resultados diferentes en cada extracción, se muestra en la Figura 13 la suma de los valores de ambas extracciones. Puede verse en este caso también que los pH 2, 3 y 6 presentaron diferencias significativas entre sí y con respecto al resto de los tratamientos. Por otra parte 4 y 5 no presentaron diferencias significativas entre ellos y pH 7 no se discriminó estadísticamente de 4, 5 y 6. Cabe aclarar que no se observan barras de error a pH 2 y 3, debido a que la variación resultó mínima con respecto a la escala.



Figura 13 Concentración de clorofila *a* total a diferentes valores de pH para *K*. *rhaphidioides*. Valor del inóculo inicial y valores finales para cada uno de los pH ensayados considerando la sumatoria de ambas extracciones. Las letras indican los grupos homogéneos.

En la Figura 14, puede verse que el contenido de clorofila *a* por célula se incrementó con el aumento del pH. Sin embargo, los análisis estadísticos arrojaron como resultado tres grupos con diferencias significativas entre ellos: pH 2, pH 3 y 4 y pH 5, 6 y 7. Este resultado fue consistente con el incremento en biovolumen de las células a medida que aumentaba el pH, ya que se observaron con un cloroplasto conspicuo en todos los casos, excepto a pH 2.



Figura 14 Contenido de clorofila *a* total (suma de ambas extracciones) por célula a diferentes valores de pH para *K. rhaphidioides*. Las letras indican los grupos con diferencias significativas (p<0,05).

Por su parte, la fluorescencia *in vivo* no mostró diferencias significativas entre los pH 3 a 7 (p>0,05) pero sí entre pH 2 y el resto (p<0,05) Como se observa en la Figura 15, a pH 2 las células fueron disminuyendo su fluorescencia en los primeros días y luego permanecieron prácticamente constantes con valores menores inclusive a los del inóculo inicial (Figura 15). Se muestran los valores de unidades relativas de fluorescencia (URF) con respecto al inóculo inicial, lo que indica que en los 17 días que duró el experimento los cultivos aproximadamente triplicaron su fluorescencia.



Figura 15 Mediciones diarias de fluorescencia *in vivo* de *K.rhaphidioides* para cada pH ensayado. En la tabla a la derecha del gráfico se indican los grupos homogéneos.

La cantidad de fluorescencia por unidad de clorofila (cociente entre fluorescencia *in vivo* y concentración de clorofila, Figura 16), considerando para ello la primera extracción de clorofila, mostró que se pueden diferenciar tres grupos: pH 2, pH 3 y 4 y pH 5, 6 y 7 (Figura 16).



Figura 16 Cociente entre fluorescencia *in vivo* y clorofila *a* extraída de *K. rhaphidioides* a diferentes valores de pH.

Con la densidad celular y el biovolumen se calculó la biomasa algal (peso fresco) la que resultó mayor a pH 7, seguida de los pH 4, 5, 6, 3 y 2 (Figura 17). A pH 2 el cultivo

mostró una biomasa menor que la del inóculo inicial (Figura 17).



Figura 17 Biomasa del inóculo inicial (inicial) y de los diferentes valores de pH al final del ensayo. Las letras representan los grupos homogéneos.

De acuerdo con la densidad celular, a pH 4 y 3 fue donde se obtuvieron más cantidad de divisiones celulares, pero esto no se vio reflejado en los resultados de biomasa, pues con el incremento del pH ocurrió un incremento del biovolumen que hizo que la mayor biomasa se registrara a pH 7. Estadísticamente no se diferenciaron los grupos, pero la tendencia de agrupamiento es pH 2, pH 3, pH 4, 5, 6 y pH 7.

La tasa de crecimiento calculada en base a la densidad celular (Figura 18), mostró los mayores crecimientos a pH 3 y 4 seguidos por pH 5 y 7. Resultó evidente que a pH 2 las algas no prosperaron, así como tampoco a pH 6. Vale aclarar en este punto que el resultado de pH 6 estuvo distorsionado por la disparidad de las réplicas como se explicó anteriormente. Los grupos estadísticos resultaron iguales a los de la densidad celular.



Figura 18 Tasas de crecimiento para los diferentes valores de pH calculadas a partir de la densidad para *K. rhaphidioides*.

# 5.3.1.2 <u>Luz</u>

La tasa de fotosíntesis mostró que el máximo de producción de oxígeno se ubicó alrededor de los 100 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de PAR (Figura 19), intensidad a partir de la cual ocurrió un descenso (fotoinhibición).



Figura 19Tasa de fotosíntesis para K. rhaphidioides. Los puntos representan las réplicas y<br/>la línea llena el ajuste al modelo tangente hiperbólica.

En el experimento a baja intensidad lumínica (Figura 20) no se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento. Por otra parte se vio en los recuentos celulares (datos no mostrados) que en la mayor intensidad ensayada (70 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) se obtuvo la mayor cantidad de células, mientras que en oscuridad hubo una disminución inicial en el número de células que luego se mantuvo prácticamente constante en el tiempo. Esto generó que la tasa de crecimiento para dicho tratamiento fuera negativa (Figura 20). Es importante comentar que los cultivos que estuvieron en oscuridad, al final del experimento se les quitó el envoltorio de aluminio y al cabo de aproximadamente dos semanas, se habían recuperado. Si bien no se hicieron recuentos celulares, dicha observación es suficiente para poner en evidencia que no todas las células murieron durante el período con ausencia de luz.



Figura 20 Tasas de crecimiento a bajas intensidades lumínicas para *K. Rhaphidioides*. Las letras representan los grupos homogéneos.

En la Figura 21 se muestran las transmitancias de los papeles de celofán utilizados, en donde se aprecia el espectro lumínico recibido por cada tratamiento.



Tabla 3 Porcentajedetransmitancia entre 400y 750 nm, para cadaunodelosfiltrosensayados(papelcelofán) con respecto alincoloro.

incoloro

amarillo

verde

rojo azul

Filtro	%
Incoloro	100
Verde	55,48
Rojo	44,43
Azul	56,48
Amarillo	68,7

Figura 21 Transmitancias de los filtros utilizados en función de la longitud de onda (WL).

La simulación de diferentes calidades de luz (colores) mostró valores de fluorescencia *in vivo* similares, al final del experimento para cada color, a pesar del diferente espectro lumínico recibido por cada tratamiento (Figura 22). Todos los colores ensayados mostraron menores valores finales de fluorescencia *in vivo* (cerca del 50% menos) que el control (incoloro), pero debe considerarse que la transmitancia de los filtros utilizados fue de aproximadamente la mitad que la del celofán incoloro (Figura 21, Tabla 3). Es notable la separación de las curvas a partir del día 7 y hasta el día 26. En el día 14 se vieron diferencias significativas entre los tratamientos distinguiéndose rojo y verde por un lado y amarillo y azul por otro. El control resultó significativamente diferente al resto de los tratamientos .



Figura 22 Fluorescencia *in vivo* de *K. rhaphidioides* a lo largo de la incubación con diferentes espectros lumínicos.

Las tasas de fotosíntesis medidas al final de la incubación para los diferentes colores mostraron diferencias significativas entre dos grupos (Figura 23). El tratamiento incoloro (control) mostró las mayores tasas de producción de oxígeno, seguido por los tratamientos azul y verde, y rojo y amarillo, aunque no se alcanzaron a discriminar estadísticamente.



Figura 23 Tasas de fotosíntesis con los diferentes espectros lumínicos para K. rhaphidioides.
Las intensidades lumínicas fueron 0 y 80 μmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 5.3.2 <u>*P. simplex*</u>

# 5.3.2.1 <u>pH</u>

La mayor fluorescencia *in vivo* al final del experimento de crecimiento de *P. simplex* ocurrió para los valores de pH 3 y 4, como se observa en la Figura 24, mientras que a pH 7 se registró el menor valor. Estadísticamente se formaron tres grupos: pH 3, 4 y 5; pH 4, 5 y 6 y pH 5, 6 y 7. Las tasas de crecimiento calculadas en la fase exponencial (*i.e.* entre los días 3 y 6), tendieron a disminuir con el aumento del pH (Figura 25). Aunque estadísticamente los tratamientos se mostraron superpuestos, hubo cuatro grupos homogéneos señalados en la figura con letras. Nótese que tanto pH 3 como pH 7, pertenecen a distintos grupos.



Figura 24 Fluorescencia *in vivo* a lo largo del ensayo a diferentes valores depH para *P. simplex*.



Figura 25 Tasa de crecimiento de *P. simplex* a diferentes valores de pH. Las letras representan grupos homogéneos.

Cabe señalar que con esta cepa se trabajó con fluorescencia *in vivo* debido a la importante variación en los recuentos celulares al microscopio. La presencia de mucílago apical permitió la fijación de las células a las superficies, descripto en el capítulo 1 (Figura 8 F, G), impidiendo la distribución homogénea de las mismas para su conteo en las cámaras de decantación. En consecuencia, los recuentos celulares realizados mostraron marcadas diferencias con las mediciones de fluorescencia *in vivo*, así como grandes oscilaciones entre un recuento y el siguiente, con lo cual no resultó confiable realizar el seguimiento del cultivo a través de ese método.

#### 5.3.2.2 <u>Luz</u>

La tasa de fotosíntesis para *P. simplex* en función de la cantidad de luz mostró que el máximo de producción de oxígeno ocurrió alrededor de los 200 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 26), permaneciendo prácticamente constante para las mayores intensidades medidas (no se observó fotoinhibición).



Figura 26 Tasa de fotosíntesis para *P. simplex*. Los puntos representan las réplicas y la línea llena el ajuste al modelo de la tangente hiperbólica.

# 5.3.3 <u>W. caviahuensis</u>

### 5.3.3.1 <u>pH</u>

Al final del experimento se observó que todos los tratamientos a diferentes valores de pH mostraron aproximadamente la misma tendencia de crecimiento, excepto pH 2 en donde la cantidad de células fue menor (Figura 27). Estadísticamente se diferenciaron dos grupos: pH 2, pH 3, 4, 5 y 6 y pH 7. Los recuentos celulares se realizaron discriminando la totalidad de las células así como cada una de las dos morfologías por separado (como se indicó en la sección Materiales y Métodos). Sólo se presentan los gráficos correspondientes a las células totales, ya que los otros recuentos mostraron una tendencia similar.



Figura 27 Densidad celular total a diferentes valores de pH para *W. caviahuensis*.

No se observó una clara alternancia de morfologías en *W. caviahuensis*, debido a que cuando las células recién salieron de la célula madre, poseían una forma elipsoidal que se fue haciendo esférica conforme crecieron. No se observó predominancia de alguna de las formas relacionada con algún tratamiento. En general, la cantidad de células elipsoidales fue mucho mayor que la de células esféricas, debido a que cada célula esférica produce al menos 16 células hijas (elipsoidales). Por otro lado, se observó que a pH 2 la tasa de crecimiento resultó menor que en el resto de los tratamientos (Figura 28), aunque sin diferencias significativas, traduciéndose en una menor densidad celular al finalizar el ensayo (Figura 27).



Figura 28 Tasa de crecimiento de *W. caviahuensis* a diferentes valores de pH.

### 5.4 Discusión

De acuerdo con los datos de densidad celular a diferentes valores de pH para las tres cepas ensayadas, puede decirse que se trata de especies acidófilas aunque no extremófilas, pues el pH óptimo de crecimiento se encontró entre 3 y 5. En el caso de K. rhaphidioides se observó que a pH 2 las células no fueron capaces de crecer y mostraron tasas de crecimiento negativas. Asimismo, las células cambiaron su morfología en los diferentes tratamientos, más precisamente aumentaron su biovolumen con el incremento del pH. A pH 4 se obtuvo la mayor densidad celular aunque no se observó lo mismo con la biomasa, ya que el biovolumen celular aumentó con el pH, resultando en los mayores valores de biomasa a pH 7. Esto indicaría que a pH cercanos a 4 esta especie presenta el óptimo de su crecimiento desde el punto de vista de la división celular, mientras que a pH más altos las células lograrían aumentar de tamaño aunque con una tasa de división menor. En cuanto a la extracción de clorofila sin ruptura mecánica de células (primera extracción), fue posible observar que la cantidad de clorofila mostraba valores menores con el aumento del pH, lo que parecía estar en contradicción con las densidades celulares y las mediciones de fluorescencia in vivo. En consecuencia, al realizar una nueva extracción de clorofila en los mismos filtros, rompiendo las células con Nlíq, se encontró que de ese modo las cantidades de clorofila resultaron similares en los distintos tratamientos. Esto sugiere que la pared celular de los cultivos a mayores pH tendría particularidades que le confieren una permeabilidad diferencial. Podría postularse que la síntesis de pared celular no se detiene con el aumento del pH y al no haber división de las células, la pared que se sintetiza engrosa la existente, dificultando así la extracción de la clorofila. Exceptuando pH 2, en donde las células no prosperaron y pH 3, en donde la cantidad total de clorofila (i.e. la suma de clorofila extraída en las dos extracciones) resultó significativamente menor que para el

resto de los tratamientos, podría inferirse que la concentración de clorofila se mantiene constante entre los tratamientos. Esto se explica porque en los cultivos en los que hubo una menor cantidad de células, éstas poseían un mayor biovolumen. Esta diferencia fisiológica no fue evidente, sin embargo, en las mediciones de fluorescencia in vivo. La fluorescencia *in vivo* es una medida relativa que depende de varios factores, entre ellos, de la concentración de clorofila (Lorenzen, 1966). Para evitar la dependencia con la concentración de clorofila, en general, se construye un índice R que resulta del cociente entre la fluorescencia in vivo y la concentración de clorofila extraída. De esta manera, se obtiene un indicador que depende del estado fisiológico de las células, de la historia lumínica previa (fotoinhibición, fotoadaptación) y de la composición de la comunidad (Blasco, 1973; Kiefer, 1973 a, b; Loftus and Seliger, 1975; Heaney, 1978; Vincent, 1983). Al trabajar con una misma especie algal y con tratamientos con una historia lumínica comparable, los valores que presente R dependerán entonces del estado fisiológico de las células producto del tratamiento (en este caso, pH). En el ensavo con K. rhaphidioides se vio que los valores de R fueron consistentes con los de densidad y fluorescencia in vivo. A pH 2 el valor de R fue el mayor, por el contrario los pH 3 y 4 tuvieron el menor valor de R. Con respecto a los otros tres tratamientos (pH 5, 6 y 7) mostraron valores intermedios de R. En el lago Caviahue es posible encontrar valores de R comparables a los de este experimento (Diaz y Baffico, com. pers.).

Coincidente con el óptimo de pH encontrado en laboratorio, *K. rhaphidioides* muestra sus mayores valores de densidad y biomasa en el lago Caviahue (Beamud *et al.*, 2010). Por su parte, en los sectores del Río Agrio Inferior con valores de pH mayores a 3 la especie se encuentra presente aunque no muestra desarrollos importantes (Baffico, 2010), mientras que en el Río Agrio Superior (pH < 3) no fue registrada (Baffico *et al.*, 2004).

Para el caso de *P. simplex*, la mayor tasa de crecimiento se obtuvo a pH 3 mientras que la mayor densidad celular ocurrió a pH 3-4. Asimismo, pudo comprobarse que toleró bien los valores mayores de pH, aunque las tasas de crecimiento resultaron menores. Por lo tanto, puede afirmarse que aunque se trata de una especie acidófila, tiene un amplio rango de tolerancia de pH.

*W. caviahuensis*, como se dijo en la descripción de la especie (capítulo 1), presenta dos morfologías: esférica y elipsoidal. Al considerar la totalidad de células, es decir ambas morfologías sumadas, puede decirse que el pH óptimo de crecimiento estuvo alrededor de 5, tanto en número de células (densidad) como en tasa de crecimiento. Considerando que la morfología esférica es adoptada cuando se forma la célula madura y se produce la división celular y que cada célula madre genera al menos 16 células hijas, es esperable que la morfología elipsoidal sea la predominante en un cultivo que se está dividiendo activamente. Por su parte, a pH 2 donde se observó el menor crecimiento, los recuentos mostraron una mayor densidad de células esféricas, lo que condice con lo expuesto precedentemente.

Las variaciones en las tasas de crecimiento así como en la morfología celular (biovolumen) que presentó *K. rhaphidioides* a diferentes valores de pH han sido registradas previamente para otras especies de microalgas por Hargreaves & Whitton (1976). Estos autores, aislaron de un ambiente ácido las siguientes especies: *Chlamydomonas applanata* var. *acidophila, Euglena mutabilis, Gloeochrysis turfosa, Hormidium rivulare, Stichococcus bacillaris.* En el trabajo no explicaron la razón de los cambios en la morfología y la tasa de crecimiento, aunque supusieron que como el pH está asociado a la calidad y cantidad de elementos en solución, las variaciones de pH generarán variaciones en la biodisponibilidad de los nutrientes, principalmente Fe. Por otra parte Hansen (2002), realizó estudios sobre el efecto del pH en las tasas de

crecimiento de microorganismos marinos (rango de pH entre 8 y 10) y encontró que existían variaciones en las tasas de crecimiento que no podían ser atribuidas a estrés nutricional, porque el medio de cultivo empleado poseía cantidades y biodisponibilidad suficientes de todos los nutrientes aún a los pH ensayados. Hansen (2002) plantea en ese trabajo, como posibilidad, que el cambio en la disponibilidad de C relacionada con el pH, sea el responsable de la diferencia en las tasas de crecimiento. Si fuera así, podría relacionarse la disponibilidad de C con los cambios en la morfología celular que se encontraron en K. rhaphidioides. A mayor pH hubo mayor biovolumen, es decir que las células emplearon una mayor cantidad de C en la síntesis de pared. Por otra parte, se vio en las extracciones de clorofila que a mayor pH las células presentaron una permeabilidad diferencial, posiblemente debido a una pared más fuerte o gruesa. Puede postularse entonces que al tener mayor disponibilidad de C, debido al mayor pH, las células asignarían ese recurso a la síntesis de pared resultando en un cambio morfológico tanto de la célula en sí misma (biovolumen) como de la pared (permeabilidad). Por otra parte, existe una diferencia de potencial eléctrico entre el medio exterior y el interior de la célula que contribuye a que ocurra cierto flujo de H<sup>+</sup> (Remis et al., 1992), generándose un simporte de nutrientes. Al modificarse el pH del medio, se modifica también la tasa de flujo de H<sup>+</sup> y con ello la incorporación de nutrientes (Gross, 2000). Este proceso podría ser el responsable tanto de las tasas de crecimiento como de la morfología celular, en el caso de K. rhaphidioides con la siguiente dinámica: a mayor pH, mayor disponibilidad de C, pero menor simporte de nutrientes, entonces la tasa de ingreso de nutrientes a la célula no es suficiente para que ésta se divida, disminuyendo así la tasa de división. El C, entonces es acumulado en la pared, ya que la proporción de P y N es mucho menor que en enzimas, proteínas, ácidos nucleicos y todo lo que requiere una división celular, incrementándose el biovolumen. Cuando la cantidad de nutrientes incorporada es suficiente, se produce la división

celular.

Las tasas de fotosíntesis y respiración a diferentes pH permiten comparar el desempeño de las especies acidófilas frente a especies similares pero de ambientes neutros, como por ejemplo los estudios realizados para *C. acidophila* y *C. reinhardtii* que posibilitaron determinar el grado de adaptación al ambiente de cada una (Gerloff-Elias *et al.*, 2005). En el caso de las especies analizadas en este trabajo, resultaron capaces de tolerar un rango de pH bastante amplio, aunque no se encontraron en cuerpos de agua neutros aledaños al sistema río Agrio-lago Caviahue.

Considerando que algunas especies de microalgas tienen su máxima tasa de fotosíntesis a 1000 umol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> o 500 umol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, para ciertos casos de fotoaclimatación (MacIntyre et al., 2002), las tasas de fotosíntesis medidas en K. rhaphidioides y P. simplex sugieren que estas cepas podrían estar adaptadas a bajas irradiancias. Además de que el máximo en las tasas de fotosíntesis se ubicó en 100 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> para K. rhaphidioides y en 200 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> para P. simplex, K. rhaphidioides demostró ser capaz de crecer aún a intensidades de luz tan bajas como 12 umol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, aunque no hava sido esa la intensidad de luz óptima de crecimiento. En el lago Caviahue se registra una alta irradiancia subsuperficial que alcanza los 1600  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de PAR, aunque la atenuación en profundidad es diferencial para las distintas longitudes de onda del espectro visible. Por ejemplo, la radiación UV se absorbe en los primeros centímetros bajo la superficie del agua y el 1% de la radiación de la longitud de onda del espectro visible que más penetra (565 nm), se registra a los 13 m de profundidad (Baffico, 2013). Esta atenuación lumínica diferencial es atribuida a la alta concentración de Fe (III) (Baffico 2013), ya que se trata de un ambiente pobre en COD (Beamud et al., 2010). La posible adaptación a bajas irradiancias de las algas, junto con el hábito cocoide que poseen y las características ópticas del lago permiten

que *K. rhaphidioides* sea capaz de fotosintetizar con bajas intensidades de luz. La zona fótica del lago Caviahue comprende una porción relativamente pequeña del cuerpo de agua ya que el lago tiene una profundidad máxima de 90 m. Probablemente, las ya mencionadas características ópticas del lago favorezcan que *P. simplex* se encuentre en la zona litoral, que se caracteriza por estar completamente en la capa fótica. Experimentos con altas irradiancias lumínicas permitirían evaluar la capacidad de adaptación de estas cepas a esas condiciones.

Los resultados obtenidos en el ensavo a bajas intensidades lumínicas en K. rhaphidioides concuerdan con la mencionada adaptación a baja irradiancia. A 70 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> es donde se dio el máximo crecimiento, aunque el cultivo también prosperó a las intensidades menores, casi sin diferencias entre estas últimas. La menor intensidad ensayada fue de 12 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, resultando este valor muy similar al 1% del PAR que se registra en el lago (Baffico, 2013). Como consecuencia de la atenuación lumínica diferencial que ocurre en el lago, es interesante mencionar que la longitud de onda de mayor penetración (565 nm) corresponde al color verde y es el color que no absorbe la clorofila a. K. rhaphidioides posee pigmentos accesorios como todas las Chlorophyta, aunque el principal pigmento captador de luz es la clorofila a. Por lo tanto, el hecho de encontrarse en el lago a profundidades a las que este pigmento no resulta útil, es un dato a favor de la mixotrofia sugerida para esta especie en el trabajo de Beamud et al. (2007). Otra observación que surgió del experimento fue que en oscuridad la densidad celular decayó en los primeros 7 días del ensayo (aproximadamente un 30%), pero luego se mantuvo constante. Cuando finalizó el ensayo, el cultivo fue capaz de recuperarse al ser expuesto nuevamente a la luz. Esta capacidad sugiere un mecanismo a estudiar, por el cual, las células poseerían algún tipo de estadio de "espera" en el que la fotosíntesis se encuentra suspendida y las células no disponen de otra forma de C.

En el ensayo con distintas calidades de luz (diferentes climas ópticos) todos los filtros empleados resultaron en crecimientos similares. Con el papel incoloro, el crecimiento fue ca. 50% superior al resto de los colores aunque hay que considerar que la intensidad de luz que atravesó ese papel fue aproximadamente un 50% mayor. Al observar los espectros de transmitancia de los filtros, excepto el azul, todos presentaron una gran absorbancia en las menores longitudes de onda y una leve atenuación en el pico de absorción de la clorofila a 665 nm. Por lo tanto, no resultó extraño que las pendientes de crecimiento para los cuatro colores fueran similares, pues las algas estarían fotosintetizando principalmente con la irradiancia recibida en 665 nm, independiente del resto del espectro presente. Ha sido observado que la tasa de fotosíntesis suele coincidir con los picos de absorbancia de los pigmentos predominantes (Haxo & Blinks, 1950; Wang et al., 2007). Resulta coincidente entonces que los cultivos sometidos a diferentes climas ópticos posean curvas de crecimiento sin diferencias significativas (al final del experimento), considerando que estarían empleando para la fotosíntesis la energía captada mayoritariamente por el pico de absorción de la clorofila a de 665 nm. Por otra parte, si se observa el tramo de las curvas que van entre los días 11 y 21, se diferencian dos grupos: rojo-verde y azulamarillo. Luego de ese período, los tratamientos vuelven a igualarse resultando en que no mostraron diferencias significativas al final del experimento. Falkowsky & La Roche (1991) explican el término fotoaclimatación como un ajuste fenotípico que se da como respuesta a cambios en factores ambientales, que sucede en poco tiempo, siempre menor a una generación celular. Luego plantean la diferencia con fotoadaptación como un cambio genotípico que surge en respuesta a cambios ambientales. Y proponen que la irradiancia tiene mayor peso en estos procesos que la calidad del espectro lumínico. K. *rhaphidioides* posee una tasa de crecimiento del orden de 0,1 día<sup>-1</sup>, según se determinó en otros experimentos. Es decir que a los 11 días de cultivo se habría dividido al menos

una vez por completo (es decir que todas las células del cultivo original se dividieron al menos una vez). Además la transmitancia de los filtros de colores era similar entre ellos y aproximadamente del 50% que la del incoloro, por lo que podría decirse entonces que se dio un proceso de fotoadaptación en el experimento. Son necesarios estudios en este sentido que puedan ampliar el conocimiento sobre la estrategia fotosintética de las especies utilizadas en esta tesis.

A partir de los parámetros de ajuste al modelo tangente hiperbólica para las tasas de fotosíntesis de las cepas ensayadas se vió que tanto *K. rhaphidioides* como *P. simplex* poseen un punto de compensación lumínica bajo. Así *K. rhaphidiodes*, es un alga pelágica en una columna de agua donde el Fe se encuentra en altas concentraciones y genera una rápida extinción del PAR, quedando el 1% a los 15 m aproximadamente (Baffico, 2010). *P simplex*, es perifítica y debido a que en la zona litoral se forman biofilms que atenúan la irradiancia, resulta una adaptación positiva el hecho de poseer un I<sub>k</sub> bajo.

Capítulo 3:

Fuentes de Nitrógeno y Fósforo

### 6 <u>Capítulo 3: Fuentes de Nitrógeno y Fósforo</u>

### 6.1 Introducción

Recapitulando la descripción del área de estudio, tanto el río Agrio como el lago Caviahue poseen pH extremadamente bajos. Desde *ca*. 1,8 en el río Agrio Superior, a la altura de su desembocadura en el lago, hasta *ca*. 2,6 en el río Agrio Inferior, cerca de las nacientes en el lago (Pedrozo *et al.*, 2001), el bajo pH hace que predominen ciertas especies químicas en solución. Particularmente en este capítulo nos ocuparemos del nitrógeno y del fósforo, ya que forman parte de los macronutrientes que utilizan las algas.

La nitrificación está inhibida a bajo pH con lo cual la principal forma inorgánica esperable del N en condiciones naturales será el ion amonio (Schindler *et al.*, 1985). De acuerdo con los resultados de Baffico (2010) en el río Agrio, tanto Superior como Inferior, el N se encuentra mayoritariamente como NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Por otra parte, en el lago Caviahue la relación N:P así como la concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN) son bajas (Pedrozo *et al.*, 2001; Beamud *et al.*, 2007), por lo que el N estaría limitando el crecimiento algal (Beamud *et al.*, 2010). A partir de los trabajos de Beamud *et al.* (2007, 2010 y 2014) se sabe que el fitoplancton del lago Caviahue posee la capacidad de incorporar compuestos nitrogenados orgánicos, lo que les permite suplir las deficiencias de N del sistema.

En el caso del P, Pedrozo *et al.* (2001) midieron fósforo reactivo soluble (PRS) y encontraron valores de alrededor de 2 mg l<sup>-1</sup> en el RAS y 400 µg l<sup>-1</sup> en el lago y en el RAI, por lo que no sería un nutriente limitante. La concentración de P total en los sedimentos del lago Caviahue es alta si se la compara con otros cuerpos de agua de la

región y la fracción principal de P se encuentra asociada a materia orgánica (Temporetti et al., 2013). La extrema acidez en el RAS y el lago, favorece las reacciones que mantienen al P en solución lo que resulta en una elevada relación PRS:PT (fósforo total) (Pedrozo et al., 2001). En cambio en el RAI, como sus aguas se van neutralizando a medida que ríos tributarios se van uniendo, la disponibilidad de P se ve afectada por distintos procesos. A pH >3,5 precipitan oxihidróxidos de Fe, que secuestran P disuelto, lo que lleva a una menor biodisponibilidad para las algas (Tate et al., 1995; Niyogi et al., 1999). Estos precipitados de Fe son susceptibles a la fotorreducción y pueden pasar nuevamente al estado disuelto (Tate et al., 1995). Así, en el RAI se puede esperar un ciclo diario de disponibilidad de P asociado al ciclo del Fe (Parker et al., 2008). Por lo tanto, durante las horas del día en las que la irradiancia es suficiente para reducir el Fe, el P estaría biodisponible, precipitando nuevamente cuando disminuve la intensidad lumínica. A pH > 4,5 se produce la precipitación de oxihidróxidos de aluminio (Parker et al., 2008), los que también ligan P disminuyendo su biodisponibilidad (Niyogi et al., 1999). En este caso, los precipitados de aluminio no sufren transformación por la luz, con lo cual, la captura de P es permanente (Niyogi et al., 1999).

### 6.1.1 Objetivo

El objetivo de este capítulo fue analizar la capacidad de las especies algales aisladas del sistema río Agrio-lago Caviahue de incorporar N y P a partir de diferentes fuentes, tanto inorgánicas como orgánicas.

# 6.2 Materiales y Métodos

#### 6.2.1 <u>Fuentes de Nitrógeno</u>

Se ensayó la incorporación de N a partir de diversas fuentes, tanto inorgánicas como orgánicas. Debido a que las algas se aislaron en medio mineral de cultivo, la fuente de N del medio (KNO<sub>3</sub>) se utilizó como control. Los bioensayos se realizaron con dos cepas aisladas del lago Caviahue, *K. rhaphidioides* y *P. simplex*. En el caso de *K. rhaphidioides*, los tratamientos con N inorgánico fueron los siguientes: KNO<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, mientras que las fuentes orgánicas fueron: urea, leucina y ácido aspártico. Debido a limitaciones de espacio en la cámara de cultivo, el ensayo se realizó con: KNO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, urea, leucina y ácido aspártico.

Para ambas cepas se partió de un cultivo en medio 7LCS +  $\mu$ (A) que se encontraba creciendo a 8°C y luz continua (80  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) y se reemplazó en el mismo medio de cultivo con la fuente de N correspondiente a cada tratamiento, manteniendo la concentración original de N que contenía el medio (1 mM). Los medios fueron preparados sin N, esterilizados por autoclavado tal como se indica en la sección Materiales y Métodos generales y luego se adicionó cada fuente de N esterilizada por filtración. En todos los ensayos se reemplazó el (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> de la solución de micronutrientes por Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> a fin de evitar NH<sub>4</sub><sup>+</sup> extra. En el primer experimento con *K. rhaphidioides* se trabajó sin quelante (NTA) en la solución de micronutrientes y en el segundo experimento, así como para *P. simplex*, el medio contenía NTA. En todos los casos se utilizaron frascos de cultivo estériles de 50 ml, conteniendo 20 ml de medio, donde se inocularon 20  $\mu$ l de cultivo en el primer ensayo de *K. rhaphidioides* y 70  $\mu$ l en los otros dos. El cultivo se concentró mediante decantación, luego se tomaron con una

micropipeta 2 ml del fondo y se transfirieron a un tubo Eppendorf, de allí homogeneizando cada vez por "*up and down*" con la micropipeta, se inocularon los frascos de cultivo.

Los frascos se incubaron en la cámara de cultivo en las mismas condiciones mencionadas y se rotaron diariamente de modo manual. El crecimiento se midió por recuento celular y en el caso de *K. rhaphidioides*, se tomaron alícuotas de 0,5 ml, se fijaron con lugol acético y se contaron empleando cámaras multipozos de 176,7 mm<sup>2</sup> de superficie como cámara de decantación y tomando fotografías en el microscopio invertido. En cambio *P. simplex* se contó directamente en los frascos de cultivo. El primer ensayo con *K. rhaphidioides* se extendió 21 días y el segundo junto con el de *P. simplex*, 15 días. Los detalles del equipamiento y los métodos citados se encuentran en la sección de Materiales y Métodos generales.

### 6.2.2 Fuentes de Fósforo

Con las mismas cepas de los experimentos de N se probó la incorporación de P orgánico. Al igual que para N, el medio mineral de cultivo en que se aislaron las cepas se tomó como control. Por lo tanto la fuente control (inorgánica) fue NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se probó como fuente orgánica  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -Gly). Se partió de un precultivo en 7LCS +  $\mu$ (A) a 8°C y luz continua (80  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), se trabajó en cámaras multipozos estériles de 176,7 mm<sup>2</sup> de superficie y 3 ml de capacidad. Éstas se llenaron con 2 ml de medio de cultivo. A cada medio se le agregó la fuente de P correspondiente antes de su esterilización y la concentración de P en ambos casos fue la que tenía el medio original (0,1 mM). Las cámaras de recuento se inocularon con 200  $\mu$ l de cultivo y el crecimiento se midió por recuentos celulares con el método de Utermöhl a través de fotografías en el microscopio invertido en la misma cámara. Las cámaras se incubaron

en las mismas condiciones del precultivo. El ensayo se extendió por 11 días y se calcularon las tasas de crecimiento de los cultivos en la fase exponencial.

# 6.3 **Resultados**

### 6.3.1 Fuentes de Nitrógeno

### 6.3.1.1 K. rhaphidioides

En el primer ensayo de *K. rhaphidioides*, fue posible apreciar que las fuentes que presentaron mayor densidad celular fueron KNO<sub>3</sub>, urea y leucina con entre 40 y poco más de 60 000 cél. ml<sup>-1</sup> al final del experimento (Figura 29). El resto de los tratamientos no superaron las 20 000 cél. ml<sup>-1</sup>. A nivel estadístico, se formaron tres grupos significativamente diferentes: por un lado KNO<sub>3</sub> y urea, por otro leucina y urea, y el tercero formado por el resto de las fuentes de N ensayadas.



Figura 29 Densidad celular de *K. rhaphidioides* con diferentes fuentes de N. En la tabla se muestran los grupos estadísticos homogéneos.

En el segundo ensayo para esta cepa, se observó que tanto en NH<sub>4</sub>Cl como en urea crecieron sin diferencias significativas entre sí y resultaron diferentes del control (Figura 30).



Figura 30 Densidad celular de *K. rhaphidioides* para KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y urea. En la tabla se muestran los grupos estadísticamente homogéneos.

# 6.3.1.2 <u>P. simplex</u>

Se observó al final del experimento que estadísticamente se diferenciaron tres grupos: leucina fue el que mostró mayor densidad celular, seguida de urea, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>Cl y finalmente KNO<sub>2</sub> (Figura 31).



Figura 31 Densidad celular de *P. simplex* para distintas fuentes de N. Se muestran los grupos estadísticamente homogéneos (p<0,05) en la tabla de la derecha

Por su parte, las tasas de crecimiento mostraron dos grupos estadísticamente diferentes: KNO<sub>2</sub> mostró diferencias significativas con respecto a urea, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y KNO<sub>3</sub>, pero tanto NH<sub>4</sub>Cl como leucina, no se discriminaron del resto de los tratamientos (Figura 32).



Figura 32 Tasas de crecimiento de *P. simplex* para las diferentes fuentes de N.

# 6.3.2 Fuentes de Fósforo

# 6.3.2.1 K. rhaphidioides

*K. rhaphidioides* incorporó el P de forma orgánica (Figura 33) y una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, la pendiente resultó mayor para el P inorgánico. Eso se vio reflejado en diferencias significativas en la tasa de crecimiento (Figura 34).



Figura 33 Densidad celular para *K. rhaphidioides* con dos fuentes de fósforo. Los tratamientos resultaron significativamente diferentes.



Figura 34 Tasas de crecimiento de *K. rhaphidioides* para las diferentes fuentes de P.

# 6.3.2.2 <u>P. simplex</u>

En *P. simplex* se observó que el alga es capaz de crecer con ambas fuentes de P y que no hubo diferencias significativas entre las mismas, tanto en densidad celular (Figura 35) como en tasa de crecimiento (Figura 36).



Figura 35 Densidad celular para *P. simplex* con dos fuentes de fósforo. Los tratamientos resultaron estadísticamente homogéneos.



Figura 36 Tasas de crecimiento de *P. simplex* para las diferentes fuentes de fósforo.

### 6.4 **Discusión**

K. rhaphidioides, fue capaz de incorporar N orgánico para su crecimiento, ya que los tratamientos con urea y leucina mostraron un incremento en la densidad celular comparable al KNO<sub>3</sub>. Por su parte, el resto de las formas inorgánicas (amonio o nitrito) y orgánicas (ácido aspártico) ensayadas, mostraron densidades celulares menores al tratamiento con nitrato. Weger & Turpin (1989) observaron que Selenastrum minutum (Naeg.) Collins, era capaz de incorporar tanto NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. En dicho trabajo los autores proponen que cuando la célula incorpora NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, el poder reductor generado en las mitocondrias es exportado al cloroplasto para efectuar la reducción de estas formas de N y seguir la vía de síntesis de aminoácidos. En el mencionado trabajo se midió CO<sub>2</sub> liberado en relación al consumo de N, y se encontró que el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> es el que mayor relación poseía, el NO2<sup>-</sup> fue 20% menor y el NH4<sup>+</sup> fue 80% menor (en oscuridad). En el trabajo realizado para esta tesis, la diferencia de crecimiento entre las fuentes inorgánicas de N indicaría que el consumo de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fue comparable y mucho menor que el NO<sub>3</sub>, por lo que la vía metabólica de K. rhaphidioides sería diferente a la propuesta en el trabajo de Weger & Turpin (1989). En las algas, cuando el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> entra a la célula es reducido rápidamente a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por la nitrato reductasa en el citosol. El NO2<sup>-</sup> es conducido al estroma del cloroplasto, donde la enzima nitrito reductasa lo convierte a NH4<sup>+</sup>, para seguir la vía de síntesis de aminoácidos (Ullrich, 1983). En el caso del NH4<sup>+</sup>, una vez que atraviesa la membrana celular, es llevado directamente al estroma del cloroplasto para seguir dicha vía (Ullrich, 1983). El NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ha sido citado como fuente de N (Eppley & Coatsworth, 1968; Azuara & Aparicio, 1983; Yang et al., 2004) aunque las especies capaces de incorporarlo como tal, por ejemplo Chlamydomonas reinhardtii, poseen transportes de membrana específicos para este ion (Galván et al., 1996).En general en los cuerpos de agua, las principales formas

disponibles del N son el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, lo que está regulado por el pH (Robards *et al.*, 1994). En el caso particular del lago Caviahue, la fuente dominante de N es el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, por lo que llama la atención que *K. rhaphidioides* no mostrara un mayor crecimiento con esta forma de N, y sí lo hiciera con nitrato, que no está presente en el ambiente debido al bajo pH. Es probable que no haya habido un gran crecimiento con NO<sub>2</sub><sup>-</sup> así como con NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el ensayo con *K. rhaphidioides*, debido a problemas de biodisponibilidad ya que el medio de cultivo estaba preparado sin quelante. Este supuesto es apoyado por el hecho que en el segundo experimento se adicionó NTA al medio de cultivo, resultando en un crecimiento comparable entre NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

En general, la incorporación de N está intrínsecamente relacionada con la disponibilidad de C (Turpin *et al.*, 1988; Weger & Turpin 1989) pero a pH < 4, condición en la que se desarrollaron los experimentos, el C se vuelve un nutriente crítico debido a su baja concentración. Si el C sólo está biodisponible por difusión y en equilibrio con la atmósfera, los recipientes carecen de agitación constante y hay una superficie de contacto pequeña entre el medio de cultivo y el aire, puede resultar entonces un nutriente limitante. Ha sido observado que en condiciones de enriquecimiento de C, las algas suelen incrementar la tasa de absorción de N en sus tres formas inorgánicas (Rhee, 1978; Azuara & Aparicio, 1983; Aparicio & Quiñones, 1991). En el presente trabajo, el crecimiento con nitrato fue superior a las otras formas de N, mientras que la disponibilidad de C fue la misma para todos los tratamientos, por lo tanto no es posible adjudicar esa diferencia en el crecimiento a una limitación por C.

El pH del medio podría estar implicado en la incorporación diferencial de N. Si bien el pH al que se trabajó (*ca.* 3) resultó óptimo para el crecimiento con  $NO_3^-$ , urea y leucina, no lo habría sido para las otras fuentes nitrogenadas, como sucedió en el trabajo de Morales *et al.* (2006). Esos autores probaron el crecimiento de *Lemna* sp. (una macrófita acuática) con diferentes fuentes de N (urea,  $NO_3^-$  y  $NH_4^+$ ) y valores de pH desde 2 hasta 10. El resultado fue que para una misma fuente de N el crecimiento era diferente según el pH. Por ejemplo, obtuvieron el mejor crecimiento a pH 4 con urea y a pH 6 con  $NH_4^+$ . En nuestro caso, los crecimientos más bajos tal vez estén dados por la combinación entre la fuente nitrogenada y el pH al que se trabajó. Además, para el caso del  $NH_4NO_3$  en el ensayo con *K. rhaphidioides*, podría haber sucedido que la utilización del  $NO_3^-$  se haya visto inhibida por el  $NH_4^+$ , tal como fue observado por Fuggi *et al.* (1981).

Se sabe que la urea es bien asimilada por las algas como fuente de N, pero además aporta C, ya que una vez que ingresa en la célula a través de procesos enzimáticos, se obtiene como productos de reacción, NH4<sup>+</sup> y CO<sub>2</sub> (Berman & Chava, 1999; Pérez-García et al., 2011). Diferentes especies de microalgas son capaces de incorporar diferentes fuentes de N orgánico (Berg, et al., 1997; Berman & Chava, 1999). En el trabajo que realizaron Beamud et al. (2014) en el lago Caviahue, observaron que K. rhaphidioides podía incorporar varias fuentes de N orgánico, entre ellas leucina. Consistente con ese resultado, el primer experimento de K. rhaphidioides con N orgánico mostró un buen crecimiento con leucina. Esta capacidad de incorporar N de manera orgánica que poseen las algas del lago Caviahue les confiere una ventaja adaptativa al tratarse de un ambiente con muy bajas concentraciones de N inorgánico (Beamud *et al.*, 2010). Por otro lado, considerando que debido al pH de dicho ambiente no se encuentra otra forma de C inorgánico más que el CO<sub>2</sub>, las formas orgánicas del N, como la urea, podrían estar aportando también carbono para el crecimiento celular. La capacidad que demostraron tener estas algas, para incorporar nitrógeno orgánico disuelto, sugiere que en el ambiente podrían estar tomando N de manera mixotrófica.

Con respecto al P, fue posible observar que ambas cepas fueron capaces de incorporarlo de forma orgánica. En general los microorganismos y en especial el fitoplancton, liberan fosfatasas que hidrolizan el P de los compuestos orgánicos convirtiéndolo en PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, para luego ser incorporado por las células (Sugiura *et al.*, 1981; Thingstad *et al.*, 1993; Huang & Hong, 1999). Estas fosfatasas pueden ser ácidas o alcalinas, de acuerdo con el pH óptimo de funcionamiento. En el caso de las algas utilizadas en los ensayos, siendo que los pH óptimos de crecimiento estuvieron por debajo de 5, los resultados sugerirían la mediación de fosfatasas ácidas en la incorporación de P orgánico, sin embargo se requieren otros estudios para identificar si se trata efectivamente de un mecanismo como el mencionado.

En el sistema río Agrio-lago Caviahue el P es un nutriente que se encuentra en abundancia y con alta biodisponibilidad (disuelto) (Pedrozo *et al.*, 2001), por lo tanto no sería una ventaja competitiva para las algas poder incorporarlo de manera orgánica.
Capítulo 4:

Fuentes de Carbono

### 7 <u>Capítulo 4: Fuentes de Carbono</u>

#### 7.1 Introducción

Los microorganismos fotosintéticos acuáticos explican casi el 50 % de la producción primaria neta global (Raven, 1997) y debido a su rápida tasa de crecimiento y corto tiempo generacional, se espera que las algas sean más efeicientes que las plantas terrestres en biofijación (Tredici, 2010).

Las algas fijan  $CO_2$  en forma de hidratos de carbono, lípidos y proteínas dentro de sus células, por lo que tienen varios desafíos que enfrentar en la adquisición de  $CO_2$ ambiental, especialmente debido a su baja solubilidad en agua (Fan *et al.*, 2015). Considerando que la difusión del  $CO_2$  en solución acuosa es 104 veces menor que en aire (Spalding, 2008), el primer desafío que estos organismos enfrentan es la necesidad de incorporar  $CO_2$  lo más rápido posible. El segundo desafío está dado por las propiedades de la RubisCO. Esta enzima cataliza dos tipos de reacciones: una que reduce el  $CO_2$  a 3-fosfoglicerato y otra que cataliza una reacción con  $O_2$  cuyos productos son 3-fosfoglicerato y 2-fosfoglicolato, que a través de una serie de reacciones, finalmente libera  $CO_2$  (fotorespiración). La actividad carboxilasa oxigenasa de esta enzima depende de la concentración de esos gases en el medio y a su vez es variable filogenéticamente (Raven, 1997). Por lo tanto, la tasa relativa de oxidación : carboxilación es el factor clave que determina la eficiencia de la fotosíntesis así como la tasa de fijación de  $CO_2$  (Kim, 2014).

Muchas microalgas enfrentan el mencionado desafío de proveer a la RubisCO una concentración de CO<sub>2</sub> tal que funcione como carboxilasa, proceso asociado a los CCM (Giordano *et al.*, 2005) mencionados previamente. Existen varias formas de CCM, pero

en general se trata de reacciones y transportes activos catalizados por enzimas especializadas (anhidrasas carbónicas), tanto de membrana como internas, que permiten la entrada de  $CO_2$  a la célula e incrementan su concentración en el cloroplasto. De esta manera queda favorecida la actividad carboxilasa de la RubisCO (Giordano *et al.*, 2005) al contar con una mayor concentración relativa de C en el sitio activo de la enzima.

En el sistema río Agrio-lago Caviahue, como se dijo en la introducción general, el CID es muy bajo debido al pH del medio (Beamud et al., 2010). Esto podría implicar que el C se vuelva un nutriente limitante para las algas, ya que la RubisCO vería favorecida su actividad oxigenasa. Por otra parte, estudios realizados en el laboratorio indicarían que K. rhaphidioides no posee CCM (Diaz et al., datos no pub.), por lo tanto esta especie tendría comprometida su eficiencia fotosintética. Además, en el lago Caviahue el rango de profundidad del disco de Secchi es de 5,5 a 2,2 m, consecuentemente la luz no está disponible por debajo de los 15 m de profundidad (Beamud et al., 2010), entonces a partir de esa profundidad las algas ya no incorporan CID. Se trata de un lago monomíctico, por lo tanto sólo en la estación fría se produce una mezcla en la columna de agua tal que tanto el CO<sub>2</sub>, como el COD puedan ser homogéneos en la columna de agua. La termoclina se encuentra alrededor de los 35 m de profundidad según Varekamp (2008) y entre los 10 y lo 35 m en las mediciones de Beamud et al. (2010). El perfil térmico sumado a los datos del disco de Secchi, indica que en la última parte de la zona fótica el  $CO_2$  sería escaso en los períodos de estratificación. Sin embargo esto puede quedar compensado por los fuertes vientos, casi diariamente, a los que se encuentra sometida la región, que ocasionan cierto grado de homogeneización de la columna de agua (Varekamp, 2008).

Los organismos mixotróficos son capaces de suplementar facultativamente la incorporación fotoautótrofa de C con heterotrofia (Falkowski & Raven, 2007). Es decir

que cuando las fuentes de carbono inorgánico son insuficientes o bien se encuentra limitado por luz, un organismo mixótrofo puede cambiar la estrategia de incorporación de carbono desde fuentes inorgánicas a fuentes orgánicas (Glibert & Le-Grand, 2006; Flynn *et al.*, 2013). Por otra parte, la mixotrofia juega un rol importante en la red trófica microbiana de los ecosistemas acuáticos (Stoecker, 1998) y ha sido confirmada la existencia de este mecanismo en microalgas por numerosos autores (Graneli *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2009; Tittel *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2011).

Con respecto al fitoplancton, *K. rhaphidioides* es una especie cocoide, dominante en el lago y se encuentra distribuida uniformemente en toda la columna de agua, además de hallarse en el fondo en buen estado fisiológico (Beamud *et al.*, 2014). Estudios recientes demostraron que esta especie incorpora C no sólo inorgánico, sino también de manera osmotrófica (Beamud *et al.*, 2014).

#### 7.1.1 Objetivos

Los objetivos de este capítulo fueron: analizar los efectos del  $CO_2$  en cultivos axénicos de *K. rhaphidioides*, estudiar la relación de este nutriente con la concentración de N y P y caracterizar el crecimiento de las algas expuestas a diferentes fuentes orgánicas de C, tanto en luz como en oscuridad.

#### 7.2 <u>Materiales y Métodos</u>

Se trabajó con *K. rhaphidioides* para probar los efectos de la adición de CO<sub>2</sub> así como para probar la capacidad de incorporar C orgánico. Para ambos experimentos se partió de un cultivo en 7LCS +  $\mu$ (A) que se encontraba creciendo a 8 °C y luz continua (80  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y los experimentos se desarrollaron en esas mismas condiciones de luz y temperatura. En todos los casos el crecimiento de los cultivos fue monitorizado a través de mediciones de fluorescencia *in vivo* y de recuentos celulares.

#### 7.2.1 Efectos del CO<sub>2</sub>

#### 7.2.1.1 Efecto de la concentración de CO2

En este caso se trabajó con cultivos a mayor escala, por lo que se utilizaron envases de tereftalato de polietileno (PET) de 2,25 l en donde se colocaron 2 l de medio de cultivo (7LCS +  $\mu$ (A)) y se sembraron 10 ml de inóculo algal. Los recipientes se taparon con tapones de algodón estériles y se introdujeron dos tubos: uno hasta el fondo del recipiente a través del cual se burbujeó aire con diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>, y otro con una pipeta Pasteur de vidrio en cada extremo del tubo. El mismo se extendió hasta el centro del cultivo, permitiendo la toma de alícuotas para monitorizar el experimento (Figura 37). El seguimiento se realizó a través de la medición de fluorescencia *in vivo*, la concentración de clorofíla *a* extraída y los recuentos celulares.

Se emplearon tres concentraciones de  $CO_2$  que se obtuvieron mediante una mezcla de aire realizada con dos aireadores. Uno de ellos bombeaba aire pasado a través de un filtro de soda-lime, saliendo de allí con 0% de  $CO_2$ . El otro aireador bombeaba directamente aire ambiental. Al regular el flujo de aire de cada aireador mediante llave de paso, se lograba en la unión de los mismos, una concentración diferente de  $CO_2$ . Al principio del experimento, el aire empleado para el burbujeo de los frascos contenía aire sin filtrar por soda lime (aire con 100% de  $CO_2$ ), es decir con la concentración ambiental de  $CO_2$  del laboratorio, luego de 18 días se redujo al 50% de  $CO_2$  y a partir del día 25 se redujo al 0% de  $CO_2$ . Cada concentración de  $CO_2$  (inicial y a lo largo del experimento) se determinó mediante analizador infrarrojo de gases (Qubit System's S151). El gas se burbujeaba en cada recipiente previa filtración por filtro de nylon de 0,2 µm de poro para su esterilización.



Figura 37 Cultivo masivo de *K. rhaphidioides* con control de la concentración de CO<sub>2</sub>. La jeringa se utilizó para tomar alícuotas que permitieron monitorizar los cultivos.

Todo el sistema se mantuvo en esterilidad, el experimento se extendió por 33 días y el pH se ajustó a *ca*. 3 periódicamente por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc.

# 7.2.1.2 Efecto del CO2 en la incorporación de P y N

Para ensayar los efectos del CO<sub>2</sub> y la relación con la concentración de nutrientes del medio de cultivo, se trabajó con dos medios que difirieron en las concentraciones: medio 7LCS +  $\mu$ (A) (1 mM N; 0,1 mM P) y medio A (20 mM N; 1 mM P), con y sin burbujeo de CO<sub>2</sub> para cada uno de ellos. Se utilizaron frascos de cultivo estériles descartables de 40 ml, que se llenaron con 20 ml del medio de cultivo correspondiente, luego se inocularon con 20  $\mu$ l de cultivo algal. Una vez inoculados y homogeneizados, se tomaron alícuotas para realizar el recuento celular y de cada frasco se trasvasó cultivo a tubos de fluorímetro previamente esterilizados por autoclavado, para medir fluorescencia *in vivo*. Luego de dicha medición los cultivos se devolvieron a los frascos iniciales. En cámara de flujo laminar, se burbujearon los cultivos que correspondía al tratamiento con CO<sub>2</sub> durante 30 s. El CO<sub>2</sub> se burbujeó en condiciones de esterilidad haciéndolo pasar por un filtro de nylon de 0,2  $\mu$ m de poro. Todos los frascos se cerraron herméticamente, se colocaron en la cámara de cultivo y se rotaron periódicamente. Cada vez que los frascos se abrieron para realizar las mediciones de fluorescencia *in vivo* y tomar las alícuotas, se burbujearon con CO<sub>2</sub> (los que llevaban este tratamiento) antes de depositarlos nuevamente en la cámara. El ensayo duró 34 días y para los recuentos se emplearon cámaras multipozos de 176,7 mm<sup>2</sup> de superficie, como cámara de decantación siguiendo el método de Utermöhl con recuento por medio de fotografías.

# 7.2.2 Fuentes de Carbono Orgánico

Se probó la incorporación de C a partir de las siguientes fuentes orgánicas: glucosa, acetato de etilo y urea. Como tratamiento control se empleó CO<sub>2</sub>. Todas las fuentes se ensayaron tanto en luz (80 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) como en oscuridad, en cámara de cultivo a 8 °C. Se emplearon tubos de ensayo de 50 ml esterilizados por autoclavado, se llenaron con 40 ml de medio de cultivo y se inocularon con 1 ml de cultivo algal. Se empleó 7LCS +  $\mu$ (A) como medio de cultivo, que se preparó sin NTA en la solución de micronutrientes, para no aportar una fuente extra de C. Una vez preparados los tubos, se taparon con tapones de algodón estériles los que correspondieron al control, mientras que el resto fue purgado de CO<sub>2</sub> por burbujeo de aire filtrado con soda-lime durante 5 min. Luego fueron tapados con tapones de goma estériles. Los tubos que se sometieron

a oscuridad se cubrieron con dos capas de papel de aluminio. Se prepararon tres réplicas extra de los tubos control que fueron filtrados para determinar la concentración de clorofila a y obtener así el dato inicial. Al igual que al resto de los tubos, previo al filtrado, se les midió fluorescencia *in vivo* y se extrajo una alícuota de 1 ml para recuento celular. Los cultivos fueron monitorizados a través mediciones de fluorescencia *in vivo* y se realizaron recuentos celulares y determinación de la concentración de clorofila a al final del experimento. Debido a limitaciones de espacio, primero se realizó el ensayo con glucosa y acetato de etilo (duración 18 días) y luego con urea (duración 19 días).

# 7.3 <u>Resultados</u>

## 7.3.1 Efectos del CO<sub>2</sub>

# 7.3.1.1 Efecto de la concentración de CO<sub>2</sub>

Los cultivos de *K. rhaphidioides* mostraron un buen crecimiento a pesar de la reducción de CO<sub>2</sub> en el tiempo, como puede verse en la Figura 38. A partir de los cinco días posteriores al burbujeo sin CO<sub>2</sub>, la división celular continuó pero la pendiente de crecimiento fue disminuyendo hasta declinar finalmente (Figura 38). Este comportamiento se vio también en la fluorescencia *in vivo* (Figura 39).



Figura 38 Crecimiento de K. rhaphidioides en cultivo masivo con tres diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>: hasta el día 18, concentración ambiente; desde el día 18 hasta el día 25, 50 % concentración ambiente y desde el día 25, sin CO<sub>2</sub>.



Figura 39 Fluorescencia *in vivo* para *K. rhaphidioides* en cultivo masivo con tres concentraciones de CO<sub>2</sub>: hasta el día 18, concentración ambiente; desde el día 18 hasta el día 25, 50 % concentración ambiente y desde el día 25, sin CO<sub>2</sub>.

Las tasas de crecimiento no mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de 100 y 50 % de  $CO_2$  ambiente, mientras que el crecimiento fue significativamente menor luego de la supresión del  $CO_2$  (Figura 40).



Figura 40 Tasas de crecimiento para *K. rhaphidioides* en cultivo masivo con tres concentraciones de CO<sub>2</sub>: hasta el día 18, concentración ambiente; desde el día 18 hasta el día 25, 50 % concentración ambiente y desde el día 25, sin CO<sub>2</sub>.

La concentración de clorofila en los cultivos fue aumentando con el transcurso del

experimento (Figura 41) en conexión con el aumento en la densidad celular y en la fluorescencia. A partir de la supresión de  $CO_2$  (día 27), la clorofila se mantuvo constante hasta el final del experimento.



Figura 41 Clorofila a para K. rhaphidioides en cultivo masivo con tres concentraciones de CO<sub>2</sub>: hasta el día 18, concentración ambiente; desde el día 18 hasta el día 25, 50 % concentración ambiente y desde el día 25, sin CO<sub>2</sub>.

Por su parte, la cantidad de clorofila por célula osciló alrededor de 0,4 pg cel<sup>-1</sup> cuando la concentración de CO<sub>2</sub> fue del 100 % (Figura 42). A partir de la reducción al 50 %, el contenido celular de clorofila comenzó a disminuir y se estabilizó en alrededor de 0,15 pg cel<sup>-1</sup> desde la supresión total del CO<sub>2</sub>.



Figura 42 Clorofila a por célula para K. rhaphidioides en cultivo masivo con tres concentraciones de CO<sub>2</sub>: hasta el día 18, concentración ambiente; desde el día 18 hasta el día 25, 50 % concentración ambiente y desde el día 25, sin CO<sub>2</sub>.

# 7.3.1.2 Efecto del CO2 en la incorporación de P y N

Hacia el final del experimento, se vio que, en general, hubo mayor cantidad de células en los medios que fueron enriquecidos con  $CO_2$  comparando con los de igual concentración de nutrientes pero sin enriquecimiento (Figura 43). A su vez, los cultivos con el medio A (más rico en nutrientes) resultaron aproximadamente un 60% mayores en densidad celular que los cultivos en medio 7L. No se encontraron diferencias significativas para la comparación entre los medios ni tampoco para la comparación entre medios enriquecidos o sin  $CO_2$ . Por otra parte, la interacción entre los factores (enriquecimiento con  $CO_2$  - concentración de nutrientes) también resultó negativa.



Figura 43 Densidad celular de *K. rhaphidioides* con dos concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo y con y sin CO<sub>2</sub>.

Por su parte, la fluorescencia *in vivo* mostró resultados similares a los de la densidad celular (Figura 44), aunque los porcentajes de diferencia fueron menores. Sólo se observó una diferencia significativa de fluorescencia en los tratamientos con CO<sub>2</sub>, donde 7L fue significativamente menor que A.



Figura 44 Fluorescencia *in vivo* de *K. rhaphidioides* con dos concentraciones de medio de cultivo y con y sin enriquecimiento con CO<sub>2</sub>.

Las tasas de crecimiento resultaron semejantes para los distintos tratamientos (Figura 45).



Figura 45 Tasas de crecimiento de *K. raphidioides* con dos concentraciones de medio de cultivo y con y sin enriquecimiento con CO<sub>2</sub>.

# 7.3.2 Fuentes de Corgánico

En los cultivos con luz del ensayo con glucosa y acetato de etilo, hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Figura 46 A), pero en los cultivos en oscuridad sólo la fluorescencia *in vivo* del tratamiento con glucosa fue significativamente mayor (Figura 46 B).



Figura 46 Fluorescencia *in vivo* de *K. rhaphidioides* creciendo con acetato de etilo (EtAc) y glucosa (Glc) en luz y oscuridad.

Por su parte, en el ensayo con urea con luz, el tratamiento con urea resultó significativamente menor en la fluorescencia *in vivo* que el control (Figura 47 A), en tanto que en oscuridad sucedió lo contrario (Figura 47 B).



Figura 47 Fluorescencia *in vivo* de *K. rhaphidioides* creciendo con urea en luz y oscuridad.

La concentración de clorofila *a* en condiciones de luz, aumentó durante el transcurso del experimento, resultando significativamente mayor en el control (CO<sub>2</sub>) respecto de las fuentes de carbono orgánico (acetato y glucosa, Figura 48 A; y urea, Figura 49 A). En oscuridad, resultó significativamente mayor la clorofila *a* en el tratamiento con glucosa con respecto a acetato y control (Figura 48 B). En el experimento con urea no hubo diferencias significativas de clorofila en oscuridad (Figura 49 B).



Figura 48 Concentración de clorofila *a* de *K. rhaphidioides* en las incubaciones con acetato de etilo (Acetato) y glucosa (Glc), en luz (A) y en oscuridad (B).





La densidad celular mostró diferencias significativas al final de los ensayos con luz entre el inóculo inicial y el tratamiento con glucosa (Figura 50 A). Con acetato de etilo (Figura 50 A) y con urea (Figura 51 A) no hubo diferencias entre la densidad final y la inicial. En oscuridad, no hubo diferencias significativas entre el inóculo inicial y el control y los tratamientos para ninguno de los dos ensayos (Figura 50 B; Figura 51 B).



Figura 50 Densidad celular de *K. rhaphidioides* creciendo en acetato de etilo (EtAc) y glucosa (Glc) en luz y oscuridad.



Figura 51 Densidades celulares de *K. rhaphidioides* creciendo con urea en luz y oscuridad.

La cantidad de clorofila por célula sólo mostró diferencias significativas con respecto al inóculo inicial en los cultivos con urea (tanto la urea como el control) con luz (Figura 53 A). El resto de los tratamientos así como los controles, ya sea con luz u oscuridad no mostraron diferencias significativas con respecto al inóculo así como tampoco entre ellos (Figura 52A y B; Figura 53 A).



Figura 52 Clorofila por célula para *K. rhaphidioides* cultivadas con glucosa y acetato de etilo en luz (A) y oscuridad (B).



Figura 53 Clorofila por célula para *K. rhaphidioides* cultivadas con urea en luz (A) y oscuridad (B).

Las tasas de crecimiento mostraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con luz en ambos experimentos (Figura 54 A, Figura 55 A). En oscuridad, no hubo diferencias significativas entre el control y acetato de etilo o glucosa (Figura 54 B), pero si entre el control y urea (Figura 55 B). Aunque en oscuridad las pendientes de las curvas de crecimiento fueron prácticamente constantes para ambos experimentos, se

tomaron para el cálculo de las tasas de crecimiento los mismos días que para luz.



Figura 54 Tasas de crecimiento de *K. rhaphidioides* en el ensayo con acetato de etilo (EtAc) y glucosa (Glc) en luz y oscuridad.



Figura 55 Tasas de crecimiento de *K. rhaphidioides* en el ensayo con urea en luz y oscuridad.

#### 7.4 Discusión

Al comparar el crecimiento de K. rhaphidioides en dos medios de cultivo con igual composición, pero con distintas concentraciones de nutrientes, se encontró que fue mayor en los cultivos que tenían un medio más rico. Esto sucedió independientemente de la adición de CO<sub>2</sub>, pues se observó tanto en los cultivos burbujeados con CO<sub>2</sub> como en los que crecieron con CO<sub>2</sub> atmosférico. A su vez comparando crecimiento con y sin adición de CO<sub>2</sub> para un medio de cultivo dado, se encontró que el crecimiento fue mayor con burbujeo de CO<sub>2</sub>. Podría decirse entonces, que la incorporación de N y P se encuentra ligada a la disponibilidad de CO<sub>2</sub>. Así es que el mayor crecimiento de los cultivos ocurrió en el medio mineral más rico con burbujeo de CO<sub>2</sub>. Esto podría explicarse por la relación que existe entre la fijación de CO<sub>2</sub> y la incorporación de N, como se explicó en el capítulo anterior. La incorporación de N conlleva a una activación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que exige C (Turpin et al., 1988; Weger & Turpin 1989). Sucede algo similar con el P, ya que su incorporación también está íntimamente unida a la del CO<sub>2</sub> a través del ciclo de reducción de carbono fotosintético. En dicho ciclo, por cada molécula de CO<sub>2</sub> que ingresa al cloroplasto se exporta una molécula de triosa-P al citosol (Rychter & Rao, 2005). En el presente ensayo con K. rhaphidioides, a igual composición y concentración de cada uno de los nutrientes del medio de cultivo, el crecimiento de las algas estuvo influenciado por la disponibilidad de C, mientras que a igual concentración de CO2, el crecimiento de las algas guardó relación con la concentración del medio. Esta diferencia en el crecimiento relacionada con las distintas disponibilidades de  $CO_2$ , es consistente con la ausencia de CCM observada en K. rhaphidioides por Diaz (datos no pub.) que se mencionó en la introducción de este capítulo. Si tuviera CCM, el crecimiento habría sido independiente de las concentraciones de C, ya que las células estarían incorporándolo activamente y por lo tanto la capacidad fotosintética se vería siempre saturada independientemente de la concentración de C del medio.

Durante el ensayo de deficiencia de C, no pareció haber respuesta de las algas a la reducción de la concentración de CO<sub>2</sub> al 50%, pues la tendencia de la curva de crecimiento se mantuvo similar a cuando tenían 100 %. Por el contrario, la pendiente de la curva disminuvó marcadamente cuando se cortó el suministro del gas. Similares tendencias se observaron con las tasas de crecimiento medidas justo antes del cambio de cada concentración de CO<sub>2</sub>. De acuerdo a los resultados de los experimentos realizados y comparando con otras microalgas, tanto las trabajadas en esta tesis (P. simplex 0,6 d<sup>-1</sup>, W. caviahuensis 0,4 d<sup>-1</sup>) como de la bibliografía, (Goldman & Carpenter, 1974; Geider, 1987; Dauta et al., 1990; Cloern et al., 1995; Bouterfas et al., 2002), podría decirse que K. rhaphidioides es un organismo de crecimiento lento, lo que también implicaría un metabolismo lento. Por lo tanto, las respuestas fisiológicas se evidenciarían con un desfasaje mayor al esperado u observado en otras algas. Entonces, es de suponer que la disminución en la pendiente de la curva de crecimiento en los cultivos masivos, se corresponde con la disminución en el suministro de CO<sub>2</sub>, mientras que la declinación se relaciona con el corte del gas. Esta propiedad de lento metabolismo de la especie, podría ser la responsable de que en el lago Caviahue se encuentre, no sólo de manera uniforme en toda la columna de agua, sino que esté en buen estado fisiológico (i.e. las células poseen clorofila y son capaces de dividirse al ser expuestas a la luz) en el fondo del lago (Beamud et al., 2014). En el lago, las algas estarían incorporando C de modo fotoautótrofo a partir del CO<sub>2</sub> disuelto y en equilibrio con la atmósfera, pero su utilización ocuparía más tiempo que el que se encuentran expuestas a la luz. Es decir que aunque no se hallen en la zona fótica, todavía continúen metabolizando el C incorporado fotosintéticamente. Podría pensarse entonces que K. rhaphidioides poseería "inercia metabólica". De todos modos será necesario realizar experimentos que lo confirmen, ya que el crecimiento podría haberse visto inhibido por alguna otra limitación como luz, P o N ya que el medio de cultivo no fue enriquecido en el lapso del ensayo.

En el caso de las fuentes de C orgánico, se observó que en oscuridad, sólo el tratamiento con glucosa fue significativamente mayor en densidad celular, fluorescencia y clorofila con respecto al control. En los tratamientos con luz, hubo un incremento en la fluorescencia y en la clorofila en todos los tratamientos y los controles con respecto al inóculo inicial. Es decir que en presencia de luz K. rhaphidioides fue capaz de incorporar C orgánico de manera menos restringida en cuanto a la fuente, que en oscuridad. Sin embargo, la densidad celular en los cultivos tratados con urea no aumentó. Entonces, aunque la incorporación de urea implica que intracelularmente se genera una molécula de  $NH_4^+$  y una de  $CO_2$  (Berman & Chava, 1999; Pérez-García *et* al., 2011), pareciera que esta especie no es capaz de incorporar N a partir de urea en ausencia de CID. De todos modos la clorofila y la fluorescencia in vivo fueron incrementándose en los cultivos tratados con urea a lo largo del ensayo con luz, por lo que podría decirse que si bien la densidad celular fue menor que la del inóculo, las células que sobrevivieron incrementaron su contenido en clorofila. Esto podría indicar que la urea como única fuente de carbono, estaría siendo pobre para las algas a diferencia de lo que ocurrió cuando se ensavó urea como fuente de N, va que incrementaron su contenido de clorofila por célula, pero no hubo división celular. Para las otras fuentes de C ensayadas, los resultados sugieren que las algas estarían incorporando C orgánico de manera fotoheterótrofa, aunque a una tasa significativamente menor que los controles, por lo que las células son capaces de dividirse, pero sólo en presencia de luz.

En los experimentos con C orgánico llamó la atención que al final del experimento en oscuridad, los cultivos se hayan mantenido prácticamente sin cambios con respecto al inóculo tanto en densidad como en fluorescencia y clorofila. Lo esperable era una disminución en esos valores debido a la muerte celular. Esta respuesta, sumado al posible metabolismo lento de *K. rhaphidioides* y las observaciones de campo del buen estado fisiológico de las células en el fondo del lago, hacen pensar que podrían existir mecanismos de muerte celular programada (PCD) para esta especie. Por lo que ante condiciones desfavorables, *K. rhaphidioides*: 1. tiene un período de amortiguamiento en el que termina de metabolizar nutrientes adquiridos con anterioridad y 2. se activan mecanismos de PCD que permiten el retorno de las funciones vitales ante una potencial reversión de las condiciones ambientales. **Conclusiones Generales** 

# **Conclusiones Generales**

Durante el desarrollo del presente trabajo fue posible aislar, identificar y mantener en cultivo a 10 especies de algas del sistema río Agrio – lago Caviahue: *Watanabea caviahuensis, Euglena mutabilis, Klebsormidium* sp., *Keratococcus rhaphidioides, Pseudococcomyxa simplex, Chlamydomonas acidophila, Dichranochaete* sp., *Ulothrix* sp., *Uronema* sp. y *Ecdisichlamys* sp. Algunas de estas especies ya han sido encontradas en otros sistemas ácidos en el mundo (p.ej. *E. mutabilis, C. acidophila*), mientras que otras son características de este sistema y necesitan seguir siendo estudiadas para confirmar su posición taxonómica. La búsqueda de las condiciones óptimas de crecimiento se focalizó en *W. caviahuensis, K. rhaphidioides* y *P. simplex*.

La primera hipótesis planteada, que las algas del sistema son acidófilas, se comprobó en *W. caviahuensis, K. rhaphidioides* y *P. simplex*. Puede decirse que se trata de especies acidófilas aunque no extremófilas, pues el pH óptimo de crecimiento se encontró entre 3 y 5.

La segunda hipótesis planteada, que las algas del sistema estarían adaptadas a las condiciones de luz del ambiente, se comprobó con las tasas de fotosíntesis medidas en *K. rhaphidioides* y *P. simplex*. Dichas mediciones sugieren que estas cepas estarían adaptadas a las bajas irradiancias del lago, ya que los puntos de compensación lumínica fueron bajos (20-30  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Asimismo, por las respuestas obtenidas por *K. rhaphidioides* a diferentes calidades de luz, puede concluirse que esta especie está fotoadaptada al clima óptico presente en el lago.

Con respecto a la última hipótesis planteada, que las algas del sistema son autótrofos estrictos y por lo tanto el carbono, el nitrógeno y el fósforo son incorporados de manera inorgánica, en general fue rechazada. Tanto *K. rhaphidioides* como *P. simplex* mostraron

un comportamiento autótrofo aunque fueron capaces de incorporar nutrientes desde fuentes orgánicas. Durante el crecimiento fotoautótrofo de *K. rhaphidioides*, se evidenció un efecto sinérgico entre la disponibilidad de CO<sub>2</sub> y las concentraciones de N y P inorgánico. La capacidad de incorporar N de manera orgánica les confiere una ventaja adaptativa al tratarse de un ambiente con muy bajas concentraciones de N inorgánico. En el sistema en estudio, el P es un nutriente que se encuentra en abundancia y con alta biodisponibilidad, por lo que no resulta evidente la ventaja del hallazgo de que fueron capaces de tomar P de manera orgánica. En cuanto a la incorporación de C orgánico, los resultados sugieren que las algas fueron capaces de utilizarlo de manera fotoheterótrofa, aunque a una tasa significativamente menor que la forma inorgánica.

En general, se observó que las algas están adaptadas a los diferentes ambientes que se encuentran en el sistema río Agrio – lago Caviahue. El mismo, se caracteriza por poseer bajo pH, bajas concentraciones de N, CID y materia orgánica disuelta, altas concentraciones de P disuelto y alto coeficiente de extinción de la luz. Las cepas estudiadas fueron capaces de tolerar amplios gradientes de pH, incorporar N, P y C tanto orgánico como inorgánico y crecer a intensidades lumínicas bajas. A su vez, la distribución de las especies en el ambiente resulta coincidente con lo observado para las distintas variables estudiadas en laboratorio. Por ejemplo, es posible hallar a *K. rhaphidioides* en el lago y en el río Agrio Inferior (pH > 3) pero no en el río Agrio Superior (pH < 3), lo que es consistente con la tolerancia observada en los análisis de laboratorio para dicha especie.

#### Dr. Gustavo D. Baffico

Lic. Sabina Schultz

#### **Referencias bibliográficas**

- Aizawa, K. & Miyachi, S. 1986. Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. FEMS Microbiol. Rev., 39: 215-233.
- Albertano, P. 1995. Microalgae from sulphuric acid environments. En: Algae, environment and human affairs. Weissner, W., Schnepf, E.& Starr, R.C. (eds.)., Biopress Ltd., Bristol. 19-39.
- Allen, E.T., & Day, A.L. 1935. Hot springs of the Yellowstone National Park. Carnegie Institute, Washington DC. 525 pp.
- Andersen, R.A. & Kawachi, M. 2005. Tradicional microalgae isolation techniques. En: Algal culturing techniques. Andersen, R.A. (ed.). Elsevier Inc. Burlington. 83-100.
- Aparicio, P.J., & Quiñones, M.A. 1991. Blue light, a positive switch signal for nitrate and nitrite uptake by the green alga Monoraphidium braunii. Plant physiology, 95 (2): 374-378.
- APHA 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Ed. American Public Health Association, Washington. 1134 pp.
- Azuara, M.P. & Aparicio, P.J. 1983. In vivo blue-light activation of *Chlamydomonas reinhardii* nitrate reductase. Plant physiology, 71(2): 286-290.
- Baffico, G.D. 2010. Epilithic algae distribution along a gradient in a naturally acidic river, Río Agrio (Patagonia, Argentina). Microbial Ecology, 59: 533-545.
- Baffico, G.D. 2013. Optical properties and light penetration in a deep, naturally acidic, iron rich lake: Lago Caviahue (Patagonia, Argentina). Limnologica, 43: 475-481.
- Beamish, R.J. 1976. Acidification of lakes in Canada by acid precipitation and the resulting effects on fishes. Water, Air, and Soil Pollution, 6(2-4): 501-514.
- Beamud, S.G., Diaz, M.M. & Pedrozo, F.L. 2007. Summer phytoplankton composition and nitrogen limitation of the deep, naturally-acidic (pH 2.2) Lake Caviahue, Patagonia, Argentina . Limnologica. 37: 37-48.
- Beamud, S.G., 2009. Control del crecimiento y la distribución vertical del fitoplancton del lago Caviahue. Tesis Doctoral, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina.
- Beamud, S.G., Diaz, M.M. & Pedrozo, F.L. 2010. Nutrient limitation of phytoplankton in a naturally acidic lake. Limnology 11(2): 103–113.
- Beamud, S.G., Karrasch, B., Pedrozo, F.L. & Diaz, M.M. 2014. Utilisation of organic compounds by osmotrophic algae in an acidic lake of Patagonia (Argentina).

Limnology 15: 163-172.

- Benison, K.C., Bowen, B.B., Oboh-Ikuenobe, F.E., Jagniecki, E.A., LaClair, D.A., Story, S.L., Mormile, M.R. & Hong, B.Y. 2007. Sedimentology of acid saline lakes in southern Western Australia: newly described processes and products of an extreme environment. Journal of Sedimentary Research, 77(5): 366-388.
- Berg, G.M., Glibert, P.M., Lomas, M.W. & Burford, M.A. 1997. Organic nitrogen uptake and growth by the chrysophyte *Aureococcus anophagefferens* during a brown tide event. Marine Biology, 129(2): 377-387.
- Berman, T. & Chava, S. 1999. Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. Journal of Plankton Research, 21(8): 1423-1437.
- Blasco, D. 1973. Estudio de las variaciones de la relación fluorescencia in vivo/clorofila a, y su aplicación en oceanografía. Influencia de la limitación de diferentes nutrientes, efecto del día y noche y dependencia de la especie estudiada. Inv. Pesq. 37: 533-556.
- Blouin, A.C. 1989. Patterns of plankton species, pH and associated water chemistry in Nova Scotia lakes. Water, Air, and Soil Pollution, 46(1-4): 343-358.
- Bourrelly, P. 1972. Les algues d'eau douce. Initiation à la Systématique: Tome I. Les algues vertes. Société Nouvelle des Éditions Boubée & Cie. (ed.). Saint André des Arts, París. 572 pp.
- Bourrelly, P. 1981. Les algues d'eau douce. Initiation à la Systématique: Tome II. Les algues jaunes et brunes. Société Nouvelle des Éditions Boubée & Cie. (ed.). Saint Michel, París. 517 pp.
- Brankatschk, R. 2007. Identification of phytoplankton from de acidic lake Caviahue, Argentina. Thesis dissertation: Master of Science in Ecology and Environment. Lancaster University, UK.
- Brock, T.D. & Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. Journal of bacteriology, 98(1): 289-297.
- Brock, T.D. 1973. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. Science, New Series, 179(4072): 480-483.
- Brock, T.D. 1978. A sour world: Life and death at low pH. En: Termophilic microorganisms and life at high temperatures. Brock, T.D. (ed.). Springer-Verlag, New York. 387-392.
- Bouterfas, R., Belkoura, M. & Dauta, A. 2002. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. Hydrobiologia,

489(1-3): 207-217.

- Cabrera, J.M., Diaz, M.M., Schultz, S., Temporetti, P. & Pedrozo, F. 2016. Iron Buffer System in the Water Column and Partitioning in the Sediments of the Naturally Acidic Lake Caviahue, Neuquén, Argentina. Journal of Volcanology and Geothermal Research, 318: 19-26.
- Caisová, L. 2015. *Dicranochaete* An enigmatic green alga isolated from peat bogs. European Journal of Phycology, 50(1): 135-135.
- Carrasco, F. 2008. Biocauchos que nacen en el mar. Ambienta: la revista del Ministerio de Medio Ambiente, 83: 45-52.
- Cavicchioli, R. 2002. Extremophiles and the Search for Extraterrestrial Life. Astrobiology, 2(3): 281-292.
- Chien, A., Edgar, D.B. & Trela, J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology, 127(3): 1550-1557.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology advances, 25(3): 294-306.
- Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends in biotechnology, 26(3): 126-131.
- Cloern, J.E., Grenz, C. & Vidergar-Lucas, L. 1995. An empirical model of the phytoplankton chlorophyll: carbon ratio-the conversion factor between productivity and growth rate. Limnology and Oceanography, 40(7): 1313-1321.
- Colman, B., Huertas, I.E., Bhatti, S. & Dason, J.S. 2002. The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae. Funct. Plant Biol., 29: 261-270.
- Dauta, A., Devaux, J., Piquemal, F. & Boumnich, L. 1990. Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature. Hydrobiologia, 207(1): 221-226.
- Delmelle, P. & Bernard, A. 1994. Geochemistry, mineralogy, and chemical modeling of the acid crater lake of Kawah Ijen Volcano, Indonesia. Geochimica et Cosmochimica Acta, 58(11): 2445-2460.
- Diaz, M., Pedrozo, F., Reynolds, C. & Temporetti, P. 2007. Chemical composition and the nitrogen–regulated trophic state of Patagonian lakes. Limnologica–Ecology and Management of Inland Waters, 37(1): 17–27.
- Diaz, M. & Maberly, S.C. 2009. Carbon concentrating mechanisms in acidophilic algae. Phycologia, 48(2): 77-85.

- Eppley, R.W. & Coatsworth, J.L. 1968. Uptake of nitrate and nitrite by *Ditylum brightwellii* kinetics and mechanisms. Journal of Phycology, 4(2): 151-156.
- Ettl, H. & Gärtner, G. 1988. Süsswasserflora von Mitteleuropa. Chlorophyta II: Tetrasporales, Chlorococcales, Gloeodendrales. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Falkowski, P.G. 1980. Light-shade adaptation in marine phytoplankton. En: Primary Productivity in the Sea. Falkowski, P.G. (ed.). Plenum Press, New York. 99-119.
- Falkowski, P.G. 1984. Physiological responses of phytoplankton to natural light regimes. J. Plankton Res., 6: 295-307.
- Falkowski, P.G. & LaRoche, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. Journal of Phycology, 27(1): 8-14.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. 2007. Aquatic photosynthesis. Princeton University Press, New Jersey. 488 pp.
- Fan, J., Xu, H., Luo, Y., Wan, M., Huang, J., Wang, W. & Li, Y. 2015. Impacts of CO<sub>2</sub> concentration on growth, lipid accumulation, and carbon-concentrating-mechanism-related gene expression in oleaginous *Chlorella*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99: 2451-2462.
- Fernández-Remolar, D.C., Morris, R.V., Gruener, J.E., Amils, R. & Knoll, A.H. 2005. The Río Tinto Basin, Spain: mineralogy, sedimentary geobiology, and implications for interpretation of outcrop rocks at Meridiani Planum, Mars. Earth and Planetary Science Letters, 240(1): 149-167.
- Flynn, K.J., Stoecker, D.K., Mitra, A., Raven, J.A., Glibert, P.M., Hansen, P.J., Graneli,
  E. & Burkholder, J.M. 2013. Misuse of the phytoplankton- zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. J Plankton Res., 35: 3–11.
- Fott, B. & Mccarthy, A.J. 1964. Three acidophilic volvocine flagellates in pure culture. The Journal of protozoology, 11(1): 116-120.
- Francke, J.A. & Kooijman-van Blokland, H. 1985. Species delimitation within the green algal genus *Dicranochaete* Hieronymus. Archiv für Protistenkunde, 130(1): 93-102.
- Friedl, T. & Rybalka, N. 2012 Systematics of the Green Algae: A Brief Introduction to the Current Status. Progress in Botany, 73: 259-279.
- Friese, K., Herzsprung, P. & Witter, B. 2002. Photochemical degradation of organic carbon in acidic mining lakes. Acta hydrochim. Hydrobiol., 30: 1-8.
- Fuggi, A., Rigano, V.D. M., Vona, V. & Rigano, C. 1981. Pattern of inhibition of nitrate

utilization by ammonium in the acidophilic thermophilic unicellular alga *Cyanidium caldarium*. Archives of Microbiology, 130(5): 349-352.

- Galván, A., Quesada, A. & Fernández, E. 1996. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Biological Chemistry, 271(4): 2088-2092.
- Gammons. C.H., Wood. S.A., Pedrozo. F., Varekamp. J.C., Nelson. B.J., Shope. C.L. & Baffico. G. 2005. Hydrogeochemistry and rare earth element behavior in a volcanically acidified watershed in Patagonia. Argentina. Chemical Geology. 222(3), 249–267.
- Geib, K., Golldack, D. & Gimmler, H. 1996. Is there a requirement for an external carbonic anhydrase in the extremely acid-resistent green alga Dunalliela acidophila? Eur. J. Phycol. 31: 273-284.
- Geider, R.J. 1987. Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll *a* ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton. New Phytologist, 106 (1): 1-34.
- Geller, W., Klapper, H. & Salomons, W. (eds.). 1998. Acidic Mining Lakes, Springer, Berlin. 435 pp.
- Gerloff-Elias, A., Spijkerman, E. & Pröschold, T. 2005. Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). Plant, Cell and Environment, 28: 1218-1229.
- Giordano, M., Beardall, J. & Raven, J.A. 2005. CO2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. Annu. Rev. Plant Biol., 56: 99-131.
- Glibert, P.M. & Legrand, C. 2006. The diverse nutrient strategies of HABs: focus on osmotrophy. En:Ecology of Harmful Algae. Graneli E, Turner J (eds). Springer, Berlin. 163-176.
- Goldman, J.C. & Carpenter, E.J. 1974. A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. Limnology and Oceanography, 19 (5): 756-766.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org.
- Granéli, E., Carlsson, P. & Legrand, C. 1999. The role of C, N and P in dissolved and particulate organic matter as a nutrient source for phytoplankton growth, including toxic species. Aquat Ecol., 33 (1): 17–27.

- Gross, W. 2000. Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. Hydrobiologia, 433(1): 31-37.
- Gyure, R.A., Konopka, A., Brooks, A. & Doemel, W. 1987. Algal and bacterial activities in acidic (pH 3) strip mine lakes. Appl. Environ. Microbiol., 53: 2069-2076.
- Hanagata, N., Karube, I., Chihara, M. & Silva, P.C. 1998. Reconsideration of the taxonomy of ellipsoidal species of *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), with establismente of *Watanabea* gen. Nov. Phycological Research, 46: 221-229.
- Hansen, P.J. 2002. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. Aquat. Microb. Ecol., 28: 279-288.
- Hargreaves, J.W. & Whitton, B.A. 1976. Effect of pH on growth of acid stream algae. British Phycological Journal, 11(3): 215-223.
- Haxo, F.T. & Blinks, L.R. 1950. Photosynthetic action spectra of marine algae. The Journal of General Physiology, 33(4): 389-422.
- Heaney, S. 1978. Some observations on the use of the in vivo fluorescence technique to determine chlorophyll-*a* in natural populations and cultures of freshwater phytoplankton. Freshwater Biol. 8: 115-126.
- Hegewald, E., Bock, C. & Krienitz, L. 2013. A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). Fottea, 13(2): 149-164.
- Hill, G.J.C & Machlis, L. 1970. Defined media for growth and gamete production by the green alga *Oedogonium cardiacum*. Plan physiol., 46: 224-226.
- Hillebrand, H.; Dürselen, C.D.; Kirschtel, D.; Pollingher, U. & Zohary, T. 1999.Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J. Phycology. 35:403-424.
- Hoshaw, R.W. & Rosowski, J.R. 1973. Methods for microscopic algae. En: Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements. Stein, J.R. (ed.). Cambridge University Press, New York. 53-68.
- Huang, B., & Hong, H. 1999. Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by algae in subtropical coastal waters. Marine Pollution Bulletin,39 (1): 205-211.
- Huber-Pestalozzi, G. 1961. Chlorophyceae. Volvocales. Das Phytoplankton des Süsswassers. Teil 5. E. Schweizeerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Sttutgart. Paginas

- Jassby, A.D. & Platt, T. 1996. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. Limnology and Oceanography, 21: 540-547.
- Javaux, E.J. 2006. Extreme life on Earth—past, present and possibly beyond. Research in Microbiology, 157: 37-48.
- Johnson, D.B. 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS Microb. Ecol., 27: 307-317.
- Johnson, D.B. 2008. Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. Trans. Nonferrous Met. Soc. China, 18: 1367-1373.
- Kiefer, D. 1973a. Fluorescence properties of natural phytoplankton populations. Mar. Biol. 22: 263-269.
- Kiefer, D. 1973b. Chlorophyll *a* fluorescence in marine centric diatoms: responses of chloroplasts to light and nutrient stress. Mar. Biol. 23: 39-46.
- Kim, J. 2014. Effects of dissolved inorganic carbon, pH, and light on growth and lipid accumulation in microalgae. Thesis dissertation: Doctor of Philosophy in Chemical Engineering. Cincinnati University, USA. 123 pp.
- Klemenčič, A.K. & Balabanič, D. 2008.Vrstna sestava aerofitskih alg na izbranih lokacijah v Sloveniji nakazuje dinamične spremembe v združbi. Natura Sloveniae, 10(2): 5-23.
- Kohshima, S. 1984. A novel cold-tolerant insect found in a Himalayan glacier. Nature 310: 225 227.
- Kommárek, J. & Fott, B. 1983. Chlorophyceae. Chlorococcales. Das Phytoplankton des Süsswassers. Band XVI, Teil 7. Huber-Pestalozzi, G (ed). E. Schweizeerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Sttutgart. 1044 p.
- Krienitz, L., Ustinova, I., Friedl, T, & Huss, V.A. 2001. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). Journal of Phycology, 37(5): 852-865.
- Lessmann, D., Fyson, A. & Nixdorf, B. 2000. Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany) with pH≤ 3. Hydrobiologia, 433(1-3): 123-128.
- Letcher, P.M. & Powell, M.J. 2005. Kappamyces, a new genus in the Chytridiales (Chytridiomycota). Nova Hedwigia, 80(1-2): 115-133.
- Liu, X.; Duan, S.; Li, A.; Xu, N.; Cai, Z. & Hu, Z. 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. J.

Appl. Phycol., 21: 239–246.

- Loftus, M. & H. Seliger. 1975. Some limitations of the in vivo fluorescence technique. Chesapeake Sci. 16: 79-92.
- López-Archilla, A. I., Marín, I. & Amils, R. 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. Microbial Ecology, 41(1): 20-35.
- Lorenzen, C. 1966. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. Deep-Sea Res. 13: 223-227.
- MacIntyre, H.L., Kana, T.M., Anning, T. & Geider, R.J. 2002. Photoacclimatation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. J. Phycol., 38: 17–38.
- Mackereth, F.J.H.; Heron, J. & Talling, J. 1978. Water analysis: Some revised methods for limnologists. Freshwater Biological Association, Scientific Publication N°36. 120 pp.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and sustainable energy reviews, 14(1): 217-232.
- Mazia, D., Schatten, G. & Sale, W. 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. The Journal of cell biology, 66(1): 198-200.
- Monasterio, A.M. 2008. Termas de Copahue. Anales de hidrología médica, 4: 151-163.
- Morales, N., Arévalo, K., Ortega, J., Briceño, B., Andrade, C. & Morales, E. 2006. El pH y la fuente nitrogenada como moduladores del crecimiento de la macrófita *Lemna* sp. Revista de la Facultad de Agronomía, 23(1): 67-79.
- Neilson, A.H. & Lewin, R.A. 1974. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. Phycologia, 13: 227-264.
- Neustupa, J. 2004. Two new aerophytic species of the genus *Podohedra* Düringer (Chlorophyceae). Algological Studies, 112(1): 1-16.
- Neustupa, J., Eliáš, M., Škaloud, P., Němcová, Y. & Šejnohová, L. 2011. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga. Phycologia, 50(1): 57-66.
- Nixdorf, B.; Mischke, U. & Lessmann, D. 1998. Chrysophytes and Chlamydomonads: Pioneer colonists in extremely acidic mining lakes (pH < 3) in Lusatia (Germany). Hydrobiologia, 369/370: 315-327.

- Nixdorf, B., Fyson, A. & Krumbeck, H. 2001. Review: plant life in extremely acidic waters. Environmental and Experimental Botany, 46(3): 203-211.
- Niyogi, D.; McKnight, D. & Lewis, W. 1999. Influences of water and substrate quality for periphyton in a montane stream affected by acid mine drainage. Limnol. Oceanogr. 44: 804-809.
- Novis, P.M. 2006. Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low-pH habitats Phycologia, 45(3): 293–301.
- Olaizola, M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. Journal of Applied Phycology, 12(3-5): 499-506.
- Pedrozo, F., Kelly, L.,Diaz, M., Temporetti, P., Baffico, G., Kringel, R., Friese, K., Mages, M., Geller, W. & Woelfl, S. 2001. First results on the water chemistry, algae and trophic status of an Andean acidic lake system of volcanic origin in Patagonia (Lake Caviahue). Hydrobiologia. 452: 129-137.
- Pedrozo, F., Geller, W., Beamud, G., Woelfl, S., Diaz, M., Whitton, B., Wenzel, M., Kringel, R., Schimmele, M., Baffico, G., Temporetti, P. & Mages, M. 2002. The acidic waters of the Copahue crater - Agrio River - Lake Caviahue system (Patagonia, Argentina). Verh. Internat. Verein. Limnol., 28: 112-113.
- Pedrozo, F., Temporetti P., Beamud G. & Diaz M., 2008. Volcanic nutrient inputs and trophic state of Lake Caviahue. Patagonia. Argentina. Journal of Volcanology and Geothermal Research, 178: 205–212.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E. & Bashan, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. Water research, 45(1): 11-36.
- Pesce A.H., 1989. Evolución volcano-tectónica del complejo volcánico Copahue-Caviahue y modelo geotérmico preliminar. Asoc. Geol. Arg. XLIV. 1(4), 307-327.
- Peterson, H.G., Healey, F.P. & Wagemann, R. 1984. Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41: 974-979.
- Pick, U. 1999. Dunaliella acidophila a most extreme acidophilic alga. Enigmatic microorganisms and life in extreme environments. Seckbach J. (ed). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 465-478.
- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U.G., & Melkonian, M. 2001. Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of

*Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. Protist, 152(4): 265-300.

- Rabassa, J.O., Heusser, C. J. & Rutter, N. 1989. Late-Glacial and Holocene of Argentine Tierra del Fuego. Quaternary of South America and Antarctic Peninsula, 7: 327-351.
- Rapacioli R.A. 1985. Lago Caviahue y su cuenca. Technical report. EPAS. Neuquén province. 45 pp.
- Raven, J.A. 1997. Putting the C in phycology. European J. of Phycology, 32: 319-333.
- Rhee, G.Y. 1978. Effects of N: P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. Limnology and Oceanography, 23(1): 10-25.
- Remis, D., Simonis, W. & Gimmler, H. 1992. Measurement of the transmembrane electrical potential of *Dunaliella acidophila* by microelectrodes. Microbiology, 158(5): 350-355.
- Reynolds, K.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17: 208-212.
- Rhodes, R.G. 1981. Heterothallism in *Chlamydomonas acidophila* Negoro isolated from acidic strip-mine ponds. Phycologia, 20(1): 81-82.
- Rindi, F., Mikhailyuk, T.I., Sluiman, H.J., Friedl, T. & López-Bautista, J.M. 2011. Phylogenetic relationships in *Interfilum* and *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). Molecular Phylogenetics and Evolution, 58(2): 218-231.
- Rivkin, R.B. & Putt, M. 1987. Heterotrophy and photoheterotrophy by Antartic microalgae: light- dependent incorporation of amino acids and glucose. Journal of Phycology, 23: 442-452.
- Robards, K., McKelvie, I.D., Benson, R.L., Worsfold, P.J., Blundell, N.J. & Casey, H. 1994. Determination of carbon, phosphorus, nitrogen and silicon species in waters. Analytica Chimica Acta, 287(3): 147-190.
- Rothschild, L.J. & Mancinelli, R.L. 2001. Life in extreme environments. Nature, 409: 1092-1101.
- Rychter, A.M. & Rao, I.M. 2005. Role of phosphorus in photosynthetic carbon metabolism. Handbook of photosynthesis, 2: 123-148.
- Sabater, S., Buchaca, T., Cambra, J., Catalan, J., Guasch, H., Ivorra, N., Muñoz, I., Navarro, E., Real, M. & Romaní, A. 2003. Structure and function of benthic algal communities in an extremely acid river. Journal of Phycology, 39(3): 481-489.
- Satake, K., Oyagi, A., & Iwao, Y. 1995. Natural acidification of lakes and rivers in Japan: The ecosystem of Lake Usoriko (pH 3.4–3.8). Water, Air, and Soil Pollution,
85(2): 511-516.

- Satake, K. & Saijo, Y. 1974. Carbon dioxide content and metabolic activity of microorganisms in some acid lakes in Japan. Limnol. Oceanogr., 19: 331-338.
- Schindler, D. & Holmgren, S. 1971. Primary production and phytoplankton in the Experimental Lakes Area, northwestern Ontario, and other low carbonate waters, and a liquid scintillation method for determinig <sup>14</sup>C activity in photosynthesis. J. Fish. Res. Board Can., 28: 189-201.
- Schindler, D.W., Turner, M.A. & Hesslein, R.H. 1985. Acidification and alkalinization of lakes by experimental addition of nitrogen compounds. Biogeochemistry, 1: 117-133.
- Spalding, M.H. 2008. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transporters. J. Exp. Bot. 59(7): 1463–1473.
- Spijkerman, E. 2008. Phosphorus limitation of algae living in iron-rich, acidic lakes . Aquat Microb Ecol. 53: 201–210.
- Steinberg, C.E.W., Schäfer, H. & Beisker, W. 1998. Do Acid-tolerant Cyanobacteria Exist?. Acta hydrochimica et hydrobiologica, 26 (1): 13-19.
- Stoecker, D. 1998. Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications. Europ J Protistol., 34: 281–290.
- Stoyneva, M.P., Cocquyt, C., Gärtner, G. & Vyverman, W. 2007. *Oocystis lacustris* Chod.(Chlorophyta, Trebouxiophyceae) in Lake Tanganyika (Africa). Linzer. Biol. Beitr, 39: 571-632.
- Stumm, W. & Schnoor, J. 1995. Atmospheric deposition: Impact of acids on lakes. En: Physics and chemistry of lakes. A. Lerman et al. (eds.), Springer-Verlag, New York. 185-215.
- Sugiura, Y., Kawabe, H., Tanaka, H., Fujimoto, S., & Ohara, A. 1981. Purification, enzymatic properties, and active site environment of a novel manganese (III)containing acid phosphatase. Journal of Biological Chemistry, 256(20): 10664-10670.
- Sukenik, A., Bennett, J., Mortain-Bertrand, A. & Falkowski, P.G. 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus to irradiance in *Dunaliella tertiolecta*. A kinetic study. Plant Physiol., 92: 891-898.
- Talling, J. 1957. Photosynthetic characteristics of some freshwater plankton diatoms in relation to underwater radiation. New Phytologist, 56: 29-50.
- Tate, C.M, Broshears, R.E. & McKnight, D.M. 1995. Phosphate dynamics in an acidic

mountain stream: Interactions involving algal uptake, sorption by iron oxide, and photoreduction. Limnol Oceanogr., 40: 938-946.

- Tell, G. 1973. Cyanophyta epifitas de las lagunas Chascomús, El Burro, Yalca y Vitel (Prov. de Buenos Aires, Argentina). Darwiniana, 129-152.
- Tell, G. & Conforti, V. 1986. Euglenophyta pigmentadas de la Argentina. Bibliotheca Phycologica. En: der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, J. Cramer (ed.). Berlín. 301 pp.
- Temporetti, P., Snodgrass, K. & Pedrozo, F. 2013. Dynamics of phosphorus in sediments of a naturally acidic lake. International Journal of Sediment Research, 28(1), 90-102.
- Thingstad, T.F., Skjoldal, E.F., & Bohne, R.A. 1993. Phosphorus cycling and algalbacterial competition in Sandsfjord, western Norway. Marine Ecology-Progress Series, 99: 239-239.
- Tilzer, M.M.; Paerl, H.W. & Goldman, C.R. 1977. Sustained viability of aphotic phytoplankton in Lake Tahoe (California-Nevada). Limnol. Oceanogr., 22: 84 91.
- Tittel, J., Bissinger, V., Zippel, B., Gaedke, U., Bell, E., Lorke, A., & Kamjunke, N. 2003. Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: implications for aquatic food webs. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(22), 12776–12781.
- Tittel, J., Bissinger, V., Gaedke, U. & Kamjunke, N. 2005. Inorganic carbon limitation and mixotrophic growth in *Chlamydomonas* from and acidic mining lake. Protist, 156: 63-75.
- Tittel, J., Wiehle, I., Wannicke, N., Kampe, H., Poerschmann, J., Meier, J. & Kamjunke, N. 2009. Utilisation of terrestrial carbon by osmotrophic algae. Aquat. Sci., 71: 46-54.
- Tredici, M.R. 2010. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. Biofuels, 1(1): 143–162.
- Turpin, D.H., Elrifi, I.R., Birch D.G., Weger, H.G. & Holmes, J.J. 1988. Interactions between photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilation in microalgae. Can. J. Bot., 66: 2083-2097.
- Ullrich, W. R. 1983. Uptake and reduction of nitrate: Algae and fungi. En: Inorganic Plant Nutrition. Läuchli, A & Bieleski, L.R. (eds.). Springer Berlin Heidelberg. New York. 376-397.
- Utermöl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik.

Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol., 9: 1-38.

- Van Meel, L. 1960. Etudes hydrobiologiques sur les eaux saumâtres de la Belgique: IV.
  Les criques au Nord de la province de Flandre orientale (période 1951-1958).
  Bulletin-Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique Mededelingen-Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen, 38: 1-86.
- Varekamp, J.C. 2008. The volcanic acidification of glacial Lake Caviahue, Province of Neuquen, Argentina. Journal of Volcanology and Geothermal Research, 178(2): 184– 196.
- Varekamp, J.C., Ouimette, A.P., Herman, S.W., Flynn, K.S., Bermudez, A. & Delpino, D. 2009. Naturally acid waters from Copahue volcano, Argentina. Applied geochemistry, 24: 208-220.
- Vincent, W. 1983. Fluorescence properties of the freshwater phytoplankton: three algal classes compared. Br. Phycol. J. 18: 5-21.
- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Betenbaugh, M.J., Nie, Z. & Qiu, G. 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91: 835–844.
- Wang, C.Y., Fu, C.C. & Liu, Y.C. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of Spirulina platensis. Biochemical Engineering Journal, 37(1): 21-25.
- Weger, H.G. & Turpin, D.H. 1989. Mitochondrial respiration can support NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reduction during photosynthesis interactions between photosynthesis, respiration, and N assimilation in the N-limited green alga *Selenastrum minutum*. Plant physiology, 89(2): 409-415.
- Wetherell, D.F. 1958. Obligate phototrophy in *Chlamydomonas eugametos*. Physiologia Plantarum, 11(2): 260-270.
- Wetzel, R.G. 2001. Limnology. Academic Press, New York. 1006 pp.
- Whitton, B.A. & Diaz, M.M. 1981. Influence of environmental factors on photosynthetic species composition in highly acidic waters. Verh. Int. Ver. Limnol. 21: 1459-1465.
- Whitton, B.A. & Satake, K., 1996. Phototrophs in highly acidic waters: an overview. Proceedings International Symposium on Acidic Deposition and its Impacts, Tsukuba, Japón. 204-211.
- Wright, R.F & Henriksen, A. 1978. Chemistry of small Norwegian lakes, with special reference to acid precipitation. Limnol. Oceanogr, 23(3): 487498.

Yang, S., Wang, J., Cong, W., Cai, Z. & Ouyang, F. 2004. Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii*. Biotechnology letters, 26(3): 239-243.

# <u>Anexo</u>

Tabla 4

## Keratococcus rhaphidioides

## Medias con letra común no son significativamente diferentes. p>0,05

pH-Densidad celular	Figura 9							
Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor		
	Modelo.	5,45	5	1	79	<0,0001		
	pН	5,45	5	1	79	<0,0001		
	Error	0,17	12	0				
	Total	5,62	17					
Test Bonferroni.								
Alfa=0,05. DMS=0,34984	рН	Medias	n	E.E	Grupo			
,	6	-0,21	3	0,07	А			
	2	-0,07	3	0,07	А	В		
	7	0,21	3	0,07		В	С	
	5	0,38	3	0,07			С	
	3	1,02	3	0,07				D
	4	1,3	3	0,07				D

## pH-Tasas de crecimiento a partir de densidad celular Figura 18

Análisis de la Varianza	FV Modelo. pH	SC 0 0	gl 5 5	CM 0 0	F 40 40	p-valor <0,0001 <0,0001		
	Error	0	12	0				
	Total	0,01	17					
Test Bonferroni.					-			
Alfa=0,05. DMS=0,1474	рН	Medias	n	E.E	Grupo			
	6	-0,01	3	0	А			
	2	0	3	0	А	В		
	7	0,01	3	0		В	С	
	5	0,01	3	0			С	
	3	0,03	3	0				D
	4	0,04	3	0				D

pH-Biovolumen	Figura 10							
Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor		
	Modelo.	769201,35	5	153840	32	<0,0001		
	pН	769201,35	5	153840	32	<0,0001		
	Error	232963,26	48	4853				
	Total	1002164,61	53					
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=101.45365	рН	Medias	n	E.E	Grupo			
	2	33,5	9	23,22	А			
	3	102,49	9	23,22	А	В		
	4	165,27	9	23,22		В	С	
	5	212,23	9	23,22			С	
	6	318,42	9	23,22				D
	7	381,35	9	23,22				D

# pH - Clorofila *a*-1<sup>a</sup> Ext. Figura 11

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor			
	Modelo.	11236,72	5	2247	60	<0,0001			
	pН	11236,72	5	2247	60	<0,0001			
	Error	447,54	12	37					
	Total	11684,25	17						
Test Bonferroni.									
Alfa=0,05. DMS=18,19444	pH	Medias	n	E.E	Grupo				
	2	0,07	3	3,53	А				
	6	22,72	3	3,53		В			
	5	40,18	3	3,53		В	С		
	7	45,1	3	3,53			С	D	
	3	59,45	3	3,53				D	
	4	78,12	3	3,53					Е

#### pH - Clorofila *a*-2<sup>a</sup> Ext. Figura 12

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor		
	Modelo.	359706,69	5	71941	91	<0,0001		
	pН	359706,69	5	71941	91	<0,0001		
	Error	9479,54	12	790				
	Total	369186,23	17					
Test Bonferroni.								
Alfa=0,05. DMS=83.73711	pН	Medias	n	E.E	Grupo			
	2	0,51	3	16,23	А			
	3	154,69	3	16,23		В		
	6	302,15	3	16,23			С	
	7	336,57	3	16,23			С	D
	4	379,07	3	16,23			С	D
	5	400,32	3	16,23				D

### pH - Clorofila *a*-Total. Figura 13

Análisis de la Varianza	FV Modelo. pH Error Total	SC 446116,86 446116,86 10567,38 456684,24	gl 5 5 12 17	CM 89223 89223 881	F 101 101	p-valor <0,0001 <0,0001		
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=88,41137	рН	Medias	n	E.E	Grupo			
······································	2	0,58	3	17,13	А			
	3	214,14	3	17,13		В		
	6	324,87	3	17,13			С	
	7	381,67	3	17,13			С	D
	5	440,5	3	17,13				D
	4	457,19	3	17,13				D

pH - Clorofila <i>a</i> por célula	Figura 14							
Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor		
	Modelo.	4,88	5	1	98	<0,0001		
	pН	4,88	5	1	98	<0,0001		
	Error	0,12	12	0				
	Total	5	17					
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0 29785	pН	Medias	n	E.E	Grupo			
1000,27700	2	0,02	3	0,06	А			
	3	0,72	3	0,06		В		
	6	1,09	3	0,06			С	
	7	1,28	3	0,06			С	D
	5	1,47	3	0,06				D
	4	1,53	3	0,06				D
pH – Fluorescencia in vivo	Figura 15							
Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor		
Día 15	Modelo.	33677,49	5	6735	178	< 0.0001		
	pН	33677,49	5	6735	178	<0,0001		
	Error	454,11	12	38		,		
	Total	34131,61	17					
Test Bonferroni. Alfa=0,05.	pН	Medias	n	E.E	Grupo			
DMS=18,32764	-				-			
Día 15	2	23,94	3	3,55	А			
	6	133,64	3	3,55		В		
	4	137,31	3	3,55		В		
	3	137,64	3	3,55		В		
	5	137,97	3	3,55		В		
	7	149,64	3	3,55		В		

#### pH – Fluorescencia in vivo Figura 15

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor		
Día 17	Modelo.	47715,77	5	9543	301	<0,0001		
	pН	47715,77	5	9543	301	<0,0001		
	Error	380,33	12	32				
	Total	48096,1	17					
Test Bonferroni.								
Alfa=0,05.	pН	Medias	n	E.E	Grupo			
DMS=16,77684								
Día 17	2	18,49	3	3,25	А			
	6	123,13	3	3,25		В		
	3	145,63	3	3,25			С	
	4	161,96	3	3,25			С	D
	7	162,13	3	3,25			С	D
	5	163,63	3	3,25				D

### pH – Fluorescencia por Clorofila *a* Figura 16

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor		
	Modelo.	87,95	5	17,591	56,346 3	0,0001		
	pН	87,95	5	17,591	56,346 3	0,0001		
	Error	3,75	12	0,3122	5			
	Total	91,7	17					
Test Bonferroni.								
Alfa=0,05. DMS=1,66467	рН	Medias	n	E.E	Grupo			
	3	2,19	3	0,32	А			
	4	2,21	3	0,32	Α	В		
	7	4,22	3	0,32		В	С	
	5	4,75	3	0,32		В	С	D
	6	6,26	3	0,32			С	D
	2	8,46	3	0,32				D

pH – Biomasa	Figura 17							
Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor		
	Modelo.	26586,78	5	5317	56	<0,0001		
	pН	26586,78	5	5317	56	<0,0001		
	Error	1145,15	12	95				
	Total	27731,93	17					
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=29,10419	pH	Medias	n	E.E	Grupo			
,	2	9,22	3	5,64	А			
	3	53,09	3	5,64		В		
	6	79,78	3	5,64		В	С	
	5	92,86	3	5,64			С	
	4	105,91	3	5,64			С	D
	7	128,08	3	5,64				D

#### LUZ - Intensidad - Densidad celular

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor	
	Modelo.	28262357608,92	3	94207858 70	280	<0,0001	
	Intensidad	28262357608,92	3	94207858 70	280	<0,0001	
	Error	268951657,33	8	33618957			
	Total	28531309266,25	11				
Test Bonferroni.							
Alfa=0,05. DMS=16469,70348	Intensidad	Medias	n	E.E	Grupo		
	Oscuridad	41797,33	3	3347,58	А		
	12umol	141773	3	3347,58		В	
	30umol	143580	3	3347,58		В	
	70umol	168320,67	3	3347,58			С

## LUZ - Intensidad – Tasa de crecimiento Figura 20

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	0,01	3	0,0022	71,22	<0,0001
	Intensidad	0,01	3	0,0022	71,22	<0,0001
	Error	0,00025	8	0,000032		
	Total	0,01	11			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0,01595	Intensidad	Medias	n	E.E	Grupo	
,	Oscuridad	-0,01	3	0,0032	А	
	12umol	0,03	3	0,0032		В
	30umol	0,04	3	0,0032		В
	70umol	0,05	3	0,0032		В

## LUZ – Longitud de onda – Fluorescencia in vivo Figura 22

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor	
Día 14	Modelo.	1052,69	4	263	133	<0,0001	
	Color	1052,69	4	263	133	<0,0001	
	Error	19,77	10	2			
	Total	1072,46	14				
Test Bonferroni. Alfa=0,05.	Filtro	Medias	n	E.E	Grupo		
DMS=4,11126					-		
Día 14	Verde	42,47	3	0,81	А		
	Rojo	42,64	3	0,81	А		
	Azul	49,3	3	0,81		В	
	Amarillo	49,5	3	0,81		В	
	Incoloro	65,47	3	0,81			С

## LUZ – Longitud de onda – Fluorescencia in vivo Figura 22

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
Día 32	Modelo.	5901,76	4	1475	60	< 0,0001
	Color	5901,76	4	1475	60	< 0,0001
	Error	247,09	10	25		
	Total	6148,86	14			
Test Bonferroni.	Filtro	Madiaa		ББ	Cruno	
DMS=14,53578	гшо	wiedias	п	E.E	Grupo	
Día 32	Rojo	60,03	3	2,87	А	
	Verde	62,86	3	2,87	А	
	Amarillo	62,93	3	2,87	А	
	Azul	66,66	3	2,87	А	
	Incoloro	112,43	3	2,87		В

#### LUZ – Longitud de onda – Tasas de fotosíntesis Figura 23

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Oscuridad	Modelo.	0,43	4	0	1	0,4728
	Color	0,43	4	0	1	0,4728
	Error	1,13	10	0		
	Total	1,55	14			

LUZ – Longitud de onda –	Tasas de	fotosíntesis	Figura 23
--------------------------	----------	--------------	-----------

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Sin filtro	Modelo.	1,8	4	0	7	0,006
	Color	1,8	4	0	7	0,006
	Error	0,65	10	0		
	Total	2,45	14			
Test Bonferroni.						
Alfa=0,05. DMS=0,74308	Filtro	Medias	n	E.E	Grupo	
Sin filtro	Amarillo	0,29	3	0,15	А	
	Rojo	0,34	3	0,15	А	
	Verde	0,65	3	0,15	А	В
	Azul	0,69	3	0,15	Α	В
	Incoloro	1,26	3	0,15		В
N1 – Densidad ceular	Figura 29					
Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	11160067804,45	6	18600113 01	31	<0,0001
	Fuente	11160067804,45	6	18600113 01	31	<0,0001
	Error Total	843657322,5 12003725126.95	14 20	60261237		
		- 3				

Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=23446,85416	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo		
	Asp	3183,67	3	4481,86	А		
	KNO2	4076	3	4481,86	А		
	NH4 NO3	6189	3	4481,86	А		
	(NH4)2SO4	7438,33	3	4481,86	А		
	Leu	35535,5	3	4481,86		В	
	Urea	50871,33	3	4481,86		В	С
	KNO3	61991	3	4481,86			С

### N2 – Densidad ceular Figura 30

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	3303551348, 22	2	16517756 74	9	0,016
	Fuente	3303551348, 22	2	16517756 74	9	0,016
	Error	1112865162	6	18547752 7		
	Total	4416416510, 22	8			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=36556,09648	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	
,	NH4Cl	165401,67	3	7862,94	А	
	Urea	167602,33	3	7862,94	А	
	KNO3	207099,33	3	7862,94		В
P – Densidad ceular	Figura 33					
Análicia do la Varianza	EV	SC	al	CM	Б	n valor
Allalisis uc la vallaliza	Modelo	64222816.67	1 gi	64222817	18	0.0127
	Fuente	64222816,67	1	64222817	18	0.0127
	Error	13936272.67	4	3484068	10	0,0127
	Total	78159089,33	5	5 10 1000		
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=4231 42548	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	
DWIS 4251,42540	B-Glv	23492 67	3	1077 66	А	
	PO3	30036	3	1077,66		В
P – Tasa de crecimiento	Figura 34					
Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	0	1	0,0024	13	0,0224
	Fuente	0	1	0,0024	13	0,0224
	Error	0	4	0,0002		
	Total	0	5			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0 03069	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	
21.12 0,00000	b-Gly	0,11	3	0,01	А	
	PO4	0,15	3	0,01		В

#### CID - CO<sub>2</sub> – Nutrientes – Densidad Figura 43

Análisis de la Varianza	F.V.	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	189454104126,68	3	63151368042,23	5,92	0,0198
	Carbono	76848374329,88	1	76848374329,88	7,20	0,0277
	Trat	112220764113,16	1	112220764113,1 6	10,52	0,0118
	Carbono *Trat	384965683,64	1	384965683,64	0,04	0,8541
	Error	85330963996,91	8	10666370499,61		
	Total	274785068123.6	11			

#### CID - CO<sub>2</sub> - Nutrientes - Fluorescencia Figura 44

Análisis de la Varianza (SC tipo III)	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
	Modelo.	1198,86	3	399,62	1,72	0,2401
	Carbono	927,52	1	927,52	3,99	0,0809
	Trat	269,80	1	269,80	1,16	0,3128
	Carbono* Trat	1,54	1	1,54	0,01	0,9371
	Error	1860,30	8	232,54		
	Total	3059,16	11			

## CID - CO<sub>2</sub> - Nutrientes - Densidad Figura 43

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
Sin CO2	Modelo.	49730107244,6	5314	19730107245	5	0,0854
	Trat.	49730107244,6	5314	19730107245	5	0,0854
	Error	38484571239,8	364	9621142810		
	Total	88214678484,4	19 5			

#### CID - CO<sub>2</sub> – Nutrientes – Densidad Figura 43

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
Con CO2	Modelo.	62875622552,17	16	52875622552	5	0,0814
	Trat.	62875622552,17	16	52875622552	5	0,0814
	Error	46846392757,05	5 4 1	11711598189		
	Total	109722015309,22	25			

#### CID - CO<sub>2</sub> - Nutrientes - Fluorescencia Figura 44

Análisis de la Varianza	FV	SC gl CM	F	p-valor
Sin CO2	Modelo.	27921,08 1 27921	5	0,0981
	Trat	27921,08 1 27921	5	0,0981
	Error	24178,79 4 6045		
	Total	52099,88 5		

#### CID 1 - CO<sub>2</sub> – Nutrientes – Fluorescencia Figura 44

Análisis de la Varianza	FV	SC gl CM F p-valor
Con CO2	Modelo.	18592,67 1 18593 22 0,0093
	Trat	18592,67 1 18593 22 0,0093
	Error	3354,67 4 839
	Total	21947,33 5
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=65,65050	Medio	Medias n E.E Grupo
Con CO2	7L	209,43 3 16,72 A
	А	320,77 3 16,72 B

#### CID - CO<sub>2</sub> – Nutrientes Figura 45

FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
Modelo.	0	1	0	1	0,3599
Trat/Día	0	1	0	1	0,3599
Error	0,01	4	0		
Total	0,02	5			
	FV Modelo. Trat/Día Error Total	FVSCModelo.0Trat/Día0Error0,01Total0,02	FV         SC gl           Modelo.         0         1           Trat/Día         0         1           Error         0,01         4           Total         0,02         5	FV         SC         gl CM           Modelo.         0         1         0           Trat/Día         0         1         0           Error         0,01         4         0           Total         0,02         5         5	FV         SC         gl CM         F           Modelo.         0         1         0         1           Trat/Día         0         1         0         1           Error         0,01         4         0         1           Total         0,02         5         5         5

#### CID - CO<sub>2</sub> – Nutrientes Figura 45

FV	SC	gl CM	F	p-valor
Modelo.	0	1 0,0012	0,4799	1
Trat/Día	0	1 0,0012	0,4799	1
Error	0,01	4 0,0026		
Total	0,01	5		
	FV Modelo. Trat/Día Error Total	FVSCModelo.0Trat/Día0Error0,01Total0,01	FV         SC         gl         CM           Modelo.         0         1 0,0012         0           Trat/Día         0         1 0,0012         0           Error         0,01         4 0,0026         0           Total         0,01         5         5	FV         SC         gl         CM         F           Modelo.         0         1 0,0012 0,4799         7777         7779         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7777         7799         7799         7777         7799         7777         7799         77

#### CID - Concentración de CO<sub>2</sub> – Tasa de crecimiento Figura 40

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	0,08	2	0,0392	16	0,0042
	% Carbono	0,08	2	0,0392	16	0,0042
	Error	0,02	6	0,0025		
	Total	0,09	8			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0,13460	Medio	Medias	s n	E.E	Grupo	
	0	0,02	3	0,03	А	
	50	0,21	3	0,03		В
	100	0,23	3	0,03		В

#### COD 1 – Fluorescencia in vivo Figura 46 A

Análisis de la Varianza	FV	SC gl CM F p-va	lor
LUZ	Modelo.	2614,89 2 1307 323 <0,0	001
	Trat	2614,89 2 1307 323 <0,0	001
	Error	24,25 6 4	
	Total	2639,14 8	
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=5,39665	Fuente	Medias n E.E Grupo	
LUZ	Acetato	20,99 3 1,16 A	
	Glucosa	24,22 3 1,16 A	
	Ctrol	58,65 3 1,16 B	1

#### COD 1 – Fluorescencia in vivo Figura 46 B

Análisis de la Varianza	FV	SC gl CM F p-valor
OSCURIDAD	Modelo.	2,89 2 1,4462 52 0,0002
	Trat	2,89 2 1,4462 52 0,0002
	Error	0,17 6 0,0279
	Total	3,06 8
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0,44835	Fuente	Medias n E.E Grupo
OSCURIDAD	Ctrol	2,49 3 0,1 A
	Acetato	2,78 3 0,1 A
	Glucosa	3,81 3 0,1 B

# COD 2 – Fluorescencia in vivo Figura 47 A

Análisis de la Varianza	FV	SC gl CM F p-valor
LUZ	Modelo.	157,08 1 157 14 0,021
	Trat	157,08 1 157 14 0,021
	Error	46,07 4 12
	Total	203,15 5
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=7,69320	Fuente	Medias n E.E Grupo
LUZ	Urea	66,04 3 1,96 A
	Ctrol	76,28 3 1,96 B

#### COD 2 – Fluorescencia in vivo Figura 47 B

FV	SC gl CM	F	p-valor
Modelo.	21,89 1 22	58	0,0016
Trat	21,89 1 22	58	0,0016
Error	1,51 4 0		
Total	23,4 5		
Fuente	Medias n E.E	Grupo	)
Ctrol	7,42 3 0,36	А	
Urea	11,24 3 0,36		В
	FV Modelo. Trat Error Total Fuente Ctrol Urea	FV       SC       gl CM         Modelo.       21,89       1       22         Trat       21,89       1       22         Error       1,51       4       0         Total       23,4       5         Fuente       Medias n       E.E         Ctrol       7,42       3       0,36         Urea       11,24       3       0,36	FV         SC         gl CM         F           Modelo.         21,89         1         22         58           Trat         21,89         1         22         58           Error         1,51         4         0           Total         23,4         5         5           Fuente         Medias n E.E Grupo         Ctrol         7,42         3         0,36         A           Urea         11,24         3         0,36         5         5         5

#### COD 1 – Clorofila a Figura 48 A

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl CM	F	p-valor
LUZ	Modelo	. 1265,36	5 2 6 3 3	74	0,0001
	Trat	1265,36	5 2 6 3 3	74	0,0001
	Error	51,64	69		
	Total	1317	8		

Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=7,87441 Fuente Medias n E.E Grupo

LUZ	Glucosa	8,78	3 1,69	А	
	Acetato	10,48	3 1,69	А	
	Ctrol	34,74	3 1,69		В

## COD 1 – Clorofila *a* Figura 48 B

FV	SC	gl CM	F	p-valor
Modelo.	0,84	2 0,4183	20	0,0024
Trat	0,84	2 0,4183	20	0,0024
Error	0,13	6 0,0214		
Total	0,97	8		
	FV Modelo. Trat Error Total	FV         SC           Modelo.         0,84           Trat         0,84           Error         0,13           Total         0,97	FV         SC         gl         CM           Modelo.         0,84         2 0,4183         7           Trat         0,84         2 0,4183         2 0,4183           Error         0,13         6 0,0214         6 0,0214           Total         0,97         8         8	FV         SC         gl         CM         F           Modelo.         0,84         2 0,4183         20           Trat         0,84         2 0,4183         20           Error         0,13         6 0,0214         1           Total         0,97         8         1

Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0,39277 Fuente Medias n E.E Grupo

OSCURIDAD	Ctrol	1,3	3	0,08	Α	
	Acetato	1,31	3	0,08	Α	
	Glucosa	1,95	3	0,08		В

#### COD 2 – Clorofila a Figura 49 A

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
LUZ	Modelo	1378,04	11	1378	8 15	0,0187
	Trat	1378,04	11	1378	8 15	0,0187
	Error	376,63	4	94		
	Total	1754,68	35			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=21,99749	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	)
LUZ	Urea	33,41	3	5,6	А	

### COD 2 – Clorofila *a* Figura 49 B

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
OSCURIDAD	Modelo.	0,23	1	0,2321	0,1493	0,7189
	Trat	0,23	1	0,2321	0,1493	0,7189
	Error	6,22	4	1,5546		
	Total	6,45	5			

Ctrol 63,72 3 5,6

В

## COD 1 – Densidad celular Figura 50 A

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
LUZ	Modelo.	22917680278,22	2	11458840139	92	<0,0001
	Trat	22917680278,22	2	11458840139	92	<0,0001
	Error	748162844,67	6	124693807		
	Total	23665843122,89	8			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=29973,44142	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	
LUZ	Acetato	31042	3	6447,06	А	
	Glucosa	36736	3	6447,06	А	
	Ctrol	140821,33	3	6447,06		В

#### COD 1 – Densidad celular Figura 50 B

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
OSCURIDAD	Modelo.	902337,56	2	451169	0,355	80,7145
	Trat	902337,56	2	451169	0,355	80,7145
	Error	7608912,67	6	1268152		
	Total	8511250,22	8			

## COD 2 – Densidad celular Figura 51 A

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
LUZ	Modelo.	890796610,67	1	890796611	32	0,0049
	Trat/Día	890796610,67	1	890796611	32	0,0049
	Error	112663698,67	4	28165925		
	Total	1003460309,33	5			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=12031,10126	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	
LUZ	Urea	27184,67	3	3064,09	А	
	Ctrol	51554	3	3064,09		В

## COD 2 – Densidad celular Figura 51 B

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
OSCURIDAD	Modelo.	1234880,67	1	1234881	0,0802	0,791
	Trat/Día	1234880,67	1	1234881	0,0802	0,791
	Error	61569422,67	4	15392356		
	Total	62804303,33	5			

### COD 1 – Tasas de crecimiento Figura 54 A

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
LUZ	Modelo.	0,02	2	0,0103	28,5358	0,0009
	Trat	0,02	2	0,0103	28,5358	0,0009
	Error	0	6	0,0004		
	Total	0,02	8			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0,05101	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	
LUZ	Glucosa	0,1	3	0,01	А	
	Acetato	0,1	3	0,01	А	
	Ctrol	0,2	3	0,01		В

#### COD 1 – Tasas de crecimiento Figura 54 B

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
OSCURIDAD	Modelo.	0	2	0,0005	3,8904	0,0825
	Trat	0	2	0,0005	3,8904	0,0825
	Error	0	6	0,0001		
	Total	0	8			

#### COD 2 – Tasa de crecimiento Figura 55 A

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
LUZ	Modelo.	0	1	0,0016	510,125	0,0335
	Trat	0	1	0,0016	510,125	0,0335
	Error	0	4	0,0002	2	
	Total	0	5			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0,02826	Fuente	Media	s n	E.E	Grupo	
LUZ	Urea	0,09	3	0,01	А	
	Ctrol	0,12	3	0,01		В

## COD 2 – Tasa de crecimiento Figura 55 B

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
OSCURIDAD	Modelo.	0	1 (	0,0001	16,7265	0,015
	Trat	0	1 (	0,0001	16,7265	0,015
	Error	0	4	0		
	Total	0	5			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0,00594	Fuente	Media	s n	E.E	Grupo	
OSCURIDAD	Ctrol	-0,02	3	0	А	
	Urea	-0,01	3	0		В

## COD 1 – Clorofila por célula Figura 52 A

Análisis de la Varianza	FV	SC gl CM	F	p-valor
LUZ	Modelo.	0,02 3 0,00732	,530	40,1307
	Trat	0,02 3 0,00732	,530	40,1307
	Error	0,02 8 0,0029		
	Total	0,0411		

#### COD 1 – Clorofila por célula Figura 52 B

Análisis de la Varianza	FV	SC gl	СМ	F	p-valor
OSCURIDAD	Modelo.	0,03 3	0,009	1,4168	80,3075
	Trat	0,03 3	0,009	1,4168	80,3075
	Error	0,05 8	0,0063		
	Total	0,0811			

#### COD 2 – Clorofila por célula Figura 53 A

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
LUZ	Modelo.	2,08	2	1,0379	38,6788	30,0004
	Trat	2,08	2	1,0379	38,6788	30,0004
	Error	0,16	6	0,0268		
	Total	2,24	8			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0,43969	Fuente	Medias	s n	E.E	Grupo	
LUZ	Inóculo	0,21	3	0,09	А	
	Urea	1,21	3	0,09		В
	Ctrol	1,24	3	0,09		В

#### COD 2 – Clorofila por célula Figura 53 B

Análisis de la Varianza	FV	SC gl CM	F	p-valor
OSCURIDAD	Modelo.	0,01 2 0,00364	1,765	60,0577
	Trat	0,01 2 0,00364	1,765	60,0577
	Error	0 6 0,0008		
	Total	0,01 8		

## Pseudococcomyxa simplex

#### Medias con letra común no son significativamente diferentes. p>0,05

#### pH - Crecimiento realtivo a partir de fluorescencia in vivo Figura 24

FV	SC	gl	СМ	F	p-valor	
Modelo.	285,88	4	71	8	0,0032	
pН	285,88	4	71	8	0,0032	
Error	85,85	10	9			
Total	371,73	14				
pН	Medias	n	E.E	Grupo		
7	0,87	3	1,69	А		
6	3,48	3	1,69	А	В	
5	4,8	3	1,69	А	В	С
4	10,54	3	1,69		В	С
3	12,44	3	1,69			С
	FV Modelo. pH Error Total pH 7 6 5 4 3	FV         SC           Modelo.         285,88           pH         285,88           Error         85,85           Total         371,73           pH         Medias           7         0,87           6         3,48           5         4,8           4         10,54           3         12,44	FV         SC         gl           Modelo.         285,88         4           pH         285,88         4           Error         85,85         10           Total         371,73         14           pH         Medias         n           7         0,87         3           6         3,48         3           5         4,8         3           4         10,54         3           3         12,44         3	FV         SC         gl         CM           Modelo.         285,88         4         71           pH         285,88         4         71           Error         85,85         10         9           Total         371,73         14           pH         Medias         n         E.E           7         0,87         3         1,69           6         3,48         3         1,69           5         4,8         3         1,69           4         10,54         3         1,69           3         12,44         3         1,69	FV       SC       gl       CM       F         Modelo.       285,88       4       71       8         pH       285,88       4       71       8         Error       85,85       10       9       9         Total       371,73       14       7       7         pH       Medias       n       E.E       Grupo         7       0,87       3       1,69       A         6       3,48       3       1,69       A         5       4,8       3       1,69       A         4       10,54       3       1,69       A         3       12,44       3       1,69       A	FV       SC       gl       CM       F       p-valor         Modelo.       285,88       4       71       8       0,0032         pH       285,88       4       71       8       0,0032         pH       285,88       4       71       8       0,0032         Error       85,85       10       9       9       9         Total       371,73       14       7       14       10         pH       Medias       n       E.E       Grupo       6         7       0,87       3       1,69       A       B         5       4,8       3       1,69       A       B         4       10,54       3       1,69       B       B         3       12,44       3       1,69       3       1

## pH – Tasas de crecimiento a partir de fluorescencia in vivo Figura 25

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor		
	Modelo.	0,35	4	0	34	<0,0001		
	pН	0,35	4	0	34	<0,0001		
	Error	0,03	10	0				
	Total	0,38	14					
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=0 14975	рН	Medias	n	E.E	Grupo			
	7	0,08	3	0,03	А			
	6	0,18	3	0,03	А	В		
	5	0,24	3	0,03		В	С	
	4	0,38	3	0,03			С	D
	3	0,51	3	0,03				D

## N – Densidad celular Figura 31

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	6255153295649,1 9	5	1251030659130	83	<0,0001
	Fuente	6255153295649,2	5	1251030659130	83	<0,0001
	Error	181138677685,11	12	15094889807		
	Total	6436291973334,3 1	17			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=366041,22822	Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	
	KNO2	690900,63	3	70933,98	А	
	NH4Cl	1854419,24	3	70933,98		В
	NH4NO3	1971754,36	3	70933,98		В
	KNO3	2035993,69	3	70933,98		В
	Urea	2066802,36	3	70933,98		В

Leu 2656397,91 3 70933,98

С

## N – Tasa de crecimiento Figura 32

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
	Modelo.	0,04	5	0,0072	6	0,0061
	Fuente	0,04	5	0,0072	6	0,0061
	Error	0,02	12	0,0013		
	Total	0,05	17			
Test Bonferroni. Alfa=0,05 DMS=0,10535	· Fuente	Medias	n	E.E	Grupo	
	KNO2	-0,02	3	0,02	А	
	Leu	0,04	3	0,02	А	В
	NH4Cl	0,08	3	0,02	А	В
	NH4NO3	0,1	3	0,02		В
	Urea	0,1	3	0,02		В
	KNO3	0,11	3	0,02		В

#### P – Densidad celular Figura 35

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	CM	F	p-valor
	Modelo.	6392208,17	1	6392208	0,0702	1
	Fuente	6392208,17	1	6392208	0,0702	1
	Error	364278653,33	4	91069663		
	Total	370670861,5	5			

## P – Tasa de crecimiento Figura 36

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	0	1	0,0028	1	0,3219
	Fuente	0	1	0,0028	1	0,3219
	Error	0,01	4	0,0022		
	Total	0,01	5			

# Watanabea caviahuensis

#### Medias con letra común no son significativamente diferentes. p>0,05

#### pH-Densidad de células totales Figura 27

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	836502615593,11	5	167300523119	11	0,0005
	pН	836502615593,11	5	167300523119	11	0,0005
	Error	190431960980	12	1,59E+010		
	Total	1026934576573,11	17			
Test Bonferroni. Alfa=0,05. DMS=375313,62181	pН	Medias	n	E.E	Grupo	
	2	244668	3	72730,85	А	
	7	569222	3	72730,85	А	В
	3	621662,67	3	72730,85		В
	4	665256	3	72730,85		В
	5	856524,67	3	72730,85		В
	6	904115,33	3	72730,85		В

### pH-Tasa de crecimiento Figura 28

Análisis de la Varianza	FV	SC	gl	СМ	F	p-valor
	Modelo.	0,1	5	0	2	0,198
	pН	0,1	5	0	2	0,198
	Error	0,14	12	0		
	Total	0,24	17			