

# Flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones en el suministro del nutriente

**LUIS AUBRIOT**

TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA - OPCIÓN ECOLOGÍA  
PEDECIBA - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA





**PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS**  
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
PROYECTO URU/06/004, PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL  
DESARROLLO

PB/FC ATT 035.08

Montevideo, 7 de mayo de 2008

ÁREA BIOLOGÍA

ACTA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN ECOLOGÍA

“Flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones en el suministro del nutriente.”

presentada por el Mag. Luis Eduardo Aubriot Benia

el 13/05/08

Integración del Tribunal

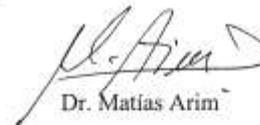
Dr. Omar Defeo, Presidente  
Dr. Julio Hernández, Vocal  
Dr. Matías Arim, Vocal

Director extranjero: Dr. Gernot Falkner  
Director local: Dr. Luis Acerenza  
Co-directores: Dres. Lina Bettucci y Daniel Conde

Fallo del Tribunal ACEPTACIÓN CON MENCIÓN

  
Dr. Julio Hernández

  
Dr. Omar Defeo

  
Dr. Matías Arim

Los directores y co-directores no participan en la calificación de la tesis.

**ÁREA DE BIOLOGÍA**

Facultad de Ciencias - Iguá 4225 esq. Mataojo - 11400 Montevideo - Uruguay  
Casilla de Correo 16120, Distrito 6 - Montevideo - URUGUAY

Teléfono y fax: (5982) 525 86 29. e-mail: [pedebiol@fcien.edu.uy](mailto:pedebiol@fcien.edu.uy), [isolina@fcien.edu.uy](mailto:isolina@fcien.edu.uy)



**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas**  
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
PROYECTO URU/97/016, PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL  
DESARROLLO

Montevideo, mayo 13 de 2008

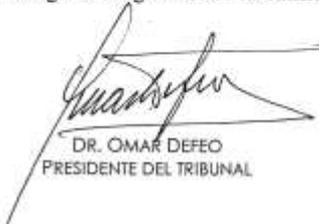
**FUNDAMENTACIÓN DEL FALLO DEL TRIBUNAL**

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Luis Aubriot**

Los integrantes del Tribunal de tesis de Doctorado del Mag. Luis Aubriot consideran lo siguiente:

- 1) El trabajo es original y aborda aspectos referidos a la flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por parte del fitoplancton. Este tema es de relevancia a nivel internacional y la tesis desarrollada constituye uno de las primeras aproximaciones al respecto en sistemas acuáticos de nuestro país.
- 2) Las hipótesis de trabajo son de actualidad en la disciplina y la metodología aplicada es adecuada, habiendo desarrollado un arduo trabajo de campo y experimental. Los resultados generados son relevantes y permitieron apoyar o refutar (según el caso) las hipótesis planteadas, en función de un detallado análisis estadístico de la información generada.
- 3) La presentación oral fue sobria, clara y contundente. Las preguntas que se le formularon fueron respondidas con un excelente nivel, demostrando un amplio dominio en el tema.
- 4) Dado el excelente trabajo realizado, se espera que se concreten varias publicaciones internacionales derivadas de este esfuerzo.

Por lo que antecede, este Tribunal otorga al Mag. Aubriot la calificación de **ACEPTACIÓN CON MENCIÓN**.



DR. OMAR DEFEO  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

---

**AREA DE BIOLOGÍA**

Facultad de Ciencias - Iguá 4225 esq. Matajojo - 11400 Montevideo - Uruguay  
Casilla de Correo 16120, Distrito 6 - Montevideo - URUGUAY  
Teléfono y fax: (5982) 525 86 29. e-mail: [pedebiol@fcien.edu.uy](mailto:pedebiol@fcien.edu.uy), [isolina@fcien.edu.uy](mailto:isolina@fcien.edu.uy)



PEDECIBA - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

# Flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones en el suministro del nutriente

## **LUIS EDUARDO AUBRIOT BENIA**

Sección Limnología, Departamento de Ecología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República (UdelaR).

### DIRECTOR EXTRANJERO:

#### **PROF. DR. GERNOT FALKNER**

Department of Cell Biology, University of Salzburg.  
Institute of Limnology Mondsee, Austrian Academy of Sciences.

### DIRECTOR:

#### **DR. LUIS ACERENZA**

Laboratorio de Biología de Sistemas, Departamento de Biología. Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. UdelaR.

### CO- DIRECTORES:

#### **DRA. LINA BETTUCCI**

Sección Micología, Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. UdelaR.

#### **DR. DANIEL CONDE**

Sección Limnología, Departamento de Ecología. Facultad de Ciencias. UdelaR.

### TRIBUNAL DE LA TESIS:

**DR. OMAR DEFED** (Presidente)

**DR. JULIO HERNÁNDEZ** (Vocal)

**DR. MATÍAS ARIM** (Vocal)

### **FECHA Y LUGAR DE LA DEFENSA DE LA TESIS:**

Montevideo, 13 de Mayo de 2008.  
Facultad de Ciencias, Universidad de la República.



# Índice

	página
Resumen	iv
Abstract	v
Agradecimientos	vi
Glosario de símbolos	viii
<hr/>	
<b>Capítulo 1</b>	
Introducción general	1
Hipótesis general de trabajo	5
Objetivos	5
Alcances de la investigación	5
Consideraciones teóricas	7
<b>Capítulo 2</b>	
Cambios en la deficiencia por fosfato de la comunidad de fitoplancton en un lago hipereutrófico	12
Introducción	12
Materiales y métodos	13
Resultados y discusión	16
<b>Capítulo 3</b>	
Respuestas cinéticas de la incorporación de fosfato por fitoplancton de un lago hipereutrófico a las fluctuaciones ambientales del nutriente	24
Introducción	24
Materiales y métodos	25
Resultados	27
Discusión	37
<b>Capítulo 4</b>	
Persistencia a largo plazo de las alteraciones cinéticas de incorporación de fosfato por fitoplancton y su influencia en la tasa de crecimiento	44
Introducción	44
Materiales y métodos	45
Resultados	47
Discusión	58
<b>Capítulo 5</b>	
La respuesta de la incorporación de fosfato por fitoplancton es sensible a la secuencia de pulsos del nutriente	63
Introducción	63
Materiales y métodos	64
Resultados	66
Discusión	81
<b>Capítulo 6</b>	
Discusión general y conclusiones	87
<b>Capítulo 7</b>	
Perspectivas de investigación	100
<b>Capítulo 8</b>	
Bibliografía	103
Apéndices	110
Apéndice 1	110
Apéndice 2	112

---

## Resumen

Los requerimientos nutricionales del crecimiento del fitoplancton en ambientes acuáticos son un aspecto fundamental de los estudios limnológicos. En general, el crecimiento microalgal en lagos se encuentra limitado por la baja concentración de fosfato disponible. En consecuencia, los sistemas celulares de incorporación del nutriente se activan y el fosfato es rápidamente utilizado por la comunidad. Como resultado, la concentración de fosfato externo disminuye hasta un nivel umbral donde la incorporación neta cesa por razones energéticas. El fosfato incorporado es almacenado en gránulos de polifosfato para permitir el crecimiento durante períodos de escasez del recurso. Usualmente se considera que la tasa de crecimiento es proporcional al polifosfato acumulado. Sin embargo, no existen evidencias para suponer que la célula realice un monitoreo del tamaño de la reserva para fijar la tasa de crecimiento, lo que plantea un problema de regulación: los organismos deben incorporar suficiente fosfato para sustentar el crecimiento constante, pero el tamaño de los gránulos no debe distorsionar las estructuras celulares. Este problema requiere de un tipo de adaptación fisiológica que permita regular la incorporación de fosfato y el crecimiento de forma energéticamente favorable frente a las fluctuaciones del nutriente. Se demostró que cianobacterias aisladas modifican las propiedades cinéticas de los sistemas de incorporación de fosfato en condiciones fluctuantes del suministro del nutriente. Asimismo, un monitoreo de la incorporación de fosfato por fitoplancton natural reveló que los cambios en las propiedades de incorporación se asocian con los aportes en el suministro del recurso. Sin embargo, no se conoce si la comunidad en su conjunto posee la capacidad de adaptar la cinética de incorporación de fosfato a los cambios en el suministro del recurso ni su implicancia en el crecimiento algal. El objetivo general de la presente tesis fue investigar los patrones de la incorporación neta de fosfato por la comunidad de fitoplancton en un lago hipereutrófico como respuesta a las fluctuaciones en la concentración externa del nutriente. La principal pregunta planteó si el fitoplancton del Lago Rodó tiene la capacidad de alterar la cinética de incorporación de fosfato cuando se producen fluctuaciones en la concentración externa del recurso y si estos cambios fisiológicos afectan la tasa de crecimiento. Durante el período de estudio, la comunidad fitoplanctónica del Lago Rodó estuvo dominada por cianobacterias filamentosas (*Planktothrix agardhii* y *Raphidiopsis mediterranea*). Los resultados mostraron que las cortas escalas temporales del proceso de incorporación y el rango de concentración nanomolar del valor umbral dificultan la construcción de una relación histórica del crecimiento fitoplanctónico a partir de la determinación de nutrientes en este tipo de lagos. Debido a la sensibilidad de respuesta de los organismos fue necesario aplicar una estrategia experimental para modificar el rango de concentración y tiempos de exposición aplicados al estado fisiológico prevaleciente del fitoplancton en el ambiente. Aplicando secuencias de pulsos de fosfato a incubaciones de fitoplancton natural pudo demostrarse que las alteraciones de la cinética de incorporación de fosfato se producen de forma coherente y homogénea, debido a que la reducción de la tasa de incorporación y el aumento del valor umbral ocurren previo a colmar su capacidad de incorporación y a que dicho valor se mantuvo elevado por un período prolongado (>20 horas). Estas respuestas cinéticas se asociaron con un mayor crecimiento fitoplanctónico. Los cambios cinéticos reflejaron la persistencia de los incrementos previos del nutriente a los que los organismos estuvieron expuestos, aunque no se asociaron directamente con la concentración del pulso de fosfato. A su vez, la persistencia del fosfato en el medio dependió de la actividad del conjunto de la comunidad. La sensibilidad y flexibilidad fisiológica del fitoplancton frente a las fluctuaciones de fosfato se evidenció en la respuesta diferencial a pulsos idénticos pero aplicados en orden inverso. Los resultados experimentales y la simulación de escenarios con un modelo propuesto para describir una comunidad cuestionan el concepto de exclusión competitiva por agotamiento del recurso. Asimismo, los resultados de la presente tesis sugieren que el grado de flexibilidad de respuesta para optimizar la obtención del fosfato externo fluctuante debe ser un factor clave para el crecimiento y la estabilidad de las poblaciones de fitoplancton en el medio acuático. La coherencia y persistencia de la respuesta fisiológica se discute en relación a una posible propiedad de almacenamiento y transferencia de información de los estados fisiológicos adaptados a los pulsos previos.

## Abstract

The nutritional requirements of phytoplankton growth are a central issue in limnological studies. Generally, the microalgal growth in lakes is limited by the low concentration of available phosphate. In consequence, the cellular uptake systems activate and the external phosphate is rapidly utilized by the community. As a result, the external concentration decreases to a threshold level in which net phosphate incorporation ceases for energetic reasons. During transient increases, phosphate is taken up and stored in polyphosphate granules to sustain growth during resource shortage periods. Usually, it is considered that growth rate is proportional to the stored phosphate. However, there are no evidences to speculate that the size of the granules is monitored by the cell in order to fix the growth rate. Therefore, a regulation problem emerges when sufficient phosphate must be incorporated by the organisms to sustain constant growth but the size of polyphosphate granules must not disrupt cell structures. This problem can be solved through a physiological adaptation that allows the cell to regulate phosphate uptake and growth in an energetically favourable mode according to the external phosphate fluctuations. Investigations with cyanobacteria cultures showed that the phosphate uptake systems adapt their kinetic properties to the prevailing phosphate fluctuations previously to saturate the storage capacity of the cell. A monitoring of the phosphate uptake behaviour of natural phytoplankton in lakes revealed changes in kinetic properties which were related to fluctuations in phosphate supply. However, it is unknown if the whole community has the capability of adapting the phosphate uptake kinetics to the external phosphate alterations as well as its role for algal growth. The general objective of this thesis was to investigate the patterns of net phosphate uptake by the phytoplankton community in a hipereutrophic lake under fluctuations in the external phosphate concentration. The main question addressed was if the capability of phytoplankton community of Lago Rodó has the property of altering their kinetic properties of phosphate uptake when subjected to fluctuations in the external concentration and if these physiological changes affect the growth rate. During the study period, phytoplankton was dominated by filamentous cyanobacteria (*Planktothrix agardhii* and *Raphidiopsis mediterranea*). The results showed that it is not possible to construct a historical relationship between the phytoplankton growth and the nutrient concentration in this type of lakes due to the short temporal scale of the uptake process and the nanomolar concentration range of the threshold value. It was necessary to develop a research strategy to adapt the applied phosphate concentration ranges and exposure times to the prevailing physiological state of the phytoplankton in the lake. It was shown in this thesis that incubations performed with natural phytoplankton subjected to sequences of phosphate pulses responded coherently and homogeneously by reducing the uptake rate and increasing the threshold value before saturating their store capacity. The higher threshold value was kept for a prolonged period of time (>20 hours) and the new kinetic properties were related with a higher growth rate. These kinetic alterations reflected the persistency of previous phosphate increments to which the organisms were exposed, although these alterations were not related with the total concentration applied. In addition, the persistency of phosphate in the medium depended on the activity of the whole community. The sensitivity and physiological flexibility of phytoplankton to phosphate fluctuations were revealed when a distinct adaptive response was observed under identical pulse concentrations but applied in inverse order. Laboratory experiments and a model simulation of possible scenarios performed in this thesis contradict the exclusion competitive principle due to resource exhaustion. Furthermore, these results suggest that the kinetic response flexibility to optimally acquire the fluctuating external phosphate may be a key factor for the growth and stability of phytoplankton populations. The coherence and persistency of the physiological response are discussed in relation to a possible information storage and propagation property of the adapted states to previous phosphate fluctuations.

---

## Agradecimientos

La posibilidad de haber realizado esta tesis surge, cronológicamente, del apoyo recibido por Daniel Conde, Wilson Pintos y Ruben Sommaruga para realizar mis primeros estudios de posgrado en Austria en 1995. Allí tuve la oportunidad de conocer al Prof. Gernot Falkner en el curso de química acuática y microbiología. Gernot inmediatamente me despertó una fuerte curiosidad por la ecofisiología de fitoplancton por sus ideas controversiales acerca del tema y de la Limnología en general, las que eran discutidas a menudo en las pausas del café. Casi intuitivamente comencé a interiorizarme en los estudios de incorporación de fosfato por fitoplancton y en sus implicancias. Luego de terminar la tesis de Maestría, Gernot aceptó orientarme para continuar con la investigación. Entonces comenzó una intensa exploración en la que cada resultado experimental que enviaba era respondido inmediatamente con interpretaciones entusiastas y conceptos que inspiraban el paso siguiente. En dos ocasiones tuve la oportunidad de discutir los resultados de la tesis y planificar nuevos experimentos, para lo cual fui recibido por él y su esposa Renate con una hospitalidad y calidez que no había imaginado. Los temas de la tesis y otros más generales, fueron charlados y discutidos en el ámbito académico formal, pero también en almuerzos y cenas (cerveza *Stiegel* mediante), bicicleteadas, caminatas en la montaña y hasta en la panadería. Me di cuenta que su capacidad de reflexión y pensamiento crítico casi no tiene descanso. Es así que estoy profundamente agradecido con Gernot por el constante apoyo y entusiasmo que me brindó todos estos años y porque la formación que me dio excedió generosamente el tema de la tesis y abarcó aspectos científico-filosóficos que espero ser capaz de aprovechar para la etapa que continúa. Le agradezco a Gernot y a Renate su enorme hospitalidad y generosidad al recibirme en su casa, lo que hizo que mis estadías en Austria fueran tan disfrutables y enriquecedoras como el gran valor académico que significaron. Todo esto no pudo resultar en otra cosa que no fuese una entrañable amistad. También les agradezco a ambos su gran generosidad y confianza en donar, en dos oportunidades, equipamiento de laboratorio, fungibles y reactivos de gran valor, los que fueron esenciales para poder realizar esta tesis y darle continuidad a esta investigación.

Agradezco a Luis Acerenza por su sincero interés y apoyo, los que fueron fundamentales para la realización de la tesis. También por su compromiso y dedicación rigurosa en comprender un tema lejano a su área, resultando en el aporte de conceptos y puntos de vista críticos que enriquecieron sustancialmente la tesis, sus perspectivas y mi formación.

A Lina Betucci por su apoyo y sus aportes, los que contribuyeron a que el manuscrito de tesis reflejará mejor el tipo de investigación que realizamos. Sus reflexiones y cuestionamientos mejoraron la claridad y formalidad de la tesis.

A Sylvia Bonilla porque su entusiasmo, interés, curiosidad y sus sólidos conocimientos sobre el fitoplancton llevaron a que hiciera aportes clave tanto en el diseño de los experimentos, en la interpretación de resultados y fundamentalmente en la redacción del manuscrito de tesis. Su ayuda y experiencia en la identificación de fitoplancton fueron esenciales para realizar este trabajo. También por los siempre sabios consejos de amiga.

A Daniel Conde le estoy una vez más agradecido, y ésta quizás la más importante, por el respaldo y empuje que generosamente le dio a mi formación en un tema nuevo para la Sección. Este trabajo fue posible también gracias a la libertad, confianza e interés que Daniel depositó en mi trabajo.

A Javier Gorga porque gracias a su habilidad natural para discutir, su creatividad, sentido del humor, su casi descontrolada hiperactividad, combinadas con su amistad, dio lugar a cuestionamientos y puntos de vista que estimularon mi trabajo. También porque las agotadoras maratones de más de catorce horas de experimentos se transformaban en diversión cada vez que tuve el privilegio de compartir el laboratorio con él hasta altas horas de la noche. Sin duda fueron los mejores experimentos.

A Anamar Britos por su ayuda en los primeros experimentos, por el análisis de bacterioplancton y por las micrografías con DAPI que utilicé para componer la carátula de la tesis. A Elena por su compañerismo en las horas de laboratorio compartidas y por las delicias culinarias que llevó más de una vez. A Leticia por su despreñida ayuda. A Carla por su ayuda en cuestiones estadísticas y a Angel por centrifugar ideas y alentar.

A los compañeros de la Sección: Lorena, Lizet, Rafa, Carcas, por su ayuda directa o indirecta, por la comprensión y confianza que depositaron en mí en el manejo del temible <sup>32</sup>P.

A los miembros del tribunal de la tesis Dr. Omar Defeo, Dr. Matías Arim y Dr. Julio Hernández por los valiosos aportes y rigurosas críticas realizadas, lo que sin duda me permitió profundizar más en las implicancias, alcance y perspectivas de este trabajo.

A Thelmo Olivera por el retiro acelerado del <sup>32</sup>P del Aeropuerto en varias oportunidades. Al Tito que me llevó varias veces a muestrear al lago desinteresadamente y siempre que estuvo libre (en la gran mayoría de los casos fui con vehículo prestado (gracias Pa!) o en la bici, con los bidones y sensores, mientras que los vehículos de Facultad estaban "ocupados" en el estacionamiento).

A Claudio Martínez y Mónica Marín de la Sección Bioquímica por respaldarme en la búsqueda de fondos para la reparación, en dos oportunidades, del Contador de Centelleo Líquido de la sala de equipos pesados. Este equipo fue esencial para mi trabajo y sus averías implicaron el retraso de esta tesis por casi dos años, principalmente debido a la dificultad en la obtención de fondos de la Facultad para su reparación.

Agradezco a DINACYT por el apoyo financiero brindado con el proyecto N° 7026, Fondo "Profesor Clemente Estable", Área Biología, el cual fue fundamental para iniciar este trabajo. Al PEDECIBA por el apoyo económico otorgado con la beca de Doctorado. También por el apoyo económico recibido de CSIC: Beca de Adecuación CSIC (otorgada en 2002), Relacionamento Académico con el Exterior (2004 y 2006), Beca de Apoyo para la Finalización de Estudios de Posgrado (2007).

A mis viejos por su apoyo sin límites, por brindarme todo para crecer y ser integralmente. Por haber disfrutado el hacer este camino tanto o más que yo. A Jacque, Sofi y Cami por compartir mi alegría.

A Malvina por su enorme apoyo, comprensión y entusiasmo contagioso. Por sus lúcidos, perspicaces e inteligentes aportes. Porque todo fue más de lo que imaginé y por este descubrimiento enorme.

*Dedicado a mi bisabuelo, Juan María Aubriot (1876-1930)<sup>10</sup>,  
por lo que siempre me inspiró.*

---

<sup>10</sup> Arq. Juan María Aubriot (1876-1930). Hijo de un capitán mercante de la Bretaña francesa, profesional y profesor universitario graduado en 1904 en la ex Facultad de Matemáticas. Profesor de Composición, Ornato y Matemáticas Superiores en la Facultad de Arquitectura, y miembro de su Consejo Directivo. Profesor de Química, Física y Mineralogía, en los Institutos Normales; de Física en la ex Academia Militar; de Matemáticas en el ex Instituto de Química Industrial. Presidente de la ex Junta Económico-Administrativa de Montevideo; presidente de la ex Comisión Departamental de Instrucción Pública. Autor de los actuales edificios de la Universidad de la República y Facultad de Derecho y del Instituto «Vásquez Acevedo» (ex Sección de Enseñanza Secundaria y Preparatoria) en colaboración con el Arq. S. Geranio, inaugurados en enero 21 y 22 de 1911. También fue arquitecto del Palacio Lapido (1930), los antiguos «Portones» de Carrasco y la Residencia Presidencial "de Suárez", entre otros.

## Glosario de símbolos

---

$a$	moles de ATP hidrolizado por moles de fosfato activamente transportado a través de la membrana celular
AB	submuestra del experimento pretratada con un pulso de concentración de fosfato alto y otro bajo
ADP	concentración de ADP citoplasmático
ATP	concentración de ATP citoplasmático
BA	submuestra del experimento pretratada con un pulso de concentración de fosfato bajo y otro alto
$B_T$	biovolumen de cada taxa de fitoplancton
C	submuestra control del experimento
Clo $a$	clorofila $a$
$C_t$	transportador libre
$C_tP$	complejo fosfato transportador del lado externo o interno de la membrana ( $C_tP_e$ y $C_tP_i$ , respectivamente)
$\Delta G$	energía libre de la reacción
$\Delta pH_T$	es el gradiente de pH a través de la membrana tilacoide
$J_{ATP}$	tasa de formación de ATP por fotofosforilación
$J_P$	flujo neto de fosfato, tasa neta de incorporación de fosfato
$J_{PP}$	tasa de formación de polifosfato
$J_P^{act}$	flujo de fosfato activo a través de la membrana celular impulsado por una ATPasa
$J_P^{pas}$	flujo de fosfato a través de la membrana celular por difusión facilitada
$K'$	constante de equilibrio para la formación de polifosfato
$K_1$	constante de equilibrio para la distribución pasiva de fosfato a través de la membrana celular
$K_{ATP}$	constante de equilibrio para la hidrólisis de ATP
$K_e$	constante de Michaelis-Menten de las reacciones hacia el citoplasma
$K_i$	constante de Michaelis-Menten de las reacciones desde el citoplasma
L	coeficiente de conductividad de la membrana del término no lineal de la relación flujo–fuerza
$L_1$	coeficiente de conductividad de la relación flujo–fuerza para el transporte activo
$L_2$	coeficiente de conductividad de la relación flujo–fuerza para la formación de ATP por fotofosforilación

$L_3$	coeficiente de conductividad de la relación flujo–fuerza para la formación polifosfato
$L_p$	coeficiente de conductividad de la membrana del término lineal la relación flujo–fuerza
$L_{pas}$	coeficiente de conductividad de la relación flujo–fuerza para transporte pasivo de fosfato
$m$	exponente entero $> 1$ del término no lineal de la relación flujo–fuerza
$n$	número de alícuotas tomadas de la submuestra de fitoplancton. Subíndice: número de moléculas
$n$	estequiometría de protones/ATP de la fotofosforilación
$n_p$	número promedio de protones transportados por fosfato incorporado
$n_p H^+$	número promedio de protones transportados a través de la membrana tilacoide
$n_p H^C$	número promedio de protones transportados al citoplasma
$NH_4$	amonio
$NID$	nitrógeno inorgánico disuelto
$NO_2$	nitrito
$NO_3$	nitrato
$N_T$	nitrógeno total
+N	submuestras preincubadas con la adición de nitrato
OD	oxígeno disuelto
$P_e$	concentración de fosfato externo
$P_i$	concentración de fosfato citoplasmático
$^{32}P$	isótopo radiactivo de fósforo
$[^{32}P_e]$	concentración de fosfato externo marcado con el isótopo radiactivo de fósforo
$[P'_e]_A$	concentración umbral de fosfato medida experimentalmente (promedio y desvío estándar de al menos las tres últimas concentraciones mínimas de $^{32}P_e$ luego de la aplicación de cada pulso de $^{32}P$ )
$[P_e]_A$	concentración umbral de fosfato determinado con el ajuste de la función flujo-fuerza
$PO_4$	ortofosfato
PP	polifosfato
$P_T$	fósforo total
+P	submuestras incubadas con la adición de fosfato no radiactivo
RT	R: constante de los gases; T: temperatura absoluta
S	concentración de sustrato inicial
$S_0$	concentración de sustrato externo a las células en el tiempo t
$S_1, S_2$ y C	submuestras de fitoplancton tomadas de la misma muestra de agua del Lago Rodó
sp1, 2 y 3	representación de especies teóricas de fitoplancton utilizadas para la simulación de la incorporación de fosfato por una comunidad
$t_E$	tiempo de exposición del fitoplancton al $^{32}P_e$ sobre el valor umbral
$V_e$	velocidad máxima de transporte de fosfato al citoplasma
$V_i$	velocidad máxima de transporte de fosfato desde el citoplasma



# Capítulo 1

---

## Introducción general

---

### Introducción

Uno de los temas centrales de investigación en ecología acuática refiere al estudio de las ventajas adaptativas que permiten a los organismos fitoplanctónicos obtener los recursos necesarios para sustentar el crecimiento y cómo esto influye en la estructura de la comunidad, la interacción entre las poblaciones y el ambiente (Reynolds 1997). Generalmente, los requerimientos nutricionales del fitoplancton están relacionados con su composición elemental, la cual es similar a la proporción de nutrientes encontrada en la mayoría de los ecosistemas acuáticos. Así, Redfield et al. (1963) propusieron una relación atómica óptima entre fosfato ( $\text{PO}_4$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3$ ) de 16:1 para el crecimiento algal, la cual es modulada por el propio metabolismo del fitoplancton en los ecosistemas. Sin embargo, existen desviaciones de esta relación y su rol en los ciclos biogeoquímicos globales es pobremente comprendido (Christian 2005). Estas desviaciones pueden deberse a que las estructuras celulares tienen su propia y única composición estequiométrica (Falkowski 2000, Geider & La Roche 2002). También, a la plasticidad fisiológica del fitoplancton de fijar nitrógeno atmosférico, a su capacidad de adaptarse al estrés por fósforo mediante la reducción de varios requerimientos celulares y al almacenamiento de fosfato en acúmulos intracelulares (Klausmeier et al. 2004, Christian 2005). Los cambios en la relación atómica debido al aporte diferencial de nutrientes pueden dar lugar al crecimiento masivo de fitoplancton en lagos y océanos (Arrigo 2005). En general, en sistemas acuáticos continentales, el fenómeno de crecimiento masivo se circunscribe al grupo de las cianobacterias, aunque las causas que lo provocan no han sido completamente esclarecidas (Dokulil & Teubner 2000). Las floraciones de microalgas se han transformado en una problemática frecuente para los lagos someros a escala mundial, como consecuencia del aumento del aporte de nutrientes de origen antrópico y el cambio climático (Scheffer et al. 1997, De León & Yunes 2001, Dokulil & Teubner 2003, Jackson 2003, Scheffer 2007), con el agravante de la presencia de especies productoras de toxinas (Albay et al. 2003). Considerando la importancia de los requerimientos nutricionales que gobiernan el crecimiento del

fitoplancton en ambientes naturales, el estudio de la relación entre la utilización de nutrientes y el crecimiento de las poblaciones microalgales posee valor teórico y aplicado.

En general, el crecimiento fitoplanctónico en lagos se encuentra limitado por las bajas concentraciones disponibles de fosfato (Hudson et al. 2000), y por lo tanto, un incremento en el aporte de este nutriente resultará en la estimulación del crecimiento microalgal (Schindler 1977). La incorporación de nutrientes y el crecimiento de microalgas han sido descritas por varios modelos empíricos. El modelo de Michaelis-Menten es el más utilizado y relaciona la tasa irreversible de incorporación con la concentración externa de sustrato, la que será igual a cero cuando todo el sustrato sea convertido en producto. Por esta razón, la relación entre la tasa de incorporación en función de la concentración de sustrato pasará por el origen. Análogamente, Monod (1950) formuló la tasa de crecimiento como una función hiperbólica de la concentración externa del nutriente, asumiendo que la absorción del sustrato externo obedece la función de Michaelis-Menten. A su vez, el modelo de Droop (1973) describe la tasa de crecimiento en función de la cantidad de nutriente almacenado (cuota) y predice que el crecimiento se detiene a una concentración intracelular mínima (cuota mínima). Combinaciones de las constantes cinéticas de estos modelos se han utilizado para caracterizar la incorporación de nutrientes por especies de fitoplancton y así clasificar a los organismos en estrategias de incorporación y crecimiento (Sommer 1989, Sommer 1995, Spijkerman & Coesel 1997, Ducobu et al. 1998). Según la clasificación de Sommer (1989), es esperable que en ambientes deficientes en fosfato, en los cuales ocurran pulsos de concentración poco frecuentes, se seleccionen especies con una alta capacidad de almacenar el nutriente (estrategias por almacenamiento). Asimismo, en ambientes en los que se producen pulsos pequeños y frecuentes de fosfato se seleccionarán especies con crecimiento rápido (estrategias por crecimiento) y el aporte de bajas concentraciones externas favorecerá a organismos con una alta afinidad por el sustrato (estrategias por afinidad) (Sommer 1989). Estas estrategias fueron construidas sobre las bases teóricas de la función de Michaelis, la teoría de competencia por recursos y el principio de exclusión competitiva para fitoplancton de Tilman (1982). Esta clasificación presupone que la utilización de un mismo recurso por varias especies de fitoplancton en lagos impone una restricción y que los prerrequisitos necesarios para evitar la exclusión por agotamiento del recurso son poseer una alta velocidad de incorporación o una mayor capacidad de almacenamiento del recurso (Sommer 1989). Esta aparente competencia por un mismo recurso en un medio relativamente homogéneo, admite que únicamente el mejor competidor sobreviva (Hardin 1960). Sin embargo, dicha idea se contradice con la gran diversidad de las comunidades de fitoplancton, observación que se denominó "paradoja del plancton" (Hutchinson 1961). Desde entonces se han propuesto varias soluciones relacionadas con las condiciones de no equilibrio, como la co-limitación por nutrientes y las oscilaciones o fluctuaciones caóticas (Huisman & Weissing 1999, 2000, 2001). Un denominador común de estas interpretaciones es la variabilidad del medio externo en combinación con la inalterabilidad de las propiedades fisiológicas de los organismos, según se argumenta en algunas críticas (Reynolds 1998, Falkner & Falkner 2000). Al respecto, el modelo de Huisman et al. (2001) muestra que es posible un aumento de la diversidad esperada cuando se incluyen propiedades fisiológicas alternables entre los grupos coexistentes.

Otros conceptos sobre el proceso de incorporación de fosfato y el crecimiento de fitoplancton surgen de observaciones directas realizadas en lagos y en cultivos deficientes por fosfato. Bajo esta condición nutricional, los sistemas celulares de incorporación del nutriente se activan y el fosfato disponible es rápidamente utilizado por la comunidad de fitoplancton (Einsele 1941, Rigler 1956).

Rigler (1956) observó que, luego de repetidas adiciones de fosfato radiactivo aplicadas directamente a un lago, la incorporación del trazador se detuvo a la misma concentración mínima estacionaria. Posteriormente, se pudo determinar en condiciones de laboratorio que la concentración de fosfato decrece hasta niveles en donde la energía requerida por el sistema de incorporación se hace insuficiente para superar el gradiente de concentración a través de la membrana celular (Falkner et al. 1989, Wagner et al. 1995, Falkner et al. 1996). Entonces, la incorporación y el crecimiento posterior del fitoplancton es sólo posible si la concentración externa de fosfato excede, al menos ocasionalmente, este valor umbral energético, el cual se encuentra usualmente en rangos nanomolares (Falkner et al. 1989, Falkner et al. 1994, Aubriot et al. 2000). Debido a que estas bajas concentraciones se encuentran por debajo de los límites de detección de los métodos analíticos convencionales, existen escasas investigaciones sobre la regulación de la incorporación neta de fosfato por fitoplancton natural (Falkner et al. 1984, Falkner & Falkner 1989, Istvánovics et al. 1994, Istvánovics & Herodek 1995) y particularmente sobre el valor umbral (Falkner & Falkner 1989, Aubriot et al. 2000). Se han observado desviaciones de los modelos empíricos, especialmente en rangos bajos de concentración, debido a la existencia del valor umbral de fosfato en cultivos algales y en fitoplancton en lagos (Olsen 1989). Por esta razón, varios autores han optado por la sustitución de la concentración de sustrato inicial en el medio (S) por el término  $S-S_0$ , siendo  $S_0$  la concentración de sustrato externo a las células al tiempo t (Droop 1974, Button 1985, Smith & Yamanaka 2007). Sin embargo, esta modificación de la ecuación de Michaelis altera la base teórica de la ecuación original para la interpretación de la incorporación neta de nutrientes (Falkner et al. 1995).

Cuando el fosfato se incorpora de forma activa es almacenado mediante la agregación del nutriente en gránulos osmóticamente inertes (Kulaev & Vagabov 1983). Los polifosfatos formados serán la fuente de fósforo para la proliferación celular ("fenómeno excedente" o "*surplus phenomenon*", Liss & Langen 1962). Usualmente se considera que la tasa de crecimiento es mayor cuanto más fosfato es acumulado por los organismos (Droop 1973). Sin embargo, el monitoreo directo del tamaño de la reserva por la célula en crecimiento es difícil de conjeturar, por lo que queda planteada la incógnita acerca de las bases fisiológicas del enlace entre el almacenamiento de polifosfato y la tasa de crecimiento microalgal (Wagner et al. 2000). Entonces, este almacenamiento plantea un problema de regulación, debido a que el fitoplancton debe incorporar suficiente fosfato durante los incrementos externos transitorios para sustentar el crecimiento constante; sin embargo, los gránulos de polifosfato no deben ser demasiado grandes como para distorsionar las estructuras celulares. Este problema aparente puede resolverse a través de un tipo de regulación fisiológica que permita ajustar la incorporación de fosfato de forma energéticamente favorable frente a los incrementos en el suministro del nutriente (Falkner et al. 1996). Investigaciones con cultivos de una cianobacteria picoplanctónica (*Anacystis nidulans*) y otra filamentosa (*Anabaena variabilis*) pudieron determinar que, bajo condiciones fluctuantes del suministro de fosfato, los sistemas de incorporación de estas cianobacterias modifican sus propiedades cinéticas mediante el incremento del valor umbral, independientemente de la cantidad de fosfato almacenado (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995, Falkner & Falkner 2003). Este comportamiento del sistema de incorporación fue denominado "adaptación" por Falkner et al. (1989) y se circunscribe a la definición de Begon et al. (1990): "los cambios en la forma o comportamiento de un organismo durante su vida, como respuesta a estímulos ambientales". Aplicado al caso presente se utilizará el término "adaptación fisiológica" (sensu Falkner et al. 1996)

como las alteraciones bioquímicas complejas por las cuales los organismos se aclimatan, de forma energéticamente favorable, a un patrón determinado del nutriente. Dicha definición se diferencia de las respuestas fisiológicas entendidas en términos generales debido a que estas últimas contemplan la inhibición de alguna función (ej.: respuesta a un tóxico). Entonces, la adaptación o aclimatación de los organismos sería una adaptación fisiológica *reversible* a uno o varios factores ambientales cambiantes (Prosser 1955, Lagerspetz 2006). Estas propiedades adaptativas del sistema de incorporación de fosfato están relacionadas con una mayor eficiencia en la utilización de la energía impulsora del proceso (Falkner et al. 1993). La eficiencia del proceso se puede analizar mediante la dependencia lineal entre la tasa de absorción de sales minerales y el logaritmo de la concentración externa, originalmente estudiada en plantas por Thellier (1970). Posteriormente, Falkner et al. (1989) propusieron que esta dependencia puede ser expresada como una relación proporcional entre el flujo y la fuerza impulsora del proceso de incorporación (relación flujo-fuerza). Esta relación fue utilizada para analizar las propiedades adaptativas de incorporación de fosfato en cultivos de cianobacterias unicelulares y filamentosas (ej.: Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995, Falkner & Falkner 2003), así como para analizar la incorporación del nutriente por fitoplancton en lagos (Falkner & Falkner 1989, Istvánovics & Herodek 1995, Aubriot et al. 2000).

El premarcado de comunidades naturales con [ $^{32}\text{P}$ ] y el análisis de la cinética de incorporación con la relación flujo-fuerza, demostraron ser herramientas apropiadas para interpretar el comportamiento de incorporación neto de fosfato por fitoplancton natural (Aubriot et al. 2000). Aubriot et al. (2000) determinaron que la cinética de incorporación y los valores umbrales de fosfato del fitoplancton variaron de acuerdo al suministro del nutriente en lagos (Aubriot et al. 2000). En general, el valor umbral aumentó y la tasa de incorporación de fosfato disminuyó cuando se produjo un aporte del nutriente al ecosistema. Estos cambios pueden ser explicados por dos hipótesis alternativas que surgen del trabajo de Aubriot (2000): (1) la nueva condición nutricional en el ambiente provoca un cambio en la estructura de la comunidad, tal que favorece el desarrollo de los organismos con las propiedades cinéticas y energéticas observadas. Esta idea está basada en la noción de competencia por recursos, a partir de la cual se considera que las especies fitoplanctónicas poseen propiedades cinéticas de incorporación de nutrientes estables y específicas, las cuales fueron evolutivamente seleccionadas (ej.: Tilman 1982, Sommer 1999). (2) Estos cambios cinéticos y energéticos reflejan una propiedad fisiológica de la comunidad, mediante la cual los organismos se adaptan de forma energéticamente favorable a los incrementos de la concentración de fosfato, de forma tal que cada organismo modifica su actividad de incorporación de modo coherente, mediante la obtención de un valor umbral común y estable. Esta respuesta fisiológica podría determinar procesos celulares subsecuentes que resulten en una regulación del crecimiento de los organismos (Wagner et al. 2000).

Al presente no existen evidencias experimentales que demuestren la capacidad de la comunidad de fitoplancton de modificar su fisiología de forma coherente y uniforme con respecto a las fluctuaciones del nutriente, con el fin de obtener los recursos de un modo energéticamente favorable. Por consiguiente, el objetivo general de la presente tesis fue investigar los patrones de la incorporación neta de fosfato por la comunidad de fitoplancton en un lago hipereutrófico como respuesta a las fluctuaciones en la concentración externa del nutriente. Asimismo, se procuró caracterizar si las respuestas cinéticas de incorporación de fosfato por el fitoplancton se producen de forma conjunta y uniforme con respecto a los valores umbrales de fosfato, su persistencia temporal, así como su relación con la estructura de la comunidad y su rol en el crecimiento

microalgal. Esta fisiología adaptable de los organismos y sus posibles ventajas energéticas podría explicar la presencia de un mayor número de especies coexistentes. Entonces, la permanencia en el ecosistema podría depender de su habilidad de optimizar la obtención del recurso para sustentar el crecimiento constante, de acuerdo al rango y amplitud de las fluctuaciones que ocurren en su ambiente.

## Hipótesis general de trabajo

La comunidad de fitoplancton de un lago hipereutrófico altera la cinética de incorporación de fosfato cuando se producen fluctuaciones en la concentración externa del nutriente y antes de saturar la capacidad de acumulación del mismo.

## Objetivos

### Objetivo general

Investigar los patrones de la incorporación neta de fosfato por la comunidad de fitoplancton en un lago hipereutrófico, como respuesta a los cambios en la concentración externa del nutriente.

### Objetivos específicos

1. Relacionar la deficiencia por fosfato del fitoplancton con las relaciones elementales entre nitrato y fosfato en el agua.
2. Determinar si una comunidad fitoplanctónica altera su cinética de incorporación de fosfato frente a los incrementos temporales en la concentración externa.
3. Probar si las nuevas curvas de remoción de fosfato se ajustan a la relación flujo-fuerza luego de una alteración de la cinética de incorporación del nutriente.
4. Investigar si los cambios cinéticos de la incorporación de fosfato varían con la estructura de la comunidad de fitoplancton.
5. Examinar si la alteración de la cinética de incorporación de fosfato afecta la tasa de crecimiento de la comunidad fitoplanctónica.
6. Evaluar si la cinética de incorporación de fosfato del fitoplancton es sensible al orden en que se suceden los incrementos del nutriente.

## Alcances de la investigación

Para alcanzar el objetivo general de la presente tesis se estudió inicialmente el estado nutricional del fitoplancton a través de procesos ecofisiológicos que ocurren en rangos nanomolares y se los cotejó con las relaciones elementales estequiométricas usualmente utilizadas en estudios de limnología para inferir cualidades nutricionales de ambientes acuáticos. Se realizaron incubaciones de muestras naturales tomadas del Lago Rodó, a las que se les adicionó pulsos de [<sup>32</sup>P] fosfato para evaluar la deficiencia por fosfato del fitoplancton y su relación con la disponibilidad de los principales nutrientes (Capítulo 2).

Posteriormente, para conocer si la comunidad posee la propiedad de alterar su cinética de incorporación de fosfato, se aplicó la misma concentración total de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato distribuida en dos patrones de pulsos diferentes en incubaciones paralelas provenientes de la misma muestra del lago. Los cambios inmediatos de la cinética de incorporación de fosfato fueron analizados y comparados con el modelo flujo-fuerza de Falkner et al. (1989, 2006). La respuesta de la comunidad fue analizada con un modelo de incorporación de fosfato por una población de cianobacterias (Plaetzer et al. 2005), modificado para simular la incorporación de fosfato de una comunidad fitoplanctónica. Esta simulación fue interpretada en el contexto de la controversia entre la noción de competencia por recursos y la paradoja del plancton (Capítulo 3).

A continuación, mediante la aplicación de pulsos de rango micromolar, se procuró determinar la flexibilidad de la respuesta cinética y su persistencia a largo plazo, y si dichas propiedades son mantenidas durante el crecimiento de la comunidad. Asimismo, se investigó si estos cambios cinéticos y energéticos afectan el crecimiento fitoplanctónico (Capítulo 4).

Finalmente, para profundizar en las respuestas comunitarias, se investigó la sensibilidad del comportamiento de incorporación de fosfato al orden en que los pulsos del nutriente se suceden en el medio y su efecto en el crecimiento. En este sentido, se procuró determinar la forma en que el fosfato es acumulado durante la alteración cinética. Para interpretar la propagación del proceso adaptativo y su relación con la acumulación de polifosfato se utilizó el modelo modificado de incorporación por una comunidad de fitoplancton (Capítulo 5).

Principales preguntas planteadas:

- 
- Capítulo 2: ¿Cómo se relaciona la deficiencia por fosfato de la comunidad de fitoplancton con la variación de la concentración de nutrientes en el Lago Rodó?
- Capítulo 3: ¿Posee la comunidad de fitoplancton la propiedad de alterar la cinética de incorporación de fosfato cuando se producen pulsos externos del nutriente?
- ¿Bajo qué condiciones y en qué escala temporal se produciría dicha respuesta cinética y qué alteraciones cinéticas implica?
- ¿Cuáles son las implicancias de este comportamiento de incorporación de fosfato en el contexto de la teoría de competencia por recursos?
- Capítulo 4: ¿Cuán persistentes en el tiempo son las nuevas propiedades de incorporación de la comunidad?
- ¿Son mantenidas estas propiedades durante el crecimiento? ¿Afectan su tasa?
- ¿Qué ventajas confiere a las poblaciones de fitoplancton la capacidad de adaptarse a las fluctuaciones de fosfato?
- Capítulo 5: ¿Es el comportamiento de incorporación de fosfato del fitoplancton sensible a un cambio en la secuencia de pulsos externos del nutriente?
- ¿Cómo se modifica la relación entre flujos y fuerzas de la incorporación de fosfato?
- ¿Cómo se acumula el fosfato intracelular durante los cambios cinéticos?
- ¿Qué implicancias tiene este comportamiento en el crecimiento de la comunidad?
- ¿Cómo se propagan las modificaciones del proceso de incorporación durante la sucesión de pulsos externos de fosfato?
-



requiere una fuente de energía. En *A. nidulans* la energía es suministrada por una ATPasa (reacción 2, Fig. 1-1), la cual está acoplada al proceso de transporte en un grado variable (Wagner & Falkner 1992). Cuanto mayor sea el acoplamiento, menor será la concentración umbral externa ( $[P_e]_A$ ). El fosfato citoplasmático ( $P_i$ ) y el ADP son convertidos a ATP por una ATPsintasa ubicada en la membrana tilacoide (reacción 3, Fig. 1-1). Este proceso utiliza la energía almacenada en el gradiente de pH ( $\Delta pH$ ) a través de la membrana tilacoide. El grupo terminal de fosfato del ATP puede contribuir tanto a la elongación de la cadena de polifosfato  $P_n$  ( $n$ : indica el número de átomos de P en la cadena; reacción 4, Fig. 1-1) o ser liberado durante la utilización de ATP por un proceso impulsado por energía (reacción 5, Fig. 1-1). El ATP también es usado para aportar fosfato a los compuestos orgánicos de la célula en crecimiento (reacción 6, Fig. 1-1).

Si se asume que la interacción entre el fosfato externo y el polifosfato interno es determinada por las reacciones consecutivas arriba descritas, puede ser postulada una proporcionalidad entre la concentración de fosfato externo y las actividades citoplasmáticas involucradas en la formación de polifosfato (Falkner et al. 1994). Si estas condiciones se cumplen, el proceso general de formación de polifosfato  $PP_n$ ,  $PP_{n+1}$  a partir del fosfato externo puede ser descrito por las siguientes reacciones:



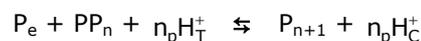
La suma de estas reacciones se corresponde con el proceso general de incorporación del fosfato externo hacia el polifosfato citoplasmático acumulado



y su constante de equilibrio será  $K'$ . Este proceso se encuentra acoplado con el transporte de protones a través de la membrana tilacoide (T) y el citoplasma (C), y puede ser formulado como



Entonces, si  $n_p$  es el número promedio de protones transportados por fosfato incorporado, la reacción de formación de polifosfato puede ser escrita como:



La energía libre  $-\Delta G = RT \ln(KS/P)$  (en la que S y P corresponden a la concentración de sustrato y producto, respectivamente) de la reacción puede ser adaptada al caso presente como:

$$-\Delta G = 2.3 RT (\log(K'[P_e]) + n_p \Delta pH_T)$$

La energía igual a  $2.3 RT \log(K'[P_e])$  es aquella que debe ser consumida para convertir fosfato externo en polifosfatos.  $2.3 RT n_p \Delta pH_T$  es la fuerza impulsora de la reacción, donde  $\Delta pH_T$  es el gradiente de pH a través de la membrana tilacoide. En el equilibrio termodinámico la afinidad general es igual a cero, de modo que la incorporación cesa a una concentración de equilibrio  $[P_e]_A$ . Llamaremos concentración umbral a aquella que contempla la energía consumida para la formación de polifosfato y la fuerza impulsora cuando son iguales a:

$$\log[P_e]_A = -n_p \Delta pH_T - \log K' \quad (1)$$

donde  $[P_e]_A$  es la concentración umbral. Si  $n_p$  y  $\Delta pH_T$  aumentan, el valor de  $[P_e]_A$  disminuye. Cerca del equilibrio, el flujo de fosfato ( $J_p$ ) se asume proporcional a la afinidad de la reacción general. Éste seguirá la función de Falkner et al. (1989):

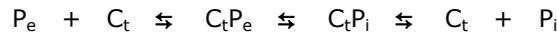
$$J_p = L_p(\log(K'[P_e]) + n_p \Delta pH_T) \quad (2)$$

$L_p$  contiene el factor constante  $2.3 RT$  y es el coeficiente de conductividad del transportador de fosfato. Combinando las ecuaciones (1) y (2) se obtiene una relación simple de flujo-fuerza:

$$J_p = L_p (\log[P_e] - \log[P_e]_A) \quad (3)$$

Esta función fue originalmente derivada por Thellier (1970) en su forma general. Posteriormente fue demostrado por Falkner et al. (1993) que para los rangos de concentración limitantes cercanos al equilibrio, la dependencia entre la tasa neta de incorporación ( $J_p$ ) y la concentración externa  $[P_e]$  obedece dicha función. De esta manera, la relación entre  $J_p$  y  $\log[P_e]$  debería ser lineal, por lo que la pendiente será  $L_p$  y la intersección corresponderá al  $\log[P_e]_A$  o logaritmo del valor umbral. Esta gráfica semilogarítmica se ha dado en llamar "Gráfico Thellier".

La explicación más simple para la existencia del valor umbral es que el transporte de fosfato está catalizado por un transportador hasta que la concentración externa de fosfato llega a un valor de equilibrio  $[P_e]_A$  o valor umbral (Falkner et al. 1995). En dicho caso, el proceso de absorción puede representarse por el siguiente modelo simplificado (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995):



Este proceso se encuentra compuesto por reacciones reversibles y podría permitir algún tipo de control por la formación del producto (Rhee 1973). De esta forma el fosfato externo  $P_e$  reacciona con un transportador libre  $C_t$ , para formar un complejo fosfato-transportador que libera fosfato en el lado interno de la membrana (Droop 1974, Falkner et al. 1995). En condiciones donde  $d[C_t P]/dt = 0$ , la ecuación de velocidad puede ser descrita según Segel (1975) como:

$$J_p = \frac{(V_e[P_e]/K_e) - (V_i[P_i]/K_i)}{1 + [P_e]/K_e + [P_i]/K_i} \quad (4)$$

donde  $V_e$  y  $V_i$  representan las velocidades máximas,  $K_e$  y  $K_i$  las constantes de Michaelis de las reacciones hacia delante (transporte al interior celular) y las reversas respectivamente. La concentración de cationes cotransportados permite la acumulación de fosfato en contra de un gradiente de concentración, la cual se considera en exceso. La ecuación (4) puede ser simplificada usando la relación de Haldane:

$$[P_i]/[P_e]_A = V_e K_i / V_i K_e = K$$

resultando en la expresión:

$$J_p = \frac{([P_e] - [P_e]_A)V_e}{[P_e] + K_e + (V_e/V_i)[P_e]_A} \quad (5)$$

la que contiene un parámetro interno  $V_i$ , mientras que los restantes pueden ser determinados experimentalmente. Esta ecuación describe la dependencia de la tasa de incorporación en la concentración como una función del valor umbral (Falkner et al. 1995) y asume la concentración de

$P_i$  constante, debido a que el transporte es más lento que la fotosforilación subsiguiente (Gimmler 1976). Si se aplica este modelo a un transportador simétrico en sus velocidades máximas ( $V_e = V_i$ ), la ecuación (5) se simplifica, como fue propuesto por Falkner et al. (1995) y Wagner et al. (1995):

$$J_p = \frac{([P_e] - [P_e]_A)V_e}{[P_e] + K_e + [P_e]_A} \quad (6)$$

Esta expresión revela las condiciones donde la extrapolación lineal de  $J_p$  versus  $\log[P_e]$  puede ser usada para determinar la concentración de equilibrio  $[P_e]_A$ . Solamente para el caso no real de  $[P_e]_A = 0$ , esta función resulta en la ecuación de Michaelis-Menten.

La Figura 1-2 muestra la dependencia de la tasa de incorporación en la concentración externa, calculada con la ecuación (6) a partir de diferentes valores de  $K_e$ ,  $[P_e]_A$  y  $V_e$ , y graficada *versus* el logaritmo de la concentración externa. Estos ejemplos teóricos simulan la disminución observada en la actividad del sistema de incorporación, luego de ocurrida la adaptación de la cinética a elevadas concentraciones externas.

El primer ejemplo (curva A) representa la situación previa a la adaptación, calculada con altos valores de  $V_e$  y  $K_e$ , este último excediendo en 200 veces el valor de equilibrio  $[P_e]_A$ . Este caso representa la situación donde  $[P_e] \ll K_e$ , reduciéndose la ecuación (6) a la función de cinética de primer orden:

$$J_p = k([P_e] - [P_e]_A)$$

donde  $k$  representa la constante de velocidad equivalente a  $V_e/K_e$ .

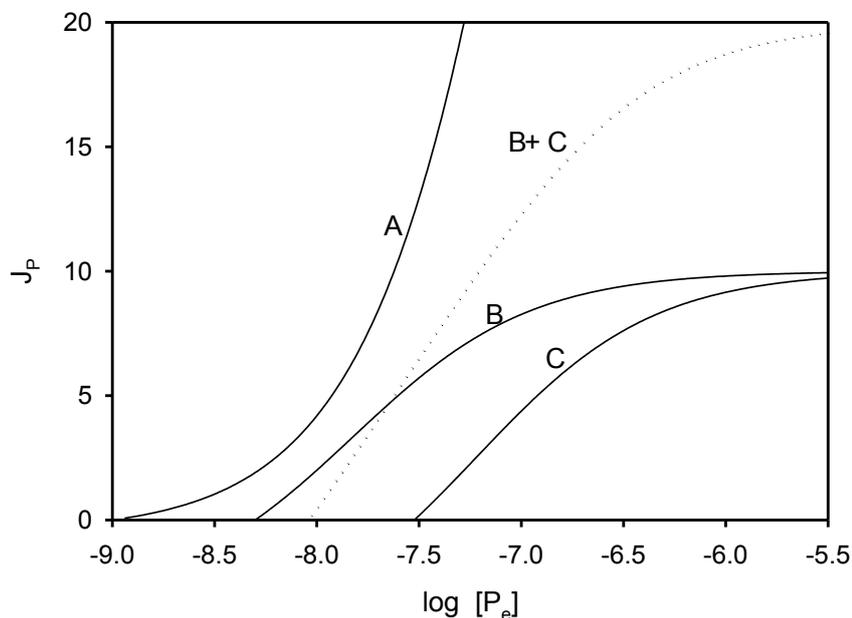


Fig. 1-2. Modelos de sistemas de incorporación de fosfato de *Anacystis nidulans*. Gráfica Thellier de las tasas de incorporación en función del logaritmo de la concentración externa de fosfato. Los cálculos fueron realizados con la ecuación (6) utilizando los siguientes valores: A:  $[P_e]_A = 1$  nM,  $V_e = 100$ ,  $K_e = 200$  nM; B:  $[P_e]_A = 5$  nM,  $V_e = 10$ ,  $K_e = 10$  nM; +C:  $[P_e]_A = 30$  nM,  $V_e = 10$ ,  $K_e = 30$  nM. Los valores de flujo neto  $J_p$  y  $V_e$  están expresados en unidades arbitrarias. El logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (1 M).

En los casos B y C, los valores de  $K_e$  y  $[P_e]_A$  fueron del mismo orden de magnitud e iguales respectivamente. De esta forma se asumió que los sistemas de incorporación operaran

eficientemente cercano al valor de equilibrio, resultando en una relación lineal que se extiende desde la concentración logarítmica de equilibrio. Esta relación es pseudolineal en un sentido estricto, observándose que presenta concavidades positivas y negativas aproximadas a la linealidad.

Este rango de linealidad se extiende sobre un orden de magnitud en la concentración externa de fosfato. Si los sistemas de incorporación B y C operaran simultáneamente, la suma de esos procesos resulta en una extensión de la linealidad dentro de un rango de concentración más extenso aún (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995). Como la concentración externa en la cual la tasa de incorporación es igual a cero (curva B+C) es mayor que la usada para el cálculo de la curva B, Wagner et al. (1995) proponen que el aumento observado en el valor umbral durante las adaptaciones cinéticas se debe a que los sistemas de incorporación más acoplados deben bombear en contra del reflujo de los menos acoplados, por ejemplo, debido a un menor grado de acoplamiento a una ATPasa (Wagner & Falkner 1992).

## Cambios en la deficiencia por fosfato de la comunidad de fitoplancton en un lago hipereutrófico

---

### Introducción

Los requerimientos nutricionales que regulan el crecimiento fitoplanctónico constituyen un aspecto fundamental en el estudio de la eutrofización de los ecosistemas acuáticos (Hutchinson 1975, Margalef 1978, Reynolds 1984). Generalmente, estos requerimientos están relacionados con la composición elemental del fitoplancton, la cual es similar a la proporción de nutrientes encontrada en los ecosistemas acuáticos (Redfield et al. 1963). Basado en esta asociación, Redfield et al. (1963) propusieron que la relación atómica óptima de fosfato ( $\text{PO}_4$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3$ ) para el crecimiento algal debe ser 16:1, la cual es controlada en los ecosistemas por el propio metabolismo del fitoplancton. Sin embargo, existen desviaciones sistemáticas de la relación de Redfield y su rol en los ciclos biogeoquímicos globales es pobremente comprendido (Christian 2005). Estas desviaciones pueden deberse a que las estructuras celulares de las especies fitoplanctónicas tienen su propia y única composición estequiométrica (Falkowski 2000, Geider & La Roche 2002). Sin embargo, las mayores variaciones se deben a las habilidades diferenciales de las especies que componen el fitoplancton de almacenar nutrientes en acúmulos intracelulares (Klausmeier et al. 2004).

En general, el crecimiento algal en lagos se encuentra limitado por las bajas concentraciones de  $\text{PO}_4$  disponibles (Schindler 1977), y en consecuencia, los sistemas celulares de incorporación del nutriente se activan y el  $\text{PO}_4$  disponible es rápidamente utilizado por los organismos de la comunidad (Einsele 1941, Rigler 1956). Como resultado, la concentración de  $\text{PO}_4$  externo fluctúa alrededor de un nivel estacionario, llamado valor umbral, en el cual la incorporación del nutriente cesa por razones energéticas (Falkner et al. 1989). La incorporación y el crecimiento posterior es posible sólo si la concentración externa de  $\text{PO}_4$  excede este valor umbral, el cual se encuentra usualmente en rangos nanomolares (Rigler 1956, Falkner & Falkner 1989, Aubriot et al. 2000), por debajo de los límites de detección del método convencional de molibdato. Probablemente es por esta razón que existen escasas investigaciones sobre la regulación de la incorporación neta de  $\text{PO}_4$  por comunidades naturales (Falkner et al. 1984, Falkner & Falkner 1989, Istvánovics et al. 1994,

Istvánovics & Herodek 1995), particularmente acerca del valor umbral (Aubriot et al. 2000). A través del premarcado de comunidades naturales con [ $^{32}\text{P}$ ], fue posible relacionar los cambios en la cinética de incorporación de  $\text{PO}_4$  con el suministro de nutrientes en el Lago Rodó (Aubriot et al. 2000). Posteriormente a dicho estudio, el aporte de nutrientes al Lago Rodó disminuyó considerablemente (Scasso et al. 2001), modificando la relación entre el N inorgánico disuelto (NID) y  $\text{PO}_4$ . El presente trabajo investigó los cambios en la deficiencia por  $\text{PO}_4$  del fitoplancton del Lago Rodó en condiciones nutricionales variables y se relacionaron con los cambios en la concentración de nutrientes. De esta forma, se procuró comparar la relación entre el estado nutricional del fitoplancton, a través de procesos ecofisiológicos que ocurren a nanoescala, con las relaciones elementales de nutrientes usualmente utilizadas en estudios de limnología para inferir cualidades nutricionales de los ambientes acuáticos.

## Materiales y métodos

### Área de estudio

Las investigaciones sobre la deficiencia por  $\text{PO}_4$  de comunidades naturales de fitoplancton y la dinámica de nutrientes se realizaron en los siguientes períodos: 1: enero a mayo de 2003; 2: diciembre 2003 a mayo 2004; 3: enero a junio 2006 y 4: diciembre 2006 a junio 2007. Las muestras fueron tomadas del Lago Rodó, Parque Rodó, Montevideo (Fig. 2-1).

El Lago Rodó es hipereutrófico y somero, con una profundidad media de 1.5 m (máx. 2 m, área: 1.3 ha; Fig. 2-1). El aporte artificial de agua al lago durante el período de estudio se realizó con un sistema de recirculación de agua subterránea a través de piscinas con hidrófilas, con el objetivo de reducir la carga de nutrientes inorgánicos (Scasso et al. 2001, Rodríguez-Gallego et al. 2004). Durante el período de estudio, el aporte de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  por el sistema de recirculación fue tres veces inferior al aportado directamente por el agua subterránea (Aubriot 2000). Este sistema dejó de funcionar definitivamente en enero de 2006. Existen otras entradas difusas de nutrientes al lago aportados por las napas freáticas y la descomposición de las hojas de los árboles caducos (Scasso et al. 2001). Los altos valores de nutrientes en el agua vertida resultan en grandes cantidades de biomasa fitoplanctónica en el lago, característica que amplía las posibilidades de experimentación con la comunidad.

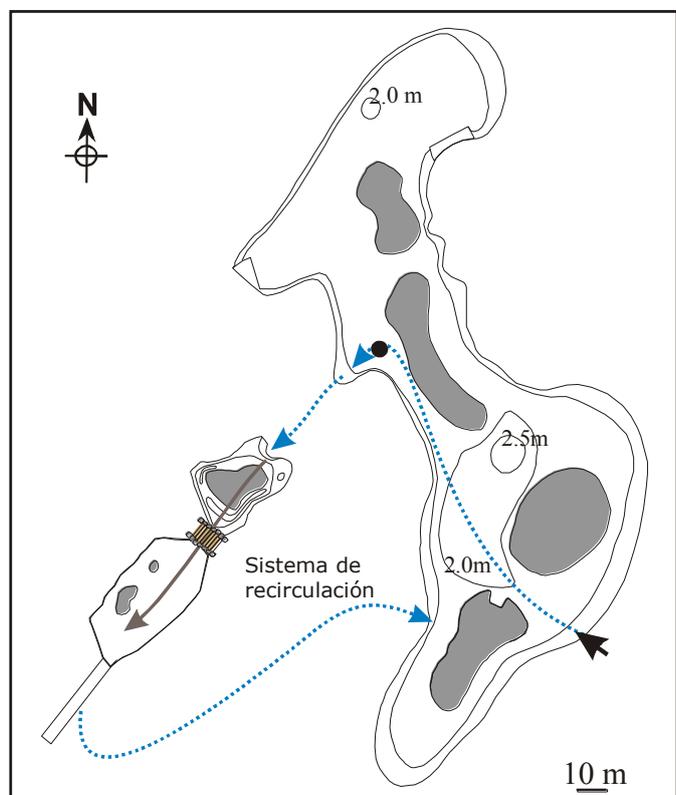


Fig. 2-1. Mapa del Lago Rodó mostrando la estación de muestreo (círculo negro), el sistema de recirculación de agua subterránea (línea punteada) y las isolíneas de profundidad (m).

### Obtención y procesamiento de las muestras

Una muestra de agua de 5 a 10 l fue obtenida aproximadamente cada 15 días con una botella oscura, a una profundidad entre 10 y 30 cm en el sitio de muestreo que indica la Figura 2-1. Este sitio fue seleccionado por mantener un flujo constante de salida agua del sistema, debido a su proximidad con la esclusa de rebase de agua. Durante el transporte de la muestra al laboratorio (ca. 30 min), ésta se protegió de cambios bruscos de temperatura y luz. Para la determinación de nutrientes totales y disueltos, tres submuestras de 100 ml se filtraron a través de filtros Whatman GF/F (25 mm diámetro). Las submuestras filtradas se almacenaron inmediatamente a 4 °C para su posterior análisis. Se separó una submuestra para la identificación taxonómica y cuantificación de fitoplancton, se fijó con solución lugol inmediatamente de finalizado el muestreo y se conservó en oscuridad hasta su procesamiento en laboratorio. El resto de la muestra total fue congelada inmediatamente (-20 °C) al igual que los filtros conteniendo el material particulado para la posterior extracción de clorofila *a*.

### Mediciones in situ

En los muestreos se realizaron mediciones in situ a la profundidad donde se obtuvieron las muestras de fitoplancton (10 – 30 cm). La columna de agua fue caracterizada por mediciones de temperatura, oxígeno disuelto (OD) y pH, con sensores Horiba® OM-14 y Horiba® D-24, respectivamente. La radiación fotosintéticamente activa (*photosynthetically active radiation*, PAR) se midió cada 10 cm con un sensor 4π Licor® LI-250.

### Determinaciones espectrofotométricas

*Análisis químico de muestras de agua.* El análisis químico de nutrientes se realizó en tres submuestras tomadas de la muestra original de agua de lago. Para el análisis químico se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU600, USA y según Strickland & Parsons (1972). El PO<sub>4</sub> fue determinado con un trayecto óptico de 5 cm (límite analítico >0.3 μmol l<sup>-1</sup>). La concentración de fósforo y nitrógeno total (P<sub>T</sub> y N<sub>T</sub>, respectivamente) fueron determinadas de acuerdo a Valderrama (1981).

*Determinación de clorofila a.* Se tomaron tres alícuotas de aproximadamente 100 ml de cada muestra de lago para la determinación de clorofila *a* (Clo *a*) de la comunidad fitoplanctónica, las que se filtraron a través de un filtro GF/F Whatman (25 mm diámetro). La Clo *a* fue extraída con etanol caliente y medida según Nusch (1980). Los resultados de Clo *a* se expresan como el promedio y desvío estándar de las tres alícuotas.

### Determinación de la incorporación neta de fosfato por fitoplancton

Se tomaron submuestras de 50 ml de la misma muestra original de agua del Lago Rodó usada para el análisis químico y biológico. Las submuestras fueron filtradas a través de una red de 80 μm de malla para remover el zooplancton de gran tamaño, no observándose la retención de fitoplancton por este procedimiento. Posteriormente, las submuestras fueron iluminadas (150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, Licor® LI-250) y agitadas suavemente con un agitador magnético 30 min antes de iniciar la adición de [<sup>32</sup>P] PO<sub>4</sub> y durante el transcurso del experimento. Durante este período, las submuestras fueron mantenidas a una temperatura similar a las condiciones del sitio de muestreo (20 – 26 °C).

Se aplicaron pulsos de PO<sub>4</sub> mediante la adición de una solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de concentración conocida y marcada con [<sup>32</sup>P] (Nex-054 PerkinElmer). Dicha adición resulta en un incremento del PO<sub>4</sub> externo [P<sub>e</sub>] en el rango micromolar (0.5 – 5 μM [<sup>32</sup>P] PO<sub>4</sub>) al tiempo t = 0 o al indicado en la leyenda de las figuras. Las concentraciones iniciales de [<sup>32</sup>P<sub>e</sub>] correspondieron a un valor superior al 10% del P<sub>T</sub> de la muestra luego del primer pulso. A dichas concentraciones iniciales, la tasa del flujo de [<sup>32</sup>P] hacia el interior celular es varios órdenes de magnitud mayor que la tasa de reflujos del PO<sub>4</sub> endógeno. Por lo tanto, las velocidades iniciales observadas representaron prácticamente incorporación neta, descartándose los efectos del intercambio isotópico (Aubriot et al. 2000). De esta forma fue posible caracterizar el comportamiento neto de incorporación. La reacción de incorporación se inició por la adición de una concentración arbitraria de PO<sub>4</sub> [<sup>32</sup>P]. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 0.8 – 1.5 ml a los siguientes tiempos: 0.5, 5, 10, 15, 25, 35, 55 min (a partir del último tiempo, se tomaron alícuotas cada ca. 20 min hasta determinar al menos 3 valores mínimos y estables). Las alícuotas fueron filtradas a través de un filtro Millipore HA (0.45 μm de diámetro de poro) dispuesto sobre un portafiltro Sartorius (13 mm de diámetro). Ocasionalmente se filtraron alícuotas en paralelo a través de filtros de policarbonato de 0.2 μm de diámetro de poro, sin observarse diferencias significativas con la [<sup>32</sup>P<sub>e</sub>] PO<sub>4</sub> del filtrado obtenida con los filtros HA de 0.45 μm. La radiactividad del filtrado fue determinada en agua vía Cerenkov, usando un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000, USA).

#### Análisis cualitativo y cuantitativo de fitoplancton

Los principales taxa se determinaron mediante análisis en microscopio óptico Olympus a 400 y 1000 aumentos y se clasificaron en base a Wehr & Sheath (2003). El conteo de células se realizó usando cámaras Sedwick-Rafter de 1 ml mediante la selección de campos aleatorios de acuerdo con Guillard (1978). El biovolumen de cada taxa (B<sub>T</sub>) se expresó como el porcentaje del biovolumen total y se calculó en base a figuras geométricas aproximadas según Hillebrand et al. (1999). La biomasa fitoplanctónica se estimó multiplicando el biovolumen de cada taxa por su abundancia (organismos/ml).

#### Consideraciones teóricas y análisis de datos

La dependencia de la incorporación neta en la concentración externa de PO<sub>4</sub> fue evaluada con la función flujo-fuerza de Falkner et al. (1989). Esta función postula una relación entre la tasa de incorporación y la fuerza impulsora de ese proceso. Esta dependencia proporcional es expresada como una relación de flujo-fuerza:

$$d[P_e]/dt = - L_p (\log[P_e] - \log[P_e]_A)$$

en la cual L<sub>p</sub> es un coeficiente de conductividad que refleja la actividad del transportador de PO<sub>4</sub> y [P<sub>e</sub>]<sub>A</sub> el valor umbral en donde la incorporación neta cesa (Falkner et al. 1995). Esta función fue desarrollada para el estudio del comportamiento de incorporación de PO<sub>4</sub> de la cianobacteria *Anacystis nidulans* (Falkner et al. 1989), y demostró ser una herramienta apropiada para interpretar las variaciones en la incorporación neta de PO<sub>4</sub> de comunidades naturales de fitoplancton (Aubriot et al. 2000). La función flujo-fuerza fue ajustada a los datos experimentales a través de la programación en el lenguaje de MLAB (Mathematical Modelling System, Civilized Software, Inc.). La confianza de la función flujo-fuerza aplicada a comunidades naturales fue confirmada mediante los coeficientes de determinación del ajuste ( $r^2 \geq 0.990$ ). La similitud de la

cinética de incorporación en submuestras de la misma comunidad de fitoplancton, se evaluó aplicando el mismo pretratamiento y siguiendo el transcurso de la remoción de  $\text{PO}_4$  en incubaciones paralelas e independientes. Los dos trascursos de remoción de  $\text{PO}_4$  se ajustaron de forma independiente y se obtuvieron coeficientes de determinación del ajuste de la función flujo-fuerza iguales al  $r^2$  resultante del ajuste de los mismos datos en un único análisis del conjunto ( $r^2 > 0.995$ ,  $n = 16$ ).

La determinación de las diferencias significativas entre períodos con y sin aporte de agua por recirculación, se realizó con el test no paramétrico Mann-Whitney (MW), la diferencias entre períodos anuales con ANOVA Kruskal-Wallis (KW) y la asociación estadística entre variables se realizó mediante el test de correlación de rangos de Spearman (RS), usando Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

## Resultados y discusión

### Comunidad fitoplanctónica

La mayoría de las especies encontradas en el Lago Rodó son típicas de ambientes ricos en nutrientes (Reynolds 1997). La escasa profundidad, la mezcla continua, la turbidez y las altas concentraciones de nutrientes en este lago favorecen la dominancia de organismos con estrategias

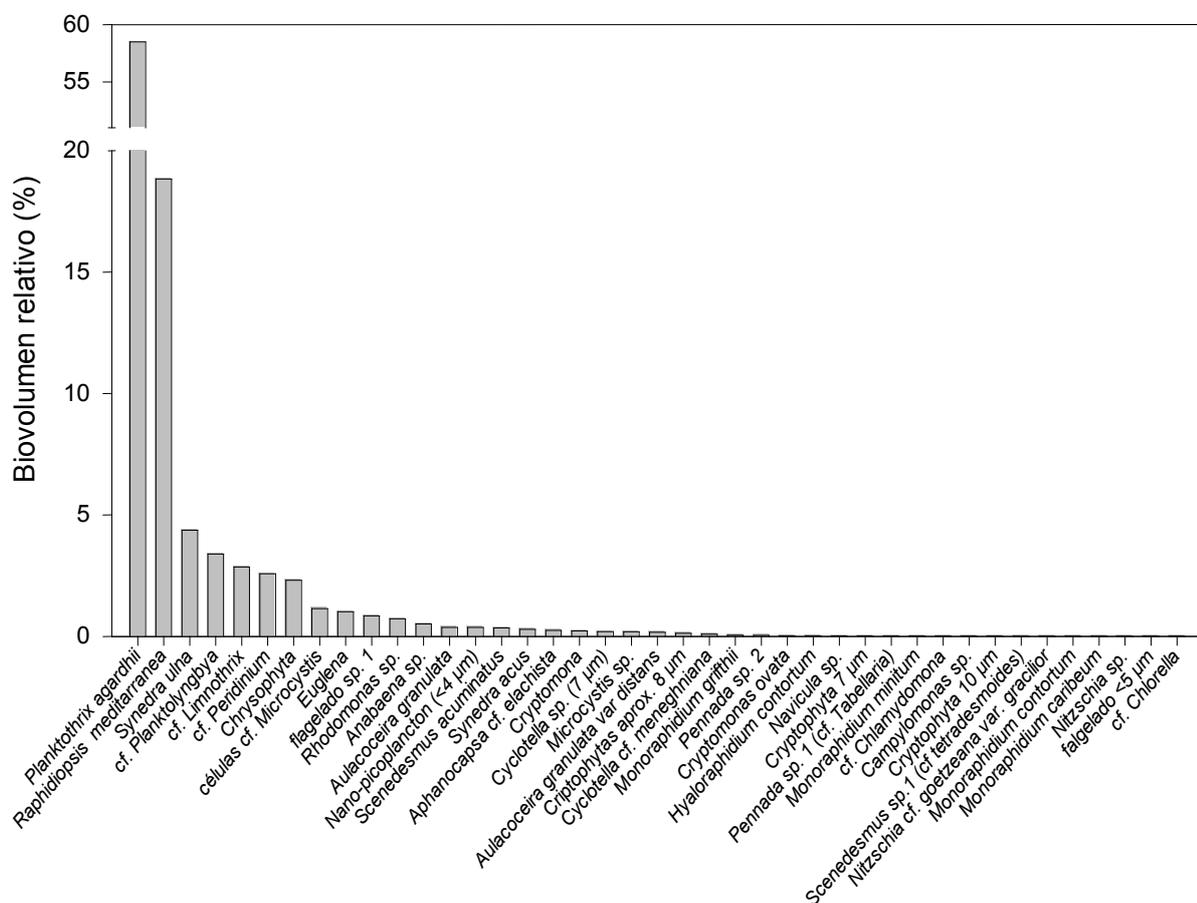


Figura 2-2. Distribución del biovolumen relativo promedio de los taxa de fitoplancton identificados para todos los períodos de estudio en el Lago Rodó.

de vida R (ruderales), pertenecientes a los grupos funcionales S (*Planktothrix agardhii*, Cyanobacteria) y D (*Synedra ulna*, diatomea) (Kruk et al. 2002, Reynolds 2006). Las especies dominantes fueron las cianobacterias filamentosas *P. agardhii* (contribución al biovolumen total: 58.5 %) y *Raphidiopsis mediterranea* (contribución al biovolumen total: 18.8 %). *P. agardhii* (grupo S) ha sido reportada anteriormente como especie dominante en este sistema (Kruk et al. 2002) (Fig. 2-2). En este estudio, el  $B_T$  de *P. agardhii* fue significativamente mayor durante 2003 y 2006 (KW:  $p < 0.001$ ), mientras que el  $B_T$  de *R. mediterranea* lo fue durante la mayor fracción del período estudiado en 2004 (KW:  $p = 0.001$ ) (Fig. 2-3A). Esta mayor biomasa de dichas cianobacterias estuvo alternada por la diatomea *Synedra ulna*, que alcanzó 4.4% del biovolumen total durante los períodos estudiados (Fig. 2-2). Los restantes 39 taxa (algas verdes, diatomeas, criptofitas, dinoflagelados y otros) representaron menos del 5 % del biovolumen total (Fig. 2-2). Las diatomeas dominaron al final del período correspondiente a 2007 (KW:  $p < 0.001$ ),

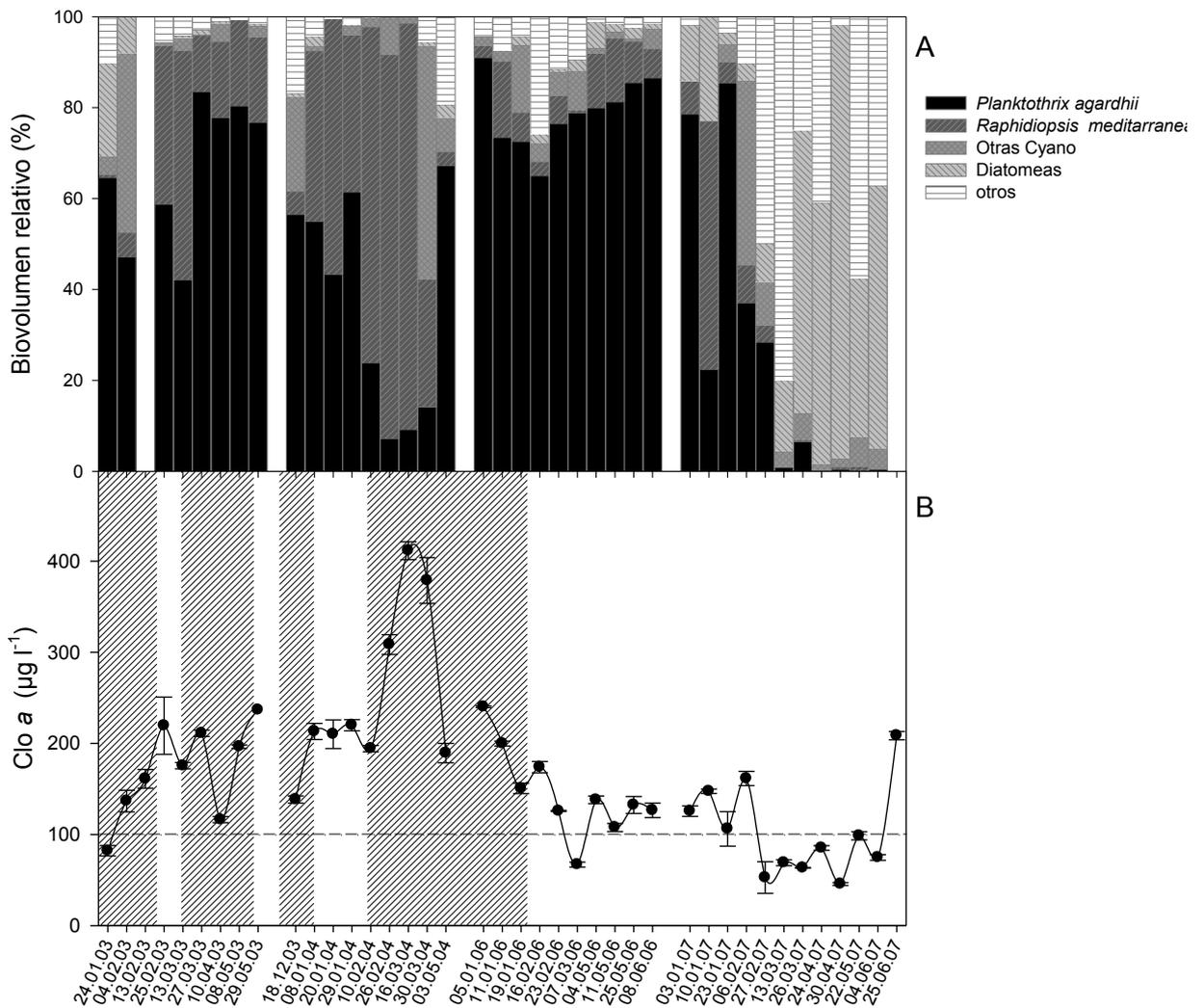


Figura 2-3. Cambios temporales de la composición taxonómica y la biomasa de la comunidad de fitoplancton del Lago Rodó durante el período de estudio. A: Biovolumen relativo de los principales taxa de cianobacterias (*Planktothrix agardhii*, *Raphidiopsis mediterranea* y otras cianobacterias), diatomeas y otros grupos (clorofitas, criptofitas y dinoflagelados). B: Concentración de clorofila a (Clo a). La barra de error representa el desvío estándar y las áreas sombreadas muestran los períodos de aporte de agua al lago por recirculación. La línea punteada horizontal marca el límite inferior de la clasificación de lagos hipereutróficos según la concentración de Clo a (Wetzel 2001).

conjuntamente con flagelados (*Chrysophyta*) y clorofitas (*Monoraphidium sp.*), los que fueron agrupados en la categoría "otros" (Fig. 2-3A).

La concentración de Clo *a* promedio en el Lago Rodó fue  $162.6 \pm 80.9 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$  (Fig. 2-3B). Estos valores fueron significativamente mayores en los períodos de aporte artificial de agua (KW:  $p < 0.05$ ), alcanzando un máximo de  $411.6 \pm 9.8 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ , mientras que los mínimos fueron registrados en 2007 ( $45.7 \pm 1.5 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ ) (Fig. 2-3B). Los valores máximos de Clo *a* se asociaron con la dominancia de *R. mediterranea*, mientras que los mínimos al final del período se relacionaron con la disminución de la dominancia por las cianobacterias (*P. agardhii*) y el incremento relativo de las diatomeas con otros grupos. El lago se mantuvo en estado hipereutrófico en 78% del período estudiado según la clasificación trófica de Wetzel (2001).

#### Fluctuaciones temporales de las condiciones nutricionales

El aporte de agua al lago por recirculación se produjo fundamentalmente durante los dos primeros períodos de estudio (2003 y 2004), aunque se produjeron al menos tres interrupciones (Fig. 2-4). Durante los siguientes dos períodos estudiados, el sistema no recibió aportes de agua por bombeo. La concentración de OD sufrió importantes variaciones, con valores máximos durante febrero y marzo de 2004 (OD  $> 20 \text{ mg l}^{-1}$ ) y mínimos durante enero del mismo año (OD  $< 1 \text{ mg l}^{-1}$ ). Los mayores valores de OD correspondieron a los períodos de bombeo de agua y los mínimos se produjeron sobre el sedimento o en toda la columna de agua, luego de la interrupción del aporte (OD  $< 5 \text{ mg l}^{-1}$ ) (Fig. 2-4).

La Figura 2-5 muestra la variación de la concentración de los principales nutrientes disueltos y totales durante el período estudiado. En general, el aporte de agua por recirculación modificó la relación de nutrientes en el lago. El período de aporte (2003 - 2006) se caracterizó por valores de  $\text{PO}_4$  por debajo de los límites de detección del método analítico, observándose un incremento significativo durante 2007 (KW:  $p < 0.0001$ ). De forma similar, la concentración de  $\text{NH}_4$  tuvo un incremento progresivo durante los últimos dos años (KW:  $p < 0.05$ ), aunque con importantes variaciones (rango  $< 0.7 - 25 \mu\text{M NH}_4$ ). Las formas oxidadas de N inorgánico disuelto ( $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ )

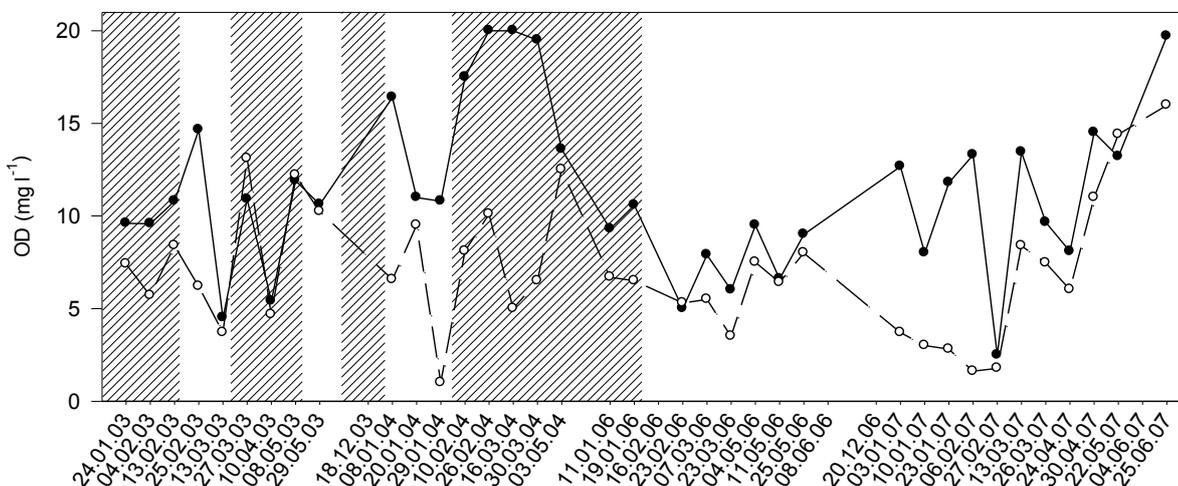


Figura 2-4. Variación de la concentración de oxígeno disuelto (OD) en la superficie (círculos negros) y sobre el sedimento (círculos blancos) de la columna de agua del Lago Rodó durante el período de estudio. Las áreas sombreadas representan los períodos de aporte de agua al lago por recirculación.

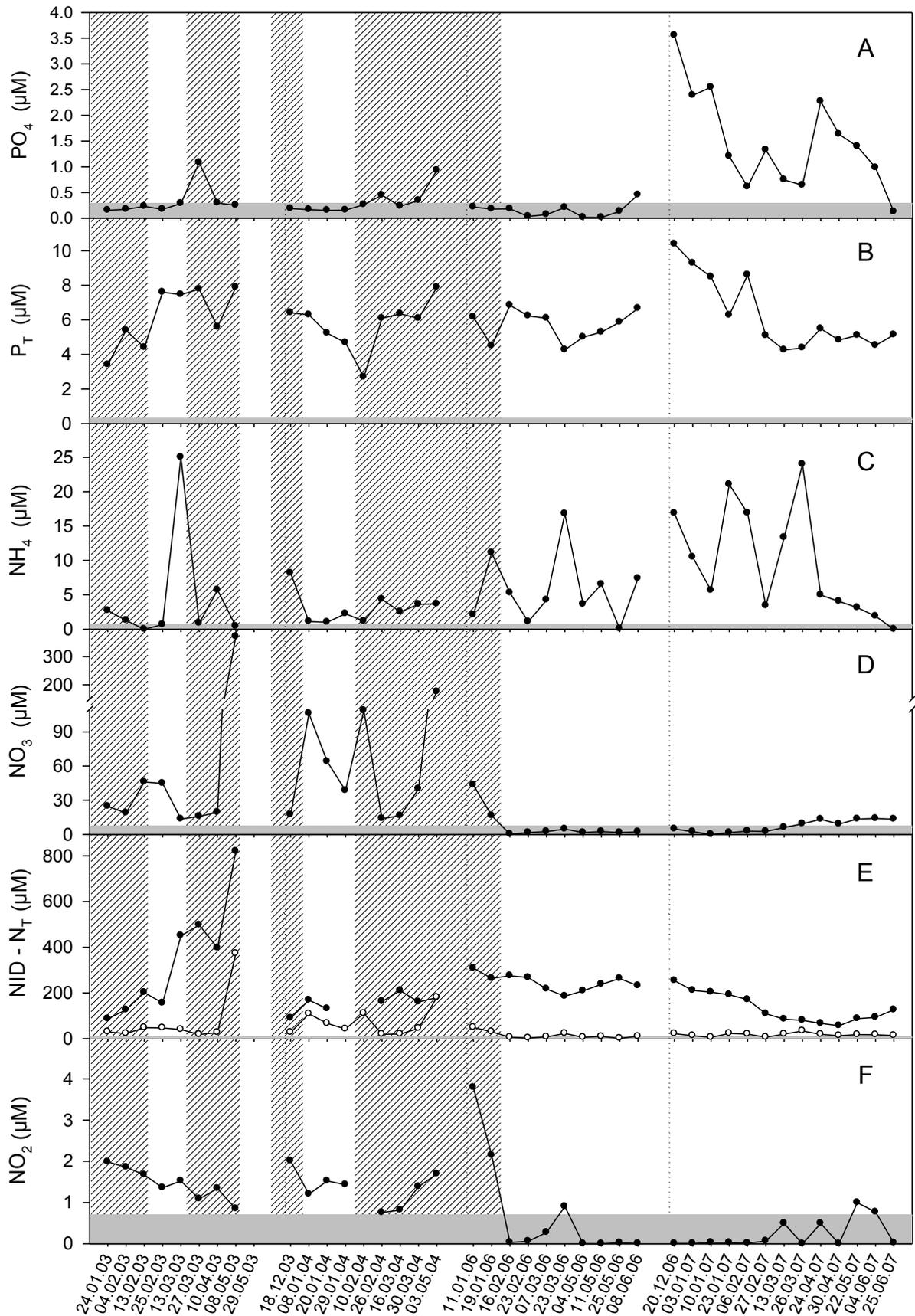


Figura 2-5. Cambios temporales de la concentración los principales nutrientes en el agua superficial del Lago Rodó. A: fosfato (PO<sub>4</sub>), B: fósforo total (P<sub>T</sub>), C: amonio (NH<sub>4</sub>), D: nitrato (NO<sub>3</sub>), E: nitrógeno inorgánico disuelto (NID, círculos blancos) y nitrógeno total (N<sub>T</sub>, círculos negros), F: nitrito (NO<sub>2</sub>). Las áreas sombreadas representan los períodos de aporte de agua al lago por recirculación y las áreas grises horizontales, los límites de determinación de los respectivos nutrientes.

aumentaron significativamente con el aporte de agua por recirculación (KW:  $p < 0.0001$ ), presentando posteriormente una rápida disminución cuando el sistema dejó de funcionar. La misma tendencia se observa cuando se considera a todas las formas inorgánicas de N (NID, KW:  $p = 0.002$ ). El  $P_T$  no se asoció con el régimen hidrológico del sistema, con valores máximos de  $10.2 \mu\text{M}$  y mínimos de  $2.7 \mu\text{M}$  (promedio =  $6.0 \pm 1.6 \mu\text{M } P_T$ ). El  $N_T$  sufrió un incremento progresivo de hasta un orden de magnitud durante el primer período, y una disminución posterior luego de un año de cese del aporte artificial de agua (KW:  $p = 0.002$ ).

A pesar de que no se observaron condiciones anóxicas cercanas al sedimento, es esperable que estas condiciones se hayan producido en la noche o durante períodos de baja intensidad lumínica, en combinación con los períodos de mayor tiempo de retención. Estas condiciones favorecen los procesos de desnitrificación y, debido a las altas y fluctuantes concentraciones de  $\text{NH}_4$ , es presumible que la pérdida de N del sistema se produzca a través de la reducción del  $\text{NO}_3$  a  $\text{NH}_4$ , y su posterior oxidación anaeróbica usando  $\text{NO}_2$  como oxidante (*anammox*) (Richards 1965, Mulder et al. 1995). Este proceso puede duplicar las tasas de pérdida de N en agua suboxidada y en contacto con sedimentos ricos en  $\text{NH}_4$  (Arrigo 2005).

Se produjo una variabilidad importante en la estequiometría de N:P en la columna de agua (Fig. 2-6A). Además de los procesos de desnitrificación, las condiciones reductoras en el sedimento pudieron favorecer la liberación de  $\text{PO}_4$ , potenciando así estos cambios. La relación N:P fue extremadamente alta para las formas disueltas durante el aporte de agua por recirculación (670 NID: $\text{PO}_4$ ) y con valores bajos durante los períodos sin dicho aporte (1 NID: $\text{PO}_4$ ;  $p = 0.01$  MW). Sin embargo, la relación promedio entre las formas totales de N y P se mantuvo cercana al promedio estequiométrico esperado (16:1) para organismos planctónicos ( $14.5 \pm 6.8 N_T:P_T$ ). A partir de la baja relación NID: $\text{PO}_4$  y a las altas concentraciones de  $\text{PO}_4$  encontradas en 2007, es esperable que se produzca una pérdida de la deficiencia por  $\text{PO}_4$  (Fig. 2-6A). Sin embargo, un modelo de limitación del crecimiento por nutrientes (Klausmeier et al. 2004) mostró que puede existir un alta variación de esta relación (entre 8.2 y 45) cuando se pretende conocer los valores óptimos de N:P para el crecimiento del fitoplancton.

La *Clo a* se correlacionó negativamente con la concentración de  $\text{PO}_4$  y  $\text{NH}_4$ , y positivamente con  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $P_T$  y  $N_T$  (RS = 0.49, 0.41, 0.39 y 0.42, respectivamente;  $p < 0.05$ ), así como con la relación NID: $\text{PO}_4$  (RS = 0.50,  $p = 0.001$ ). Estas asociaciones reflejarían un fuerte condicionamiento del crecimiento del fitoplancton por la disponibilidad de N para todo el período. Sin embargo, las bajas concentraciones de  $\text{PO}_4$  en relación con el  $P_T$ , evidencian un alto requerimiento del nutriente, exceptuando el último período.

#### Deficiencia por fosfato del fitoplancton

Los valores umbrales de  $\text{PO}_4$  del fitoplancton en los tres primeros períodos fueron significativamente menores que durante 2007 ( $p < 0.05$  KW) y se correlacionaron negativamente con la relación NID: $\text{PO}_4$  (RS = -0.35,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2-6B). Debido a que los valores umbrales bajos se corresponden con una mayor deficiencia por  $\text{PO}_4$  (Aubriot et al. 2000), la relación negativa de los umbrales con NID: $\text{PO}_4$  sugiere que un incremento en la disponibilidad de NID puede condicionar una mayor deficiencia por  $\text{PO}_4$ . En general, los incrementos de NID: $\text{PO}_4$  están relacionados a una mayor concentración de NID debido a que el  $\text{PO}_4$  no alcanza valores bajos debido al límite analítico. La explicación de la existencia de una mayor biomasa algal en el Lago Rodó, con una alta relación

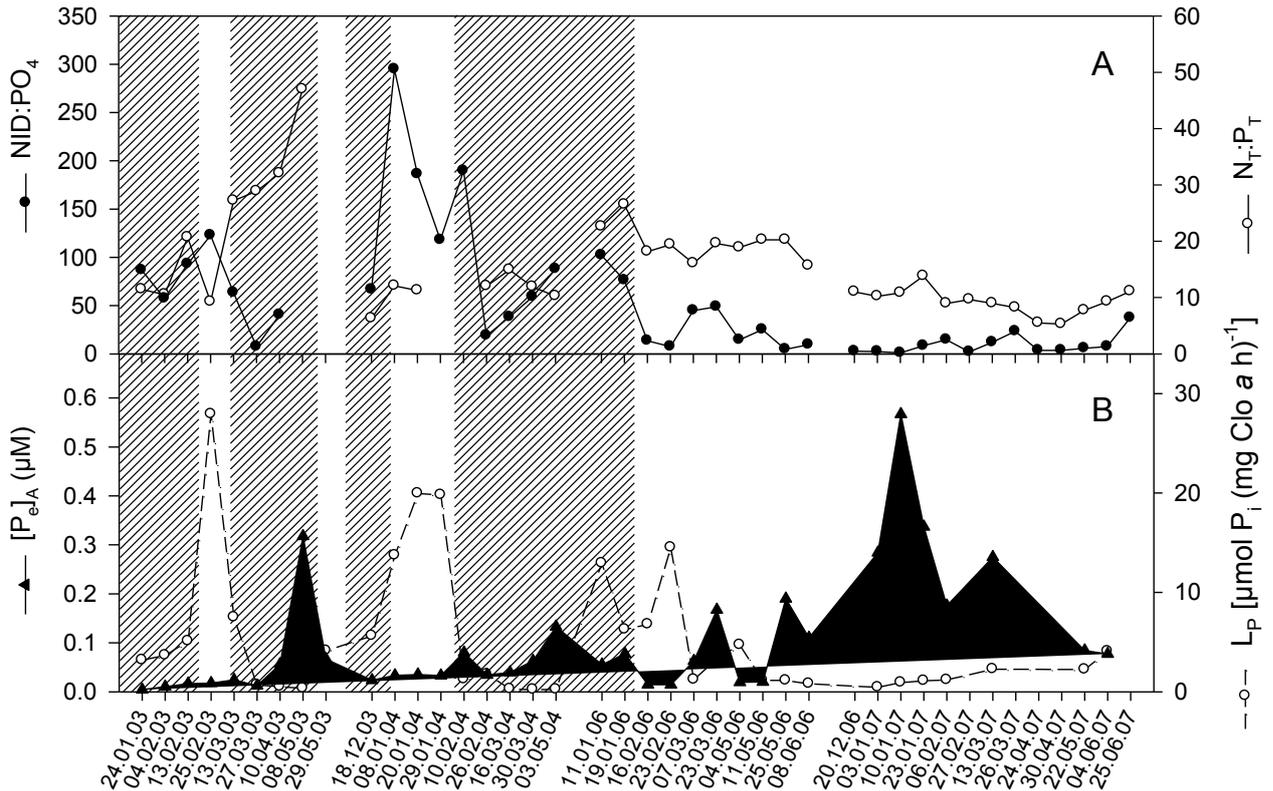


Figura 2-6. A: Relación atómica entre nitrógeno y fósforo en sus formas de nitrógeno inorgánico disuelto y fosfato (DIN:PO<sub>4</sub>), nitrógeno total y fósforo total (N<sub>T</sub>:P<sub>T</sub>). B: valores umbrales ([P<sub>e</sub>]<sub>A</sub>, triángulos negros) y los respectivos coeficientes de conductividad (L<sub>p</sub>, círculos blancos) obtenidos del ajuste de la ecuación de flujo-fuerza de las curvas de incorporación de [<sup>32</sup>P<sub>e</sub>] PO<sub>4</sub> del pulso inicial, durante el período de estudio en el Lago Rodó. Las áreas sombreadas representan los períodos de aporte de agua al lago por recirculación.

NID:PO<sub>4</sub> y concentraciones de PO<sub>4</sub> indetectables, se basa en que todos los incrementos de PO<sub>4</sub> fueron asimilados y, por lo tanto, el crecimiento se mantuvo a expensas de las reservas del nutriente y al NID disponible.

Las actividad de incorporación de PO<sub>4</sub> (L<sub>p</sub>), fue generalmente mayor durante los periodos de alta NID:PO<sub>4</sub> (RS = 0.36, p < 0.05) (Fig. 2-6B). Como fue encontrado previamente (Aubriot et al. 2000), se produjeron valores máximos de L<sub>p</sub> inmediatamente posterior al cese del aporte de agua por recirculación, conjuntamente con bajos valores umbrales (RS, p = 0.002). Aunque en general esta tendencia se mantuvo, la relación fue más compleja en comparación con la encontrada previamente (Aubriot et al. 2000), presumiblemente debido a la menor carga de nutrientes aportada por el sistema de recirculación. Sin embargo, prolongados períodos de cese del aporte produjeron efectos inversos: la disminución de la relación NID:PO<sub>4</sub> produjo una pérdida de la deficiencia por PO<sub>4</sub>, reflejada en el progresivo incremento de los valores umbrales y una disminución de la actividad de incorporación (Fig. 2-7). Sin embargo, es posible identificar un amplio rango de variación de la deficiencia por PO<sub>4</sub>, clasificada según Istvánovics et al. (1992) cuando predominó una alta relación NID:PO<sub>4</sub> (ca. 100). Asimismo, la mayoría de los valores de deficiencia externa se correspondieron con relaciones NID:PO<sub>4</sub> mayores a 100. De forma similar, los valores de [P<sub>e</sub>]<sub>A</sub> menores a 0.05 μM PO<sub>4</sub> correspondieron con un amplio rango de NID:PO<sub>4</sub> (>8). Por lo tanto, la utilidad de las relaciones estequiométricas para indicar los estados nutricionales del fitoplancton fueron válidas solo en los valores extremos.

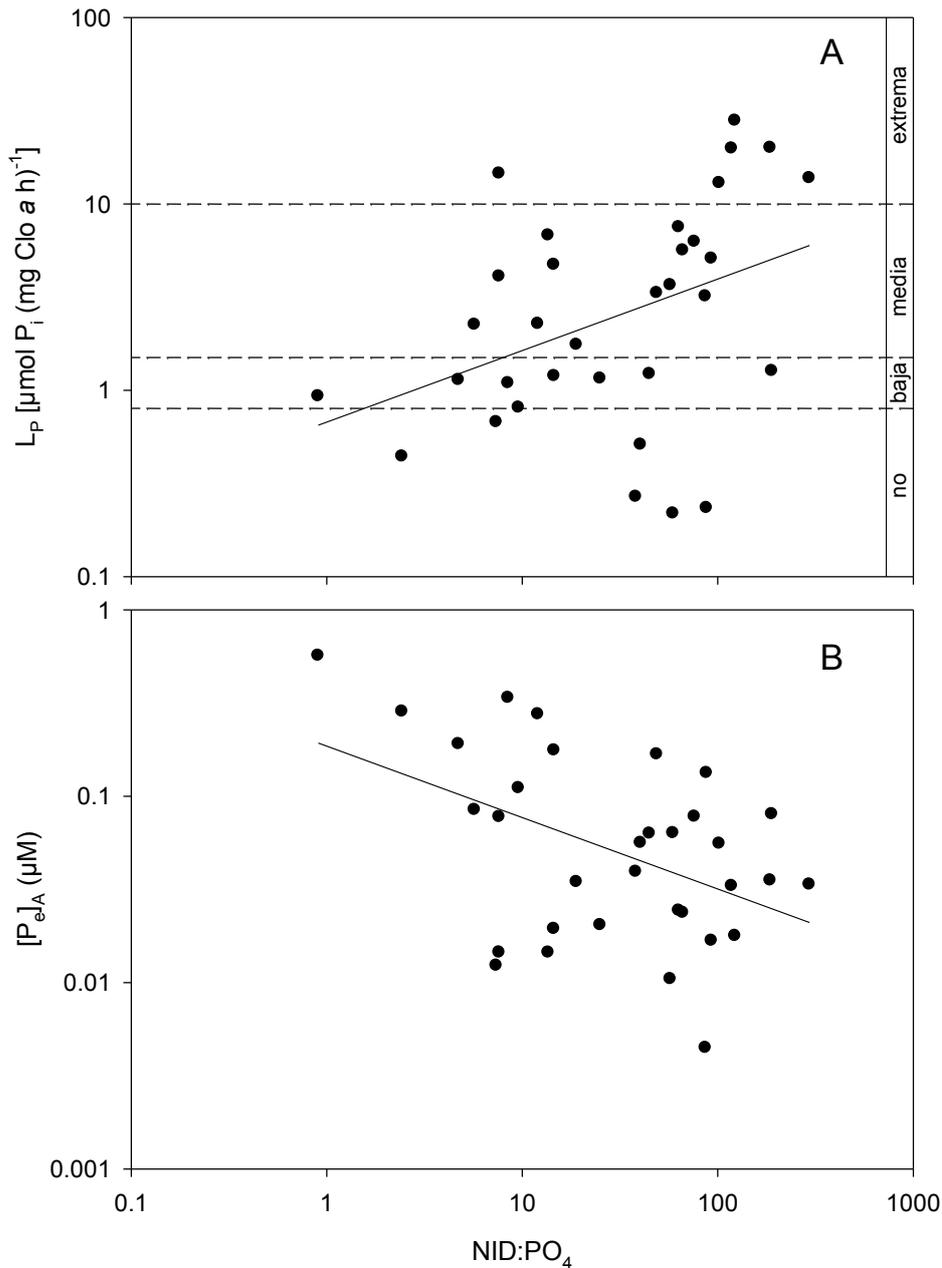


Figura 2-7. Relación entre el coeficiente de conductividad ( $L_p$ , A) y el valor umbral de  $\text{PO}_4$  ( $[\text{P}_e]_A$ , B) con la relación entre el nitrógeno inorgánico disuelto y fosfato ( $\text{NID:PO}_4$ ) ( $R_S = 0.36$  y  $-0.35$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente). La línea punteada indica los límites de los rangos de deficiencia: extrema  $> 10$ , media  $1.5 - 10$ , baja  $0.8 - 1.5$  y no deficiente  $< 0.8$ , expresado en  $\mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo a h}^{-1}$ ) según Istvánovics et al. (1992).

La limitación de la utilidad de la relación  $\text{NID:PO}_4$  se basa principalmente en los límites analíticos de los métodos espectrofotométricos convencionales ( $0.32 \mu\text{M PO}_4$  y  $7.14 \mu\text{M NO}_3$ ). Dada la actividad de incorporación mantenida por la alta biomasa de fitoplancton presente en el Lago Rodó, es presumible que la concentración externa de  $\text{PO}_4$  se encuentre cercana a los umbrales fisiológicos de la comunidad. Sin embargo, se observa una sobrestimación de 64 % por el método espectrofotométrico de determinación de  $\text{PO}_4$  y más del 70 % de los valores de  $[\text{P}_e]_A$  se encontraron por debajo del límite analítico (Fig. 2-8). Hudson & Taylor (2005) estimaron las menores concentraciones de  $\text{PO}_4$  reportadas en lagos oligotróficos ( $27 \text{ pM PO}_4$ ), a partir de cálculos con datos radioquímicos, las cuales fueron varios órdenes de magnitud inferiores a las estimadas por métodos convencionales. Sin embargo, Cotner et al. (1997) reportaron las concentraciones

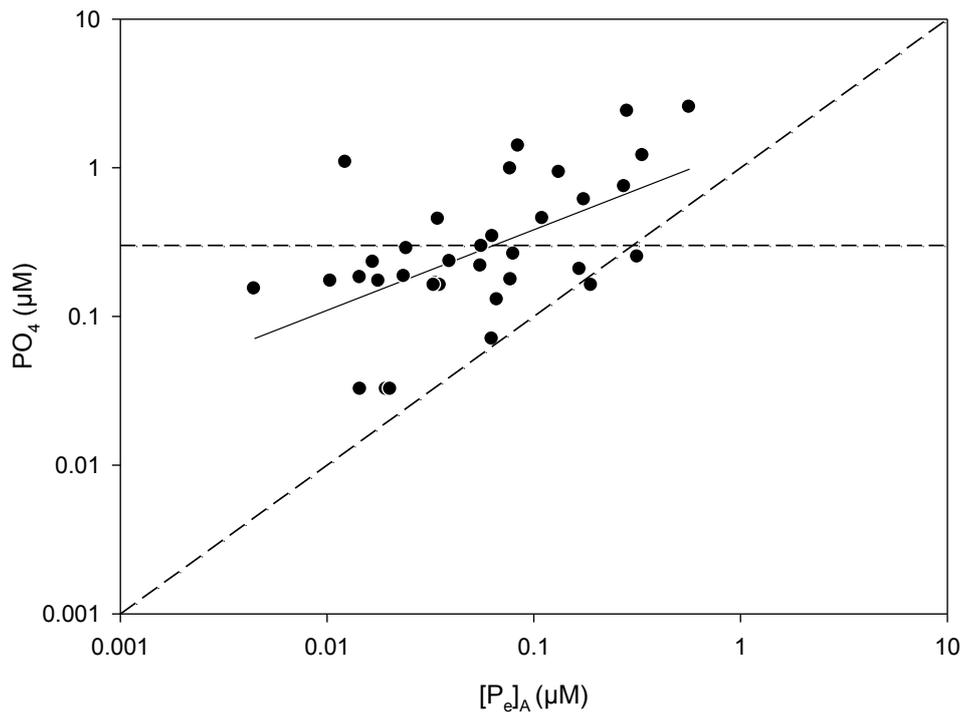


Figura 2-8. Relación entre la concentración de fosfato ( $\text{PO}_4$ ) en el agua, determinado con el método espectrofotométrico, y los valores umbrales de incorporación de  $\text{PO}_4$  del fitoplancton ( $[P_e]_A$ ) determinado con el método radioquímico ( $RS = 0.55$ ,  $p < 0.001$ ). Ambos parámetros fueron obtenidos de las mismas muestras. La línea punteada oblicua representa la relación de equivalencia entre ejes y la línea cortada, el límite analítico de la determinación de  $\text{PO}_4$  por el método de molibdato. El límite de determinación de  $[P_e]_A$  es  $0.001 \mu\text{M}$ .

mínimas medidas con métodos radioquímicos en el Mar de Sargasso ( $5 - 10 \text{ nM PO}_4$ ). En el presente estudio, la menor concentración de  $\text{PO}_4$  determinada radioquímicamente en el Lago Rodó ( $3.8 \pm 0.15 \text{ nM PO}_4$ ), fue inferior a la reportada por Cotner et al. (1997). Estas bajas concentraciones de  $\text{PO}_4$  externo revelarían una gran eficiencia de las comunidades de fitoplancton para obtener el recurso limitante del crecimiento, particularmente si se considera el estado hipereutrófico del lago estudiado. Puede concluirse entonces que la inconsistencia de la relación de Redfield en los valores intermedios como estimador de las condiciones nutricionales del ambiente, se deben al rango de concentración nanomolar a la que ocurren los cambios del valor umbral y a las cortas escalas temporales del proceso de incorporación. Esta limitación metodológica dificulta obtener una estimación precisa de las fluctuaciones ambientales de nutrientes y por consiguiente impide construir una relación histórica y causal con el crecimiento fitoplanctónico (Falkner & Falkner 2000). La investigación de la relación entre la disponibilidad del recurso, sus fluctuaciones, con el crecimiento del fitoplancton, requiere de una aproximación experimental basada en la simulación de incrementos externos de  $\text{PO}_4$  y la determinación de las respuestas fisiológicas a corto plazo de la comunidad algal. Este tipo de estudio es abordado en los próximos capítulos.

## Respuestas cinéticas de la incorporación de fosfato por fitoplancton de un lago hipereutrófico a las fluctuaciones ambientales del nutriente

---

### Introducción

El crecimiento del fitoplancton en lagos se encuentra frecuentemente limitado por las bajas concentraciones ambientales de fosfato (Schindler 1977, Hudson et al. 2000). En esta situación, los sistemas celulares de incorporación se activan y el fosfato disponible es rápidamente utilizado por la comunidad microalgal (Rigler 1956), la cual tendrá que mantener su crecimiento a expensas de los incrementos intermitentes del nutriente. Como resultado, la concentración de fosfato externo disminuye hasta un nivel estacionario donde la incorporación neta cesa, debido a que los sistemas de incorporación no poseen energía suficiente para superar el gradiente de concentración existente a través de la membrana celular (Falkner et al. 1989, Falkner et al. 1996, Wagner et al. 1995). Este nivel energético estacionario, o valor umbral, depende del nivel de acoplamiento entre el proceso de incorporación y la energía disponible (Falkner et al. 1989), el cual en comunidades de fitoplancton deficientes por fosfato se encuentra en rangos nanomolares (Rigler 1956, Falkner & Falkner 1989). Bajo estas restricciones, la regulación del sistema de incorporación de fosfato determinará la tasa a la cual un incremento transitorio de fosfato es utilizado y la cantidad del nutriente que cada organismo pueda incorporar (Falkner et al. 1995). Durante estos incrementos transitorios, el fosfato incorporado es almacenado predominantemente como gránulos de polifosfato para permitir el crecimiento durante períodos de escasez del recurso (Kulaev & Vagabov 1983). Estudios realizados con cultivos de la cianobacteria *Anacystis nidulans* demostraron que, bajo condiciones fluctuantes de suministro de fosfato, el sistema de incorporación del nutriente altera sus parámetros energéticos y cinéticos hasta alcanzar nuevas propiedades uniformes de incorporación, las cuales ocurren independientemente de la cantidad de fosfato almacenado (Wagner et al. 1995, Falkner et al. 1995). Esta "adaptación fisiológica", en la cual los organismos se aclimatan a un patrón de incrementos de fosfato de forma energéticamente favorable (Falkner et al. 1996), fue determinada también en cultivos de la cianobacteria filamentosa *Anabaena variabilis* (Falkner & Falkner 2003). Sin embargo, al presente no existen investigaciones que hayan determinado este fenómeno en comunidades naturales de fitoplancton.

En general, las investigaciones de la incorporación de fosfato no contemplan el valor umbral como parámetro energético. Esto se debe a que, desde el punto de vista metodológico, se la suele considerar como una concentración baja que puede ser eliminada del análisis cinético y, desde el punto de vista teórico, se utilizan modelos de cinética enzimática (Michaelis-Menten) que asumen que la incorporación cesa a un valor de sustrato igual a cero. Por esta razón, existen escasas investigaciones sobre la incorporación neta de fosfato y sobre el valor umbral en particular (Rigler 1956, Falkner & Falkner 1989, Istvánovics & Herodek 1995, Aubriot et al. 2000).

En un estudio previo en dos lagos se pudo determinar que la cinética de incorporación y los valores umbrales de fosfato del fitoplancton variaron de acuerdo al suministro del nutriente (Aubriot et al. 2000). En general, el valor umbral aumentó y la tasa de incorporación de fosfato disminuyó cuando se produjo un aporte del nutriente a los lagos. Estos cambios pueden ser explicados por dos hipótesis alternativas: en primer lugar, los cambios de las propiedades cinéticas y energéticas observadas se deben a las modificaciones de la composición relativa de la comunidad, la cual se construyó en base a la nueva condición nutricional en el ambiente. Esta hipótesis se sustenta en la teoría de competencia por recursos, la que considera que las especies fitoplanctónicas poseen propiedades cinéticas estables y específicas de incorporación de nutrientes, las cuales fueron evolutivamente seleccionadas (Tilman 1982, Sommer 1999). La segunda hipótesis se basa en que estos cambios cinéticos y energéticos reflejan la capacidad del fitoplancton de responder a los incrementos de la concentración de fosfato, de forma tal que cada organismo modifica a corto plazo su actividad de incorporación de modo coherente, mediante la obtención de un valor umbral común y estable.

En el presente estudio se investiga la capacidad de la comunidad de fitoplancton de un lago hipereutrófico de ajustar su actividad de incorporación de fosfato a corto plazo, como respuesta a las fluctuaciones de la concentración externa del nutriente. Debido a que la sensibilidad de respuesta de un organismo a un estímulo experimental depende de las exposiciones ambientales previas, es necesario una estrategia experimental que adapte el rango de concentración y tiempos de exposición aplicados al estado fisiológico prevaleciente del fitoplancton en el ambiente, información que no podría ser obtenida con protocolos experimentales fijos (Falkner & Falkner 2000). Estas respuestas se evaluaron mediante el modelo flujo-fuerza (Thellier 1970, Falkner et al. 1989), utilizado para analizar el comportamiento adaptativo complejo de incorporación de fosfato por cianobacterias y el estado nutricional de fitoplancton en lagos (Falkner & Falkner 1989, Istvánovics & Herodek 1995, Aubriot et al. 2000). Asimismo, se modificó un modelo reciente (Plaetzer et al. 2005) para analizar el comportamiento uniforme de incorporación de fosfato de la comunidad de fitoplancton con el fin de evaluar las interacciones de poblaciones coexistentes frente a la utilización del mismo recurso. La respuesta fisiológica adaptable de los organismos se discute en relación a su relevancia ecológica.

## Materiales y métodos

El estudio sobre las respuestas fisiológicas del fitoplancton a las fluctuaciones de fosfato se realizaron entre febrero y marzo de 2003, y enero de 2004. Las muestras fueron tomadas del Lago Rodó, Parque Rodó, Montevideo. Los antecedentes del Lago Rodó y sus principales características morfológicas, así como la obtención y procesamiento de las muestras, mediciones in situ,

determinaciones espectrofotométricas y el análisis cualitativo y cuantitativo de fitoplancton se detallan en Materiales y Métodos del Capítulo 2.

Durante el período que comprende el presente estudio, el Lago Rodó se caracterizó por una concentración de fosfato ( $\text{PO}_4$ ) cercana y por debajo de los límites de detección por espectrofotometría. El fósforo total ( $P_T$ ) fue relativamente estable (promedio =  $7.02 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ), mientras que el nitrógeno total ( $N_T$ ) varió entre 130 y 497  $\mu\text{M}$ . El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) fluctuó entre 20.4 y 63.9  $\mu\text{M}$ , del cual el 80% correspondió al nitrato. La clorofila *a* ( $\text{Clo } a$ ) fue poco variable durante el período estudiado (promedio =  $204.1 \pm 19.4 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ ).

#### Determinación de la incorporación neta de fosfato y análisis de la cinética

Se tomaron dos submuestras de 50 ml ( $S_1$  y  $S_2$ ) de la misma muestra original de agua del Lago Rodó usada para análisis químico y biológico. La determinación de la incorporación neta de fosfato por fitoplancton en dichas submuestras se realizó de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 2.

La dependencia de la incorporación neta en la concentración externa de fosfato  $[P_e]$  se analizó con la relación flujo-fuerza de Falkner et al. (1989):

$$d[P_e]/dt = -L_p (\log[P_e] - \log[P_e]_A)$$

en la cual  $L_p$  es un coeficiente de conductividad que refleja la actividad del transportador de fosfato (Falkner et al. 1995) y  $[P_e]_A$  el valor umbral en donde la incorporación neta cesa. De acuerdo a lo propuesto por Thellier (1970), a concentraciones cercanas a  $[P_e]_A$ , los datos reflejan una relación lineal entre las tasas de incorporación y el logaritmo de la concentración externa. Esta relación puede mostrar una dependencia no lineal debido a los procesos adaptativos a las concentraciones externas por cianobacterias. Por lo tanto, el rango de concentración en el cual la función es válida debe probarse experimentalmente. Para ello se utilizó la expresión completa compuesta del término lineal y del no lineal, propuesta por Thellier:

$$J_p = d[P_e]/dt = -L_p (\log[P_e] - \log[P_e]_A) - L(\log[P_e] - \log[P_e]_A)^m$$

con  $m$  entero  $>1$ , de acuerdo a lo detallado en las leyendas de las figuras. Esta expresión fue utilizada recientemente para analizar las propiedades adaptativas del sistema de incorporación de fosfato de la cianobacteria *Anabaena variabilis* (Falkner et al. 2006).

La función flujo-fuerza fue ajustada a los datos experimentales a través de la programación en el lenguaje de MLAB (Mathematical Modelling System, Civilized Software, Inc.). Los  $L_p$  y  $[P_e]_A$  resultantes de los ajustes de los transcurros de tiempo se muestran en las leyendas de las figuras, los cuales se utilizaron para la comparación de la cinética de los pulsos de fosfato y la diferencia entre tratamientos. Además se utilizaron las concentraciones umbrales medidas experimentalmente  $[P'_e]_A$ , las que se expresan como el promedio y desvío estándar de al menos las últimas tres concentraciones mínimas de  $[^{32}\text{P}_e]$  determinadas en el transcurso de la remoción de cada pulso de fosfato aplicado. El tiempo de exposición ( $t_E$ ) del fitoplancton al fosfato agregado sobre el valor umbral se determinó como el intervalo entre el tiempo inicial de aplicación del pulso de  $[^{32}\text{P}_e]$  y el tiempo en el que el  $[^{32}\text{P}_e]$  agregado se aproxima al umbral  $[P_e]_A$ , correspondiente al 99% de similitud entre los valores del ajuste de la curva de remoción y el valor umbral  $[P_e]_A$ . Para el gráfico Thellier, se calculó la tasa de incorporación (correspondiendo a las pendientes de los ajustes computados en función del tiempo) a los intervalos de tiempo donde la medición de

incorporación fue realizada. Estas tasas fueron regraficadas en función del logaritmo de la concentración externa de fosfato medido experimentalmente, a los intervalos de tiempo respectivos. La tasa de incorporación fue expresada en relación al tiempo (horas) y al contenido de Clo *a* (mg) de la comunidad de fitoplancton.

La confianza del método aplicado a comunidades naturales fue confirmada como se detalla en el Capítulo 2. La diferencia de  $L_p$  entre tratamientos se determinó mediante la aplicación de GLM-ANCOVA (Statistica 6.0, StatSoft, Inc.). Las diferencias de  $[P_e]_A$  entre tratamientos se evaluaron con los límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% y 99% ( $IC_{95\%}$  e  $IC_{99\%}$ , respectivamente), calculado a partir del ajuste de la función flujo-fuerza.

## Resultados

### Alteraciones del valor umbral de fosfato

Para investigar si la comunidad de fitoplancton posee la propiedad de incrementar el valor umbral, se utilizó una muestra del Lago Rodó con un contenido de  $204.0 \pm 41.6 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ . El biovolumen de cada taxa ( $B_T$ ) de la comunidad de fitoplancton correspondió 23.6% a diatomeas (*Synedra spp.*), 19.6% a clorofitas (8.9% *cf. Chlorella sp.*; 5.9% *Scenedesmus sp.* y 4.9% *Monoraphidium sp.*), 13.3% a cianobacterias (6.2% colonias de *Microcystis sp.*, 5.9% *Planktolyngbya sp.* y 1.2% *Planktothrix agardhii*) y un porcentaje menor (<1%) a criptofitas y dinoflagelados. Una fracción importante correspondió a organismos fitoplanctónicos no identificados (42.3%). La muestra original se dividió en dos submuestras ( $S_1$  y  $S_2$ ), las cuales recibieron tres pulsos consecutivos de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato (Fig. 3-1), equivalentes a 1.4 veces la concentración de  $P_T$  determinado. La Figura 3-1 muestra el resultado del ajuste conjunto de la función flujo-fuerza a ambas submuestras. El primer pulso se ajustó a la ecuación no lineal, mientras que los pulsos siguientes pudieron ser ajustados a la relación de flujo-fuerza lineal. Durante este proceso, se observó un incremento significativo del valor umbral de hasta siete veces el valor inicial (primer pulso:  $[P_e]_A = 0.028 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato,  $IC_{95\%} = \pm 0.051 \mu\text{M}$ ; tercer pulso:  $[P'_e]_A = 0.207 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato,  $IC_{95\%} = \pm 0.094 \mu\text{M}$ ) (Fig. 3-1). Sin embargo, los coeficientes de conductividad sufrieron una menor modificación durante la secuencia de pulsos ( $L_p = 7.1 \cdot 10^{-3}$ ,  $9.5 \cdot 10^{-3}$ ,  $10.7 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ; primer, segundo y tercer pulso, respectivamente). El gráfico Thellier de la Figura 3-2 muestra la modificación progresiva de  $[P_e]_A$  que experimentó el fitoplancton durante la sucesión de pulsos.

### Alteraciones cinéticas de la incorporación de fosfato

Para estudiar la respuesta cinética de la comunidad de fitoplancton se expuso a una muestra del Lago Rodó conteniendo  $220 \pm 30 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$  a dos patrones de incrementos en la concentración externa de fosfato. La comunidad de fitoplancton estuvo dominada por las cianobacterias filamentosas *Planktothrix agardhii* ( $B_T = 59\%$ ) y *Raphidiopsis mediterranea* ( $B_T = 35\%$ ). El restante biovolumen correspondió a Dinoflagelados (4.9 %, *cf. Peridinium*), Flagelados verdes ( $B_T < 1\%$ ) y a una cianobacteria filamentososa *cf. Planktolyngbya* ( $B_T < 1\%$ ). La muestra original se separó en tres submuestras  $S_1$ ,  $S_2$  y C. Para comparar la cinética de incorporación, la submuestra  $S_1$  recibió dos pulsos sucesivos de  $4 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato y la  $S_2$  dos pulsos de  $7 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato (Fig. 3-3). La submuestra C (control) fue premarcada con  $0.1 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato e incubada bajo las mismas condiciones que las otras submuestras para comparaciones posteriores. Los dos pulsos de  $4 \mu\text{M}$

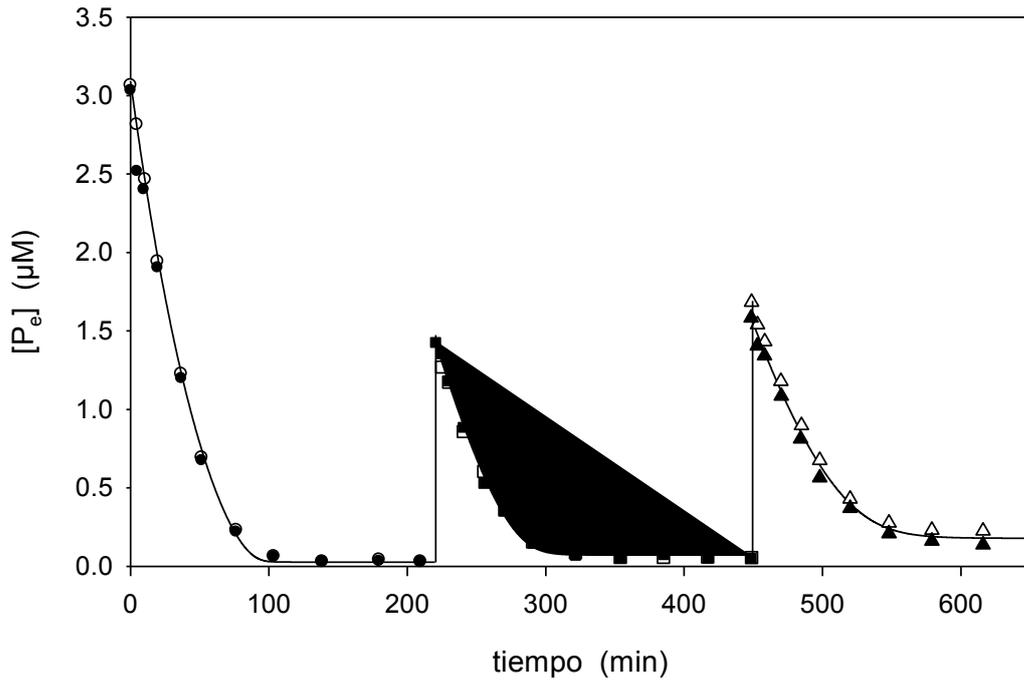


Figura 3-1. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton obtenidas del Lago Rodó ( $S_1$ , símbolos negros y  $S_2$  símbolos blancos), luego del agregado de un pulso de  $3 \mu\text{M}$  seguido de dos pulsos de  $1.5 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato a cada submuestra. Las curvas representan el mejor ajuste computado, obtenido con la ecuación no lineal:  $d[P_e]/dt = -L_p(\log[P_e] - \log[P_e]_A) - L(\log[P_e] - \log[P_e]_A)^m$ , con los parámetros: primer pulso:  $L_p = 7.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.013 \cdot 10^{-3}$ ,  $[P_e]_A = 0.028 \mu\text{M}$ ,  $m = 5$ ,  $r^2 = 0.9996$ ; y lineal para los siguientes pulsos:  $d[P_e]/dt = -L_p(\log[P_e] - \log[P_e]_A)$ , con los parámetros: segundo pulso:  $L_p = 9.5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.071 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9975$ ; tercer pulso:  $L_p = 10.7 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.179 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9915$ .

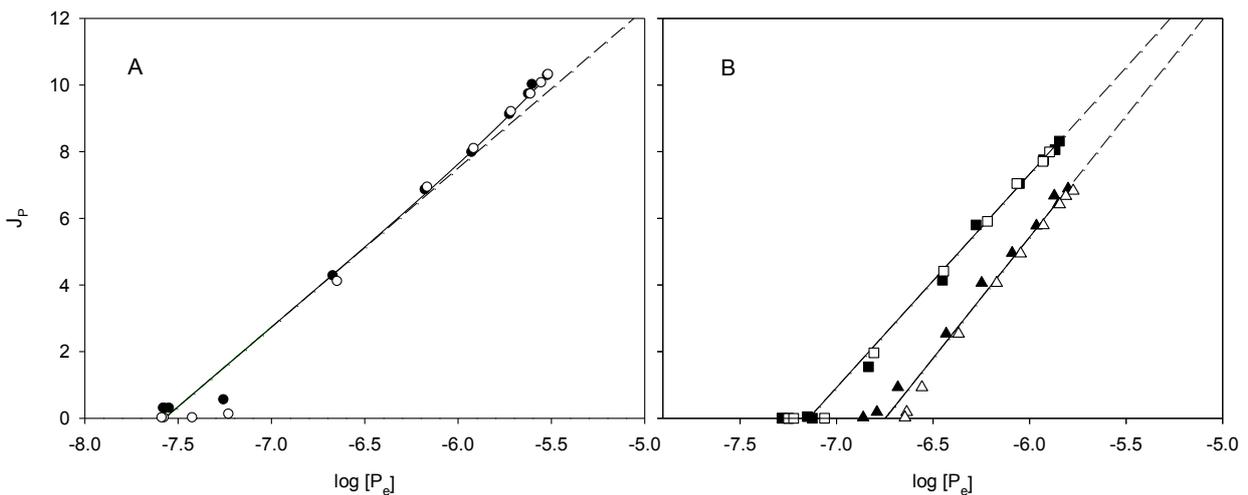


Figura 3-2. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 3-1. A: primer pulso de  $3 \mu\text{M}$  ( $S_1$ , símbolos negros y  $S_2$  símbolos blancos); B: segundo y tercer pulso de  $1.5 \mu\text{M}$ . La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

[<sup>32</sup>P] fosfato agregados a la submuestra S<sub>1</sub> fueron incorporados en ca. 60 min, duplicando el contenido de P<sub>T</sub> de la muestra de fitoplancton. Las diferencias en las concentraciones umbrales observadas de cada pulso no fueron significativas (pulso 1, S<sub>1</sub>: [P<sub>e</sub>]<sub>A</sub> = 0.076 μM [<sup>32</sup>P] fosfato, IC<sub>95%</sub> = ± 0.076 μM; pulso 2, S<sub>1</sub>: [P<sub>e</sub>]<sub>A</sub> = 0.084 μM [<sup>32</sup>P] fosfato, IC<sub>95%</sub> = ± 0.094 μM). Paralelamente, la submuestra S<sub>2</sub> duplicó su contenido de P<sub>T</sub> durante el primer pulso (Fig. 3-3, círculos blancos) y el fitoplancton alcanzó concentraciones umbrales similares a las de S<sub>1</sub> (pulso 1, S<sub>2</sub>: [P<sub>e</sub>]<sub>A</sub> = 0.042 μM [<sup>32</sup>P] fosfato, IC<sub>95%</sub> = ± 0.065 μM; pulso 2, S<sub>2</sub>: [P<sub>e</sub>]<sub>A</sub> = 0.034 μM [<sup>32</sup>P] fosfato, IC<sub>95%</sub> = ± 0.031 μM). Sin embargo, el segundo pulso en S<sub>2</sub> fue incorporado por el fitoplancton a una menor velocidad que la del pulso precedente (45 min adicionales) (Fig. 3-3, cuadrados blancos). El mejor ajuste obtenido fue con la ecuación lineal de flujo-fuerza ( $r^2 > 0.9996$ ), a excepción del segundo pulso aplicado a S<sub>2</sub>. El gráfico Thellier del flujo o tasa de incorporación (J<sub>p</sub>) vs log [P<sub>e</sub>] muestra la relación lineal entre ambos parámetros, así como la diferencia entre las velocidades de incorporación (Fig. 3-4). Se observó una disminución de L<sub>p</sub> cercana a la mitad entre el primer y segundo pulso de [<sup>32</sup>P] fosfato en S<sub>1</sub> (L<sub>p</sub> = 28.0 y 16.8 μmol P<sub>i</sub> (mg Clo a h)<sup>-1</sup>, respectivamente; GLM-ANCOVA, p < 0.001), mientras que la reducción de este parámetro fue cuatro veces mayor en la submuestra S<sub>2</sub> (L<sub>p</sub> = 26.0 y 6.5 μmol P<sub>i</sub> (mg Clo a h)<sup>-1</sup>, primer y segundo pulso respectivamente; GLM-ANCOVA, p < 0.01) (Fig. 3-4). Esta alteración de la cinética fue acompañada de una leve desviación de la relación lineal entre (J<sub>p</sub>) y log [P<sub>e</sub>]. Para comparar la cinética de incorporación, las mismas submuestras S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> y el control C fueron sometidas a la misma concentración externa luego del tiempo 500 min (0.9 μM [<sup>32</sup>P] fosfato) (Fig. 3-5A). El fitoplancton de las tres submuestras mostró diferentes tiempos de exposición (t<sub>E</sub>) entre el intervalo de tiempo inicial de aplicación del pulso de [<sup>32</sup>P<sub>e</sub>] y el tiempo en el que el [<sup>32</sup>P<sub>e</sub>] agregado se aproximó al umbral [P<sub>e</sub>]<sub>A</sub>: en C, el fitoplancton incorporó el fosfato agregado en 10.5 min, mientras que en S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> lo hizo en 28.6 y 47.4 min, respectivamente. El gráfico Thellier de los mismos datos muestra la diferencia de L<sub>p</sub> entre las tres submuestras (GLM-ANCOVA, p < 0.01), sin embargo las tres cinéticas mostraron una relación lineal con log [P<sub>e</sub>] (Fig. 3-5B). El fitoplancton de S<sub>2</sub>, que fue sometido a la mayor concentración externa, cesó la incorporación del último pulso a una mayor concentración umbral ([P'<sub>e</sub>]<sub>A</sub> = 0.080 ± 0.010 μM [<sup>32</sup>P] fosfato), aunque no significativa con respecto a las de S<sub>1</sub> y C (Fig. 3-5A). La alteración de la cinética observada en este experimento se reflejó principalmente en la disminución de L<sub>p</sub>, la cual estuvo relacionada con la mayor concentración de [P<sub>e</sub>] a la que los organismos fueron expuestos. El valor umbral sufrió un incremento progresivo en los sucesivos pulsos, diferencia que se hizo más evidente en el fitoplancton expuesto a la mayor concentración de [P<sub>e</sub>] inicial en S<sub>2</sub>.

#### Alteraciones cinéticas y energéticas concomitantes de la incorporación de fosfato

Con el objetivo de conocer si los cambios energéticos (valor umbral) y cinéticos se deben a una respuesta cinética al incremento de la concentración externa o a un efecto de saturación por la cantidad de fosfato almacenado, fue necesario agregar la misma cantidad de [<sup>32</sup>P<sub>e</sub>] a dos submuestras (S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) de fitoplancton tomadas del Lago Rodó (Clo *a* = 211.1 ± 3.4 μg l<sup>-1</sup>), pero aplicadas en dos patrones distintos de pulsos de fosfato. En este caso, la comunidad estuvo dominada casi exclusivamente por *P. agardhii* (B<sub>T</sub> = 99%), correspondiendo el restante biovolumen a *R. mediterranea* (B<sub>T</sub> = 0.7%), diatomeas, criptofitas y dinoflagelados.

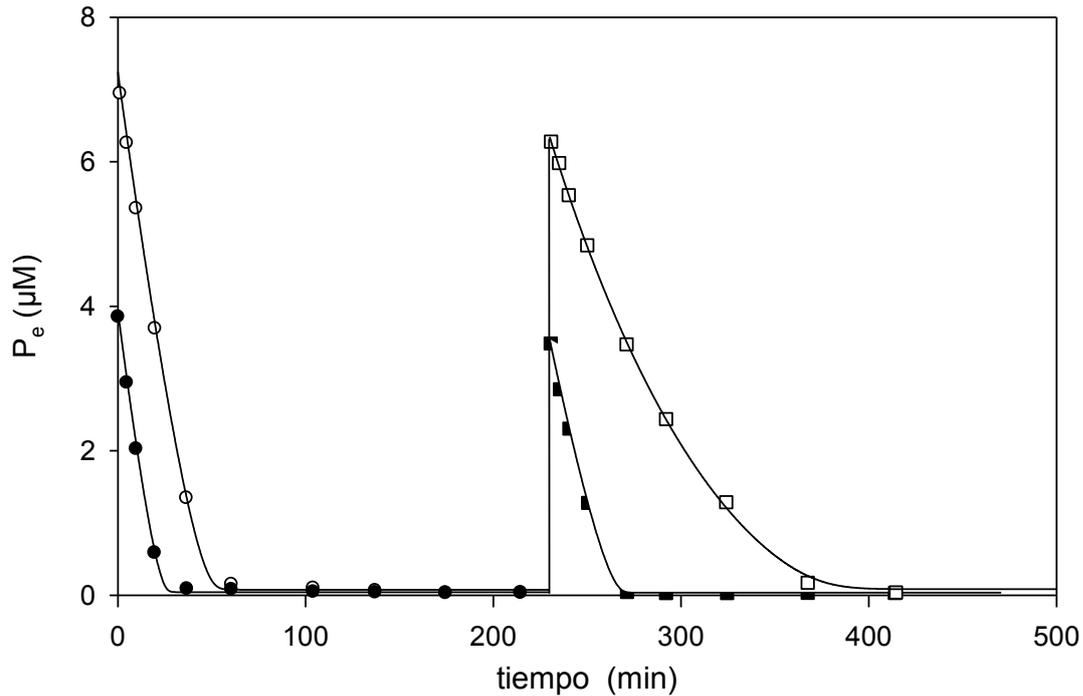


Figura 3-3. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$  y  $S_2$ ) obtenidas del Lago Rodó, luego del agregado de dos pulsos consecutivos de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato. Símbolos negros: remoción de dos pulsos consecutivos de  $4 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato en la submuestra  $S_1$ . Las curvas representan el mejor ajuste computado, obtenido con la ecuación lineal (círculos negros:  $L_p = 0.044 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.042 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9998$ ; cuadrados negros:  $L_p = 0.028 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.035 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9999$ ). Símbolos blancos: remoción de dos pulsos consecutivos de  $7 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato en la submuestra  $S_2$ . Las curvas representan el mejor ajuste computado, obtenido con la ecuación lineal (círculos) y no lineal (cuadrados) (círculos blancos:  $L_p = 0.042 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.076 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9998$ ; cuadrados blancos:  $L_p = 0.010 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.025$ ,  $[P_e]_A = 0.084 \mu\text{M}$ ,  $m = 5$ ,  $r^2 = 0.9996$ ).

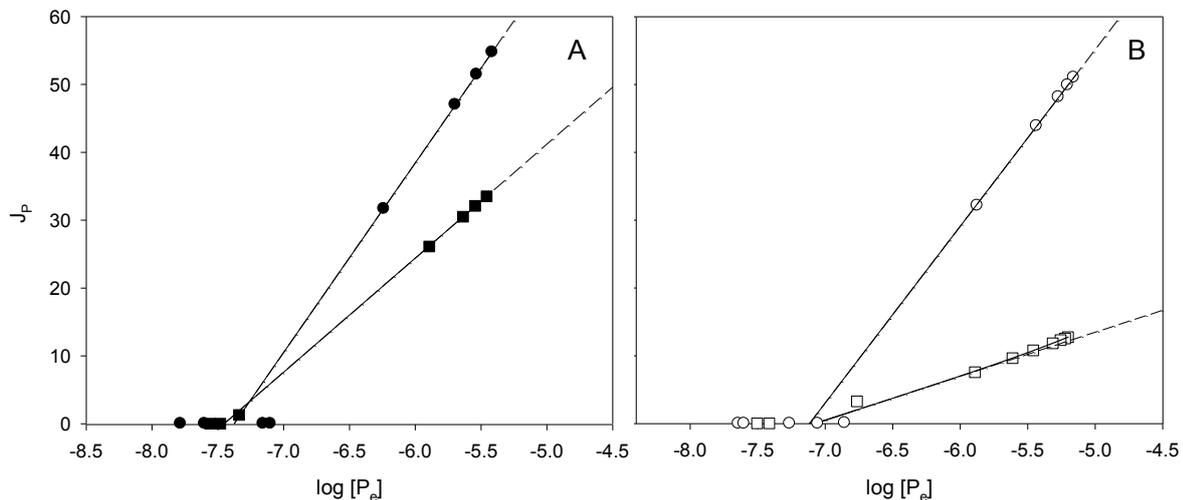


Figura 3-4. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo de la Fig. 3-3 (A: submuestra  $S_1$ ; B: submuestra  $S_2$ ). La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo a h}$ ) $^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

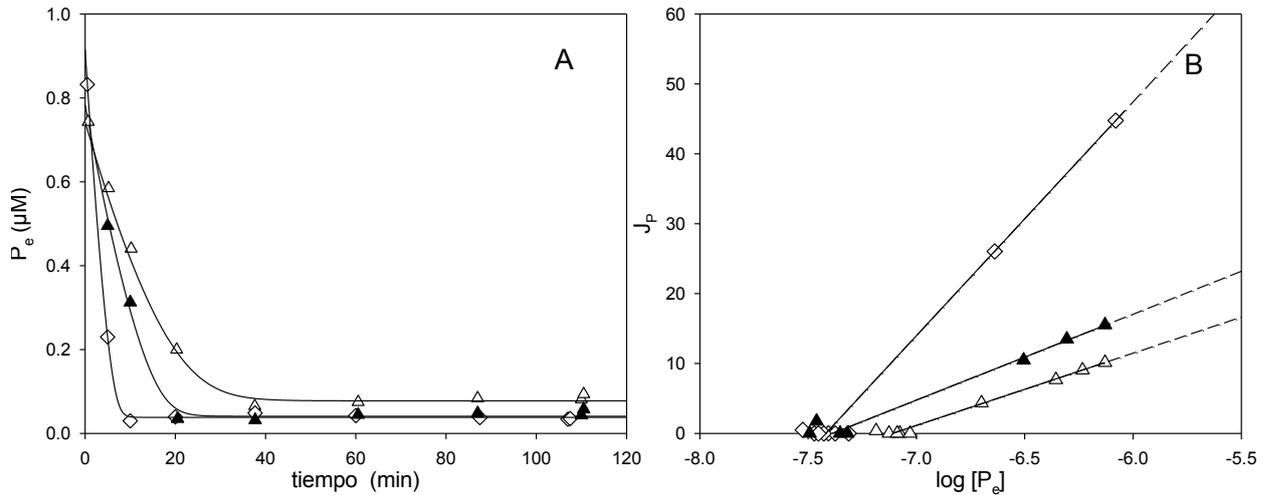


Figura 3-5. A: Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato luego del agregado de un pulso de  $0.9 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato a tres submuestras de fitoplancton provenientes del mismo experimento de la Figura 3-3 (submuestra C: rombos blancos,  $S_1$ : triángulos negros y  $S_2$ : triángulos blancos). Las curvas representan el mejor ajuste computado, obtenido con la ecuación lineal (C:  $L_p = 0.053 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.038 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9988$ ;  $S_1$ :  $L_p = 0.019 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.041 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9969$ ;  $S_2$ :  $L_p = 0.016 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.078 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9985$ ). B: Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurso de tiempo de A. La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo a h}$ ) $^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

La submuestra  $S_1$  se expuso a cinco pulsos subsecuentes de  $0.2 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato, mientras que  $S_2$  recibió un pulso de  $1 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato (Fig. 3-6A). El pulso de  $1 \mu\text{M}$  fue incorporado luego de 3 horas. Debido a esta baja actividad de incorporación, el siguiente pulso en  $S_1$  se aplicó luego de observar la incorporación total del pulso precedente (Fig. 3-6A). Los valores de  $[P'_e]_A$  resultantes en ambas submuestras fueron prácticamente idénticos ( $S_1$ :  $[P'_e]_A = 0.013 \pm 0.5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $[P'_e]_A = 0.013 \pm 1.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ). Para comparar la cinética de incorporación de fosfato, luego de 280 min de iniciado el experimento, se aplicaron dos pulsos de igual concentración máxima de  $[^{32}\text{P}_e]$  a cada submuestra (Fig. 3-6B). Las curvas de remoción de fosfato por ambas submuestras de fitoplancton luego del primer pulso fueron iguales con respecto a las concentraciones umbrales alcanzadas ( $S_1$ :  $[P_e]_A = 0.014 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.012 \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $[P_e]_A = 0.015 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.013 \mu\text{M}$ ) y a los parámetros del ajuste de la función no lineal (Fig. 3-6B). En cambio, la cinética de remoción el segundo pulso mostró desviaciones entre las submuestras. La concentración umbral resultante de la suspensión de fitoplancton que fue expuesta previamente al pulso de concentración micromolar, incrementó el  $[P_e]_A$  significativamente con respecto a la submuestra paralela ( $S_1$ :  $[P_e]_A = 0.033 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.010 \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $[P_e]_A = 0.066 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.006 \mu\text{M}$ ). El gráfico Thellier muestra la relación entre  $J_p$  y  $\log [P_e]$ , la cual fue cercana a la linealidad en todos los casos (Fig. 3-7). Entonces, puede concluirse que los cambios en el incremento del valor umbral no fueron provocados por la acumulación de fosfato intracelular, debido a que ocurrieron luego de aplicada la misma concentración externa en ambos tratamientos (Fig. 3-6A).

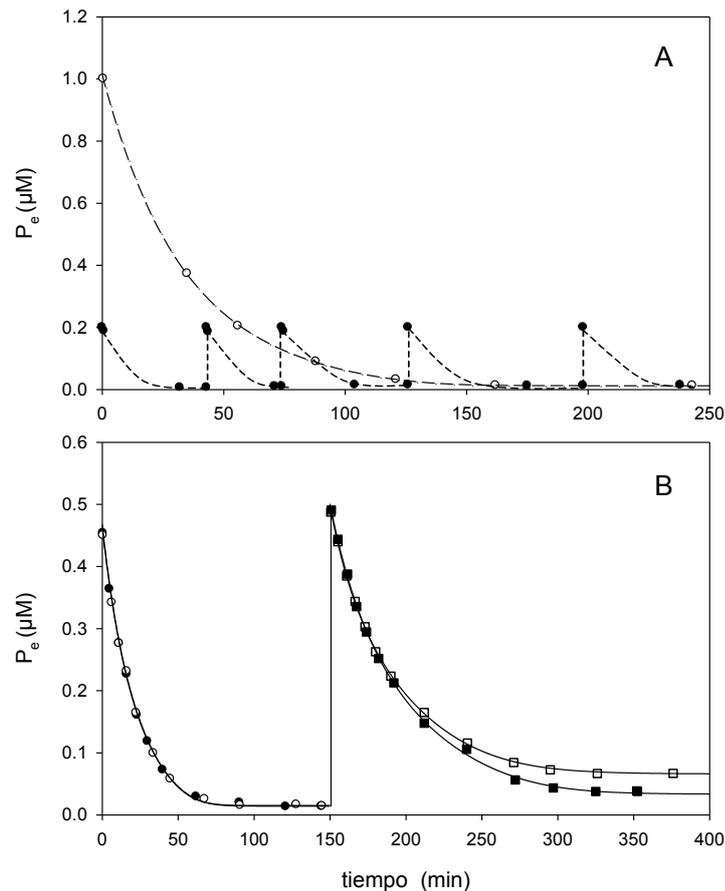


Figura 3-6. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ : símbolos negros y  $S_2$ : símbolos blancos) obtenidas del Lago Rodó. A: pretratamiento de 5 pulsos de  $0.2 \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de  $1 \mu\text{M}$  a  $S_2$ . Se muestra la concentración inicial y final para cada pulso de  $0.2 \mu\text{M}$ . B: Comparación de la cinética entre submuestras por el agregado de 2 pulsos consecutivos de  $0.5 \mu\text{M}$  a cada una a  $t = 280$  min del agregado de los pulsos iniciales en A. Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado de cada submuestra independiente obtenido con la ecuación no lineal ( $m = 5$ ), con los parámetros: primer pulso  $S_1$ :  $L_p = 1.91 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.03 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.014 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9995$ ; primer pulso  $S_2$ :  $L_p = 2.12 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.03 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.015 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9995$ ; segundo pulso  $S_1$ :  $L_p = 1.32 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.06 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.033 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9993$ ; segundo pulso  $S_2$ :  $L_p = 2.33 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.25 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.066 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9997$ .

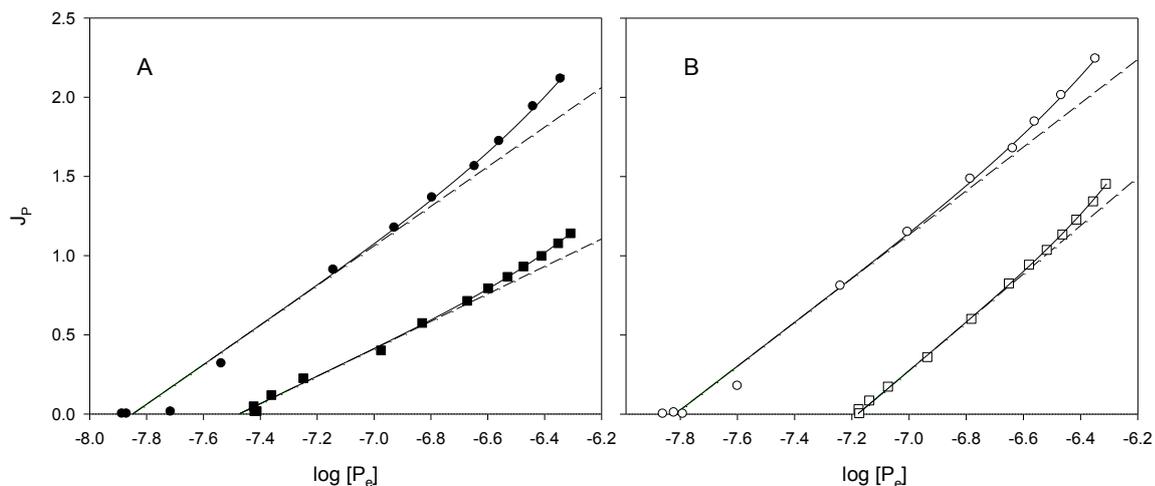


Figura 3-7. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la figura 3-6. A: primer (círculos negros) y segundo pulso (cuadrados negros) de  $0.5 \mu\text{M}$  a la submuestra  $S_1$ ; B: primer y segundo pulso de  $0.5 \mu\text{M}$  a la submuestra  $S_2$  (círculos blancos y cuadrados blancos, respectivamente). La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo a h})^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

Para poder evaluar la capacidad de respuesta del fitoplancton a incrementos externos de fosfato, procurando amplificar las diferencias entre las respuestas de los tratamientos, fue necesario aumentar la concentración y el número de los pulsos de  $[^{32}\text{P}_e]$  aplicados. La comunidad de fitoplancton obtenida en la muestra original ( $\text{Clo } a = 175.6 \pm 3.4 \mu\text{g l}^{-1}$ ) estuvo dominada nuevamente por *P. agardhii* ( $B_T = 93.3\%$ ) seguida de *R. mediterranea* ( $B_T = 5.9\%$ ), criptofitas, diatomeas y cianobacterias ( $B_T < 1\%$ ). En la Figura 3-8A se muestra el mismo patrón de pulsos aplicados previamente, pero realizado en una secuencia duplicada. Una submuestra de fitoplancton ( $S_1$ ) recibió diez incrementos consecutivos de  $1 \mu\text{M } [^{32}\text{P}_e]$  fosfato, mientras que la submuestra paralela ( $S_2$ ) fue expuesta a dos pulsos de  $5 \mu\text{M } [^{32}\text{P}_e]$  fosfato. Se observó una disminución progresiva de la velocidad de incorporación en los últimos tres pulsos aplicados a  $S_1$ , ya que la concentración de  $[\text{P}_e]$  determinada a un intervalo de tiempo aproximadamente constante (intervalo aprox. entre pulsos: 45 min) mostró un aumento de  $[\text{P}_e]$ , partiendo de  $26.0 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$  de valor final a  $37.3 \cdot 10^{-3}$ ,  $97.3 \cdot 10^{-3}$  y  $236.5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$  luego de cada pulso (Fig. 3-8A). El  $t_E$  acumulado de los pulsos sucesivos en  $S_1$  fue 320 min, mientras que en  $S_2$  fue próximo a la mitad ( $t_E = 186$  min) (Fig. 3-8A). Se observaron diferencias remarcables cuando se comparó la cinética de incorporación en cada submuestra, mediante el agregado de dos pulsos consecutivos de  $1 \mu\text{M } [^{32}\text{P}_e]$  fosfato (Fig. 3-8B). Luego del primer pulso comparativo, la principal alteración observada se manifestó en la disminución a la mitad del  $L_p$  del fitoplancton expuesto a la sucesión de pulsos menores ( $S_1$ ) en relación a la submuestra paralela  $S_2$ . Sin embargo, el valor umbral alcanzado por ambas fue esencialmente el mismo ( $S_1$ :  $[\text{P}_e]_A = 0.071 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.054 \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $[\text{P}_e]_A = 0.066 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.072 \mu\text{M}$ ). La segunda adición de  $1 \mu\text{M } [^{32}\text{P}_e]$  fosfato amplificó aún más las diferencias entre las submuestras de fitoplancton, mostrando un aumento notable del valor umbral del fitoplancton de  $S_1$ , cercano a tres veces el alcanzado por  $S_2$  ( $S_1$ :  $[\text{P}_e]_A = 0.271 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.068 \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $[\text{P}_e]_A = 0.092 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.056 \mu\text{M}$ ) (Fig. 3-8B). Esta alteración cinética y energética se mantuvo por más de 12 horas. El gráfico Thellier mostró que el  $J_p$  máximo de  $S_1$  correspondió a la mitad del mostrado por  $S_2$  (Fig. 3-9). El segundo pulso en  $S_2$  tuvo un  $J_p$  máximo ca. 40% inferior al precedente y un  $L_p$  25 % menor (Fig. 3-9B). Las diferencias entre los  $L_p$  del primer y segundo pulso en  $S_1$  y  $S_2$  fueron altamente significativas (GLM-ANCOVA,  $p < 0.01$ ). Ambos pulsos en  $S_1$  partieron del mismo valor bajo de flujo inicial pero el  $L_p$  sufrió un incremento cercano al doble (Fig. 3-9A). De forma similar al experimento anterior (Fig. 3-6), se concluye que el incremento del valor umbral y los cambios de  $L_p$  se produjeron previo a saturar la capacidad de almacenamiento de fosfato por el fitoplancton. Sin embargo, el fitoplancton que experimentó la secuencia de pulsos de menor concentración sufrió la mayor modificación de la cinética de incorporación. Estos cambios se produjeron en dos etapas: primero, se redujo el  $L_p$  durante el primer pulso (Fig. 3-8B) y, en segundo lugar, el valor umbral aumentó remarcablemente con un aumento de  $L_p$ . El alto valor umbral resultante se mantuvo en el mismo nivel por varias horas.

En un experimento similar, se buscó aumentar la diferencia entre los tratamientos con el objetivo de encontrar una amplificación de la respuesta del comportamiento cinético de incorporación de fosfato del fitoplancton. En contraste con los experimentos anteriores, la muestra de fitoplancton del Lago Rodó ( $210.2 \pm 15.7 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ ) estuvo co-dominada por las cianobacterias filamentosas *R. mediterranea* ( $B_T = 56.3\%$ ) y *P. agardhii*, con un menor biovolumen ( $B_T = 43.3\%$ ). El biovolumen restante correspondió a las criptofitas. Se aplicaron diez pulsos de  $1 \mu\text{M } [^{32}\text{P}_e]$  fosfato a

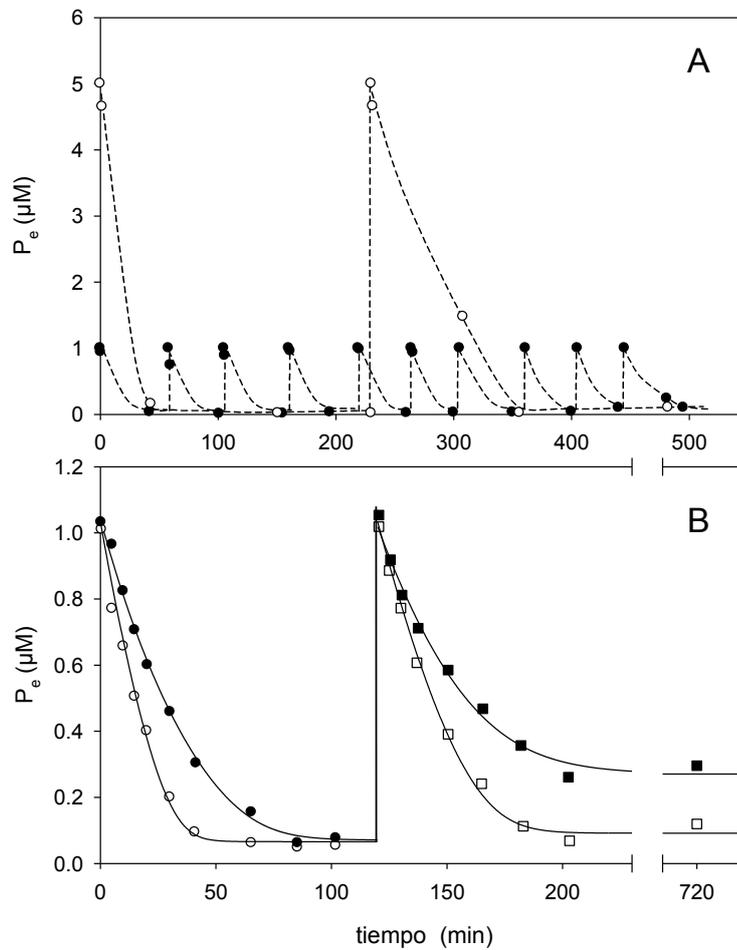


Figura 3-8. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ : símbolos negros y  $S_2$ : símbolos blancos) obtenidas del Lago Rodó. A: pretratamiento de 10 pulsos de  $1 \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 2 pulsos de  $5 \mu\text{M}$  a  $S_2$ . Se muestra la concentración inicial y final para cada pulso de  $1 \mu\text{M}$ . B: Comparación de la cinética entre submuestras por el agregado de 2 pulsos consecutivos de  $1 \mu\text{M}$  a cada una, a  $t = 550 \text{ min}$  del agregado de los pulsos iniciales en A. Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado de cada submuestra independiente: Submuestra  $S_1$ : ecuación no lineal ( $m = 5$ ), con los parámetros del primer pulso:  $L_p = 6.91 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.05 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.071 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9969$ ; segundo pulso:  $L_p = 13.96 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.271 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9902$ ; Submuestra  $S_2$ : ecuación lineal, con los parámetros del primer pulso:  $L_p = 14.18 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.066 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9941$ ; segundo pulso:  $L_p = 10.74 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.092 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9969$ .

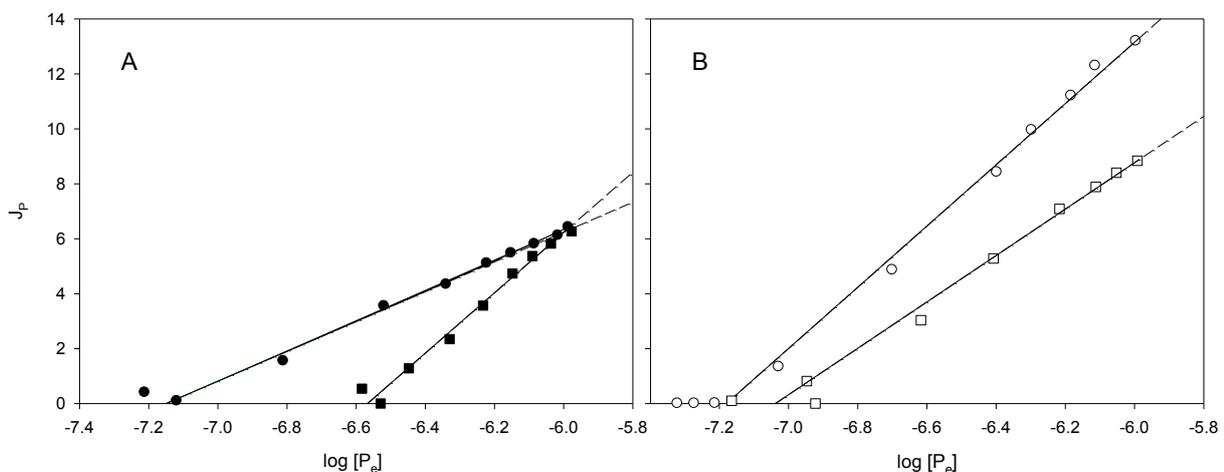


Figura 3-9. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 3-8. A: primer y segundo pulso de  $1 \mu\text{M}$  a la submuestra  $S_1$ ; B: primer y segundo pulso de  $1 \mu\text{M}$  a la submuestra  $S_2$ . La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo a h})^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

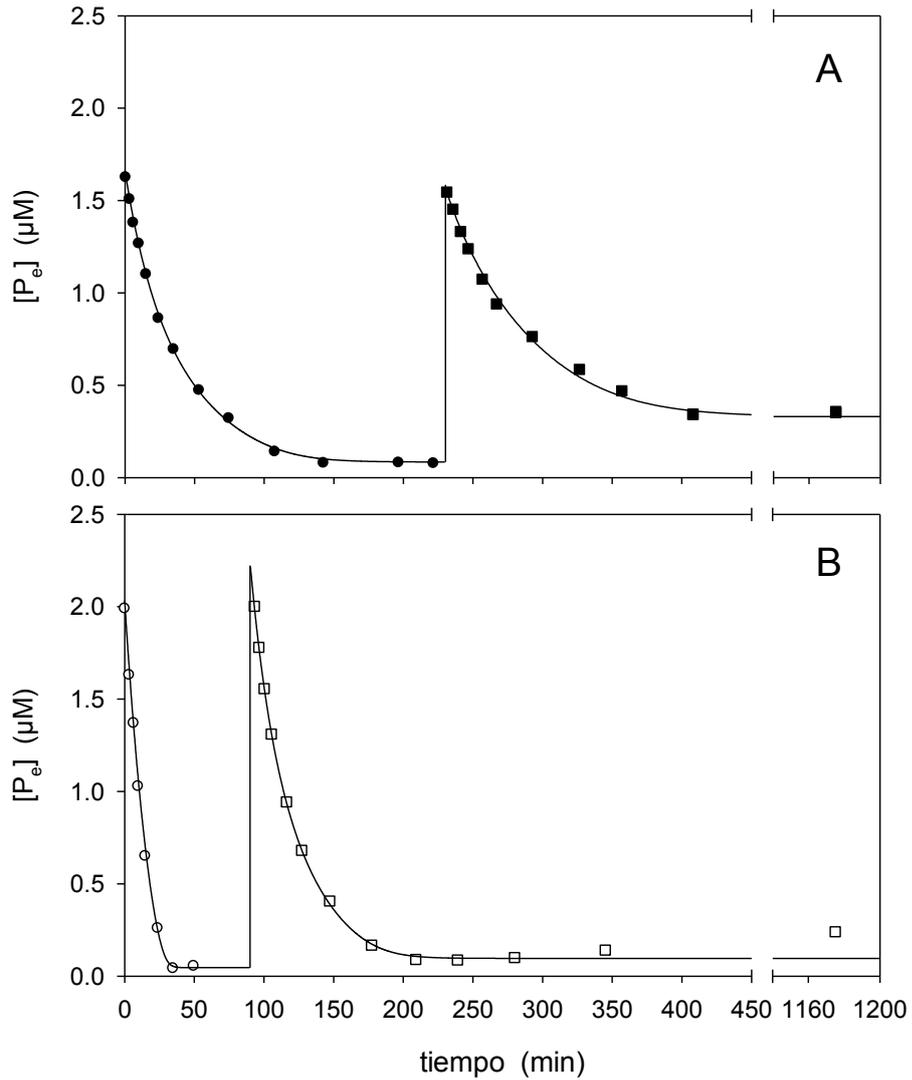


Figura 3-10. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$  y  $S_2$ ) obtenidas del Lago Rodó. El pretratamiento consistió en 10 pulsos de  $1\ \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de  $10\ \mu\text{M}$  a  $S_2$ . A: Remoción de 2 pulsos de  $1.6\ \mu\text{M}$  fosfato por el fitoplancton de la submuestra  $S_1$  a  $t = 300\ \text{min}$  del agregado de los pulsos iniciales. Las curvas representan el mejor ajuste computado con la ecuación no lineal ( $m = 5$ ), con los parámetros: primer pulso:  $L_p = 4.4 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $L = 0.15 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.085\ \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9994$ ; segundo pulso:  $L_p = 8.8 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $L = 1.0 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.330\ \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9967$ . B: Remoción de 2 pulsos de  $2\ \mu\text{M}$  fosfato por el fitoplancton de la submuestra  $S_2$  a  $t = 300\ \text{min}$  del agregado de los pulsos iniciales. Las curvas representan el mejor ajuste computado con la ecuación no lineal ( $m = 5$ ), con los parámetros: primer pulso:  $L_p = 0.021\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $L = 0.05 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.046\ \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9990$ ; segundo pulso:  $L_p = 0.007\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $L = 0.2 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.096\ \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9995$  (último punto excluido del ajuste).

la submuestra  $S_1$ , mientras que a  $S_2$  se le aplicó una única adición de  $10\ \mu\text{M}$ . Luego de incorporar el  $[^{32}\text{P}_e]$  adicionado, el fitoplancton de ambas submuestras alcanzó la misma concentración umbral ( $[P'_e]_A = 0.027 \pm 0.003\ \mu\text{M}$ ,  $0.026 \pm 0.005\ \mu\text{M}$ ;  $S_1$  y  $S_2$  respectivamente). En el primer pulso comparativo agregado a cada submuestra se amplificaron las diferencias: el  $L_p$  del fitoplancton de  $S_1$  fue casi cinco veces inferior al de  $S_2$  (GLM-ANCOVA,  $p < 0.01$ ), aunque la concentración umbral sufrió un incremento no significativo ( $S_1$ :  $[P_e]_A = 0.085\ \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $IC_{99\%} = \pm 0.037\ \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $[P_e]_A = 0.046\ \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $IC_{99\%} = \pm 0.064\ \mu\text{M}$ ) (Fig. 3-10). Para aplicar la segunda adición fue necesario esperar a que el fitoplancton de  $S_1$  alcanzara el valor umbral, debido a que la tasa de incorporación fue marcadamente inferior. Nuevamente, las diferencias entre ambas submuestras

se amplificó significativamente: el  $[P_e]_A$  del fitoplancton de  $S_1$  resultó ser tres veces mayor al alcanzado por  $S_2$  ( $S_1$ :  $[P_e]_A = 0.330 \mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$  fosfato,  $IC_{99\%} = \pm 0.070 \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $[P_e]_A = 0.096 \mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$  fosfato,  $IC_{99\%} = \pm 0.043 \mu\text{M}$ ) (Fig. 3-10A), a pesar de que  $S_2$  también incrementó  $[P_e]_A$  en menor medida y redujo su  $L_p$  de un pulso al siguiente (Fig. 3-10B). Este alto valor umbral de fosfato de la comunidad de fitoplancton en  $S_1$  se mantuvo por más de 10 horas. La relación  $J_p$  vs  $\log [P_e]$  mostró una importante disminución del flujo de fosfato entre el primer y segundo pulso de  $S_2$  (Fig. 3-11, curvas A y B), mientras que el  $J_p$  inicial en  $S_1$  fue incluso inferior (Fig. 3-11, curvas C y D). Las diferencias entre los  $L_p$  del primer y segundo pulso en  $S_1$  y  $S_2$  fueron altamente significativas (GLM-ANCOVA,  $p < 0.01$ ; Fig. 3-11). En este experimento se observó una modificación cinética y energética similar a la observada en experimentos anteriores, con un alto valor umbral constante por un período prolongado, como resultado de la diferencia en los patrones de los pulsos previos. En contraste con el experimento anterior, la comunidad de fitoplancton utilizada en las submuestras estuvo co-dominada, aunque con un mayor  $B_T$  correspondiente a *R. mediterranea*, a pesar de lo cual se obtuvo esencialmente la misma respuesta en la cinética de incorporación.

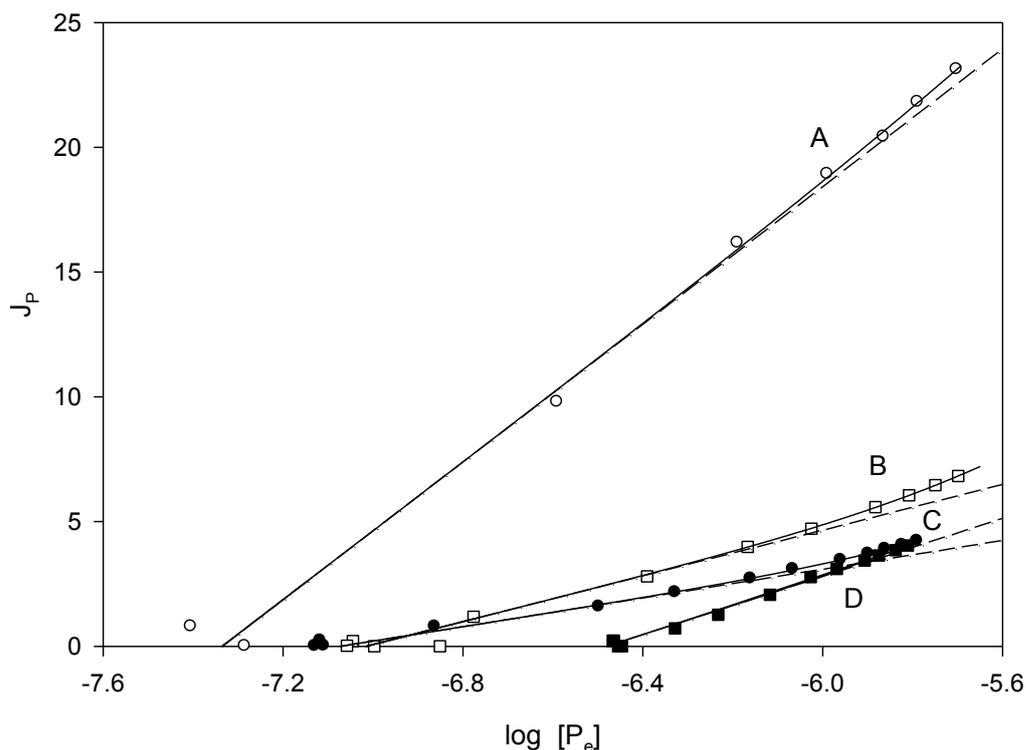


Figura 3-11. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 3-10. A y B: primer y segundo pulso de  $2 \mu\text{M}$  aplicados a la submuestra  $S_2$ , respectivamente; C y D: primer y segundo pulso de  $1.6 \mu\text{M}$  aplicados a la submuestra  $S_1$ , respectivamente. La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol Pi (mg Clo a h)}^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

## Discusión

### Flexibilidad de las propiedades cinéticas y energéticas de incorporación de fosfato

Los resultados presentados aquí muestran la primera evidencia directa de la capacidad de alterar la cinética de incorporación de fosfato por comunidades naturales de fitoplancton frente a incrementos del nutriente. Esta respuesta cinética de los organismos refleja una interdependencia compleja entre célula, comunidad y ambiente. Este comportamiento cinético fue demostrado en cultivos de la cianobacteria unicelular *Anacystis nidulans* (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995, Wagner et al. 2000) y de la filamentosa *Anabaena variabilis* (Falkner & Falkner 2003, Falkner et al. 2006). Asimismo, este fenómeno fue utilizado para interpretar las variaciones temporales de los parámetros cinéticos y energéticos del fitoplancton en el Lago Rodó (Aubriot et al. 2000). Estos cambios cinéticos fueron identificados como propiedades adaptativas de la cianobacteria *A. nidulans* y *A. variabilis*, y catalogados como "estados adaptados", o lineales, y "modos de operación adaptable", o no lineales (Falkner & Falkner 2000, Plaetzer et al. 2005, Falkner et al. 2006). Los primeros surgen de un proceso adaptable previo y resultan en un estado estable intermedio, el cual puede ser descrito con parámetros objetivos a partir de estudios con condiciones experimentales definidas (Falkner et al. 2006), como por ejemplo en lagos (Istvánovics & Herodek 1995, Aubriot et al. 2000, Capítulo 2). Los modelos utilizados en el presente trabajo sugieren que la alteración de la cinética de incorporación ocurrió generalmente en dos etapas: primero, se produjo una reducción del coeficiente de conductividad ( $L_p$ ) durante la fase inicial, mientras que el valor umbral permaneció relativamente constante. En una segunda etapa, el fitoplancton aumentó el valor umbral de fosfato concomitantemente con un nuevo ajuste de  $L_p$ , frente a un nuevo estímulo externo. En la mayoría de los casos estudiados, este nuevo valor de  $L_p$  resultó mayor al precedente, aunque de menor magnitud que el resultante de la condición inicial. A pesar del aumento de  $L_p$ , la tasa de incorporación ( $J_p$ ) fue sucesivamente menor o igual a medida que se produjeron nuevos incrementos de  $[P_e]$ . En este trabajo se obtuvieron respuestas diferentes entre experimentos en los que la concentración de fosfato aplicada fue la misma. Por lo tanto, estos resultados indican que la concentración de fosfato no sería el factor desencadenante de la respuesta cinética.

El tiempo de exposición de los organismos a una concentración elevada de fosfato (cuantificada por  $t_E$ ) aparece en este estudio como el principal factor asociado con el incremento del valor umbral. Si la incorporación ocurre rápido, por ejemplo en un  $t_E$  menor a 50 min (ver Fig. 3-1, 3-3, 3-6, 3-8 y 3-12), la respuesta cinética no se producirá. A su vez, la magnitud de  $t_E$  dependerá de la tasa de remoción del incremento externo de fosfato (Falkner et al. 1996). Este tiempo de exposición sería necesario para permitir una disminución en el grado de acoplamiento entre el proceso de incorporación y la fuente de energía requerida para esa reacción (Wagner et al. 1995, Falkner et al. 1996). Este sería el caso, cuando el fitoplancton muestra una baja actividad de incorporación debido a una menor deficiencia por el nutriente o a una menor concentración de organismos en suspensión, la concentración externa decrece más lento y permite la respuesta fisiológica. Estudios de laboratorio demostraron que, luego de la limitación del crecimiento causada por la deficiencia por fosfato, se induce la síntesis de un tipo de proteína con una alta actividad enlazadora de fosfato (Wagner et al. 1994). Experimentos realizados por Falkner et al. (1998) con una cepa mutante de *A. nidulans* (*Synechococcus* sp. PCC 7942) carente de esta proteína del

sistema de alta afinidad de incorporación de fosfato, mostraron que esta cianobacteria aún incorpora fosfato a bajas concentraciones externas aunque no posee la capacidad de adaptarse a los incrementos en la concentración del nutriente. Debido a este factor, se obtuvieron respuestas opuestas bajo similares condiciones experimentales (ver Fig. 3-6 y 3-8). La rápida incorporación de los pulsos espaciados y de baja concentración no permitió que los sistemas de incorporación se ajustaran a la concentración externa, mientras que el fitoplancton de la submuestra paralela experimentó concentraciones sobre el valor umbral por un lapso mayor a 100 min (Fig. 3-6). En contraste, la velocidad de disminución de un pulso de concentración micromolar (ej.: 5  $\mu\text{M}$  fosfato) no provocó una respuesta tan considerable como lo hizo la sucesión de incrementos de corta frecuencia, debido a un mayor  $t_E$  a la concentración elevada (Fig. 3-1 y 3-8). Por lo tanto, se hipotetiza que esta respuesta estaría asociada con el tiempo de exposición del fitoplancton a la concentración de fosfato externo sobre el valor umbral.

En un ambiente en el cual ocurren incrementos intermitentes y por períodos cortos en la concentración externa de fosfato sobre el valor umbral, parecería útil para los organismos poder incorporar el nutriente a una tasa alta. Sin embargo, si la concentración externa excede el valor umbral por un tiempo prolongado, debido a un aumento significativo de la concentración o a una sucesión de incrementos, los sistemas de incorporación pueden ajustarse transitoriamente a esta nueva condición nutricional, de forma tal que la asimilación del fosfato satisface los requerimientos del crecimiento (Wagner et al. 2000, Plaetzer et al. 2005). Esto es posible si el aumento del valor umbral es acompañado de una disminución en el grado de acoplamiento entre el sistema de transporte y la ATP-asa (Falkner et al. 1994). De acuerdo a los principios de la termodinámica de procesos irreversibles, la dependencia lineal entre la tasa de reacción y las fuerzas impulsoras debe ser válida cercana al equilibrio. La ecuación lineal aplicada a regímenes alejados del equilibrio se explica a través de un ajuste de la constante de Michaelis del sistema de incorporación de alta afinidad al valor umbral, de modo que ambos parámetros deberían poseer el mismo orden de magnitud (ver Introducción General, Consideraciones teóricas) (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995). En este sentido, Aubriot et al. (2000) mostraron que las curvas de remoción de fosfato por las comunidades de fitoplancton se ajustan destacablemente bien a la relación lineal de flujo-fuerza. Sin embargo, cuando se incrementó la concentración externa a rangos micromolares, de forma tal que provocó un cambio cinético, generalmente se observó una desviación normalmente pequeña de la linealidad (ej.: Fig. 3-11). De acuerdo a la intensidad del estímulo, esta relación no lineal fue más pronunciada durante el transcurso de la alteración cinética y tendió a linealizarse a medida que se consolidaron las nuevas propiedades de incorporación. Contrariamente, el fitoplancton que mantuvo sus propiedades relativamente constantes frente al primer estímulo, mostró una mayor aproximación a la linealidad inicial y tendió a alejarse de ésta en los pulsos sucesivos. Sin embargo, en la amplia mayoría de los casos fue posible describir el fenómeno mediante el mismo tipo de formulación cuantitativa. El tiempo de exposición  $t_E$  fue el principal factor para explicar el desencadenamiento de la respuesta cinética. El  $t_E$  resumió un conjunto de eventos que involucraron la magnitud de los cambios de la concentración externa de fosfato y la persistencia de estos incrementos en el medio, este último influido por la actividad de incorporación de la propia comunidad de fitoplancton.

### Importancia ecológica de la adaptación a las fluctuaciones de fosfato

La teoría de competencia por recursos sostiene que los recursos compartidos serán agotados por el consumo por el mejor competidor (Hardin 1960, Tilman 1982), lo que lleva a la dominancia final de una especie en la comunidad. No obstante, la alta diversidad de la comunidad de fitoplancton que crece en ambientes aparentemente homogéneos y estables, indicaría una baja competencia por recursos, contradicción que se denominó "paradoja del plancton" (Hutchinson 1961). Desde entonces se han propuesto varias soluciones para esta "paradoja", relacionadas con variaciones ambientales, perturbaciones intermedias y factores bióticos (Huisman & Weissing 1999, 2000, 2001). Sin embargo, algunas críticas plantean que el aspecto invariable de los modelos propuestos es la fisiología de los organismos en cuestión (Reynolds 1998, Falkner & Falkner 2000, Huisman et al. 2001). Al respecto, Huisman et al. (2001) mostraron que se logra un aumento de la diversidad prevista cuando se incluyen en los modelos varias especies que alternan sus propiedades fisiológicas entre los grupos coexistentes. En general los modelos disponibles en la literatura permiten la coexistencia de pocos competidores extras, a diferencia de las cientos de especies presentes en lagos. Por lo que, una teoría universalmente aceptada que explique la diversidad del fitoplancton es hasta el presente un objetivo inalcanzable (Roy & Chattopadhyay 2007).

Los resultados del presente estudio contradicen el concepto de exclusión competitiva por agotamiento del recurso, por dos aspectos empíricos: primero, por la existencia de valores umbrales en el ambiente, y segundo, porque la alteración cinética sugiere una convergencia comportamental de los organismos, en la cual un ensamblaje de poblaciones deficientes por fosfato alcanza un estado fisiológico en el que incorporan menos nutriente limitante del que potencialmente podrían acumular. Asimismo, los valores umbrales altos y persistentes mostrados en este estudio reflejarían una coherencia de la alteración cinética por la comunidad de fitoplancton (Aubriot et al. 2000, Wagner et al. 2000). Dos evidencias empíricas propuestas por Aubriot et al. (2000) y Wagner et al. (2000) apoyan esta suposición: primero, si una comunidad esta constituida de organismos con diferentes valores umbrales, los organismos deberían tener la capacidad de prevenir el reflujó del fosfato almacenado cuando la concentración externa disminuye por debajo de su valor umbral. De no ser así, se producirá una transferencia de fosfato hacia los organismos con el valor umbral más bajo (Wagner et al. 2000) y por lo tanto, la cinética resultante debería ser más compleja y no podría ajustarse a la ecuación semilogarítmica simple empleada (Aubriot et al. 2000). Segundo, si una porción de la comunidad no responde coordinadamente al incremento externo del nutriente mediante el aumento del valor umbral, la concentración retornará finalmente hasta el valor inicial previo al incremento, aunque a una menor tasa al final del curso temporal. Por esta razón el valor umbral siempre representa el mínimo valor alcanzable por un conjunto de organismos y no representa un promedio estadístico de los umbrales de las especies presentes (Wagner et al. 2000).

En el presente estudio, los cambios cinéticos no se asociaron con la composición de la comunidad de fitoplancton, observándose el incremento del valor umbral tanto en una comunidad diversa formada por organismos eucariotas de varios grupos y cianobacterias (Fig. 3-1), como en comunidades dominadas por una o dos especies de cianobacteria. En este último caso, se pudieron observar comportamientos adaptativos en fitoplancton dominado por *Planktothrix agardhii* ( $B_T = 93-99\%$ ), así como en casos de co-dominancia con *Raphidiopsis mediterranea* (Fig. 3-3). Asimismo, la misma capacidad de respuesta se observó en experimentos con predominio de *R.*

*mediterranea* sobre *P. agardhii* (Fig. 3-10). Por lo tanto, se hipotetiza que el comportamiento adaptativo de incorporación de fosfato no se asocia con la composición de la comunidad y podría ser una propiedad extendida en el fitoplancton.

Para profundizar en el análisis de las respuestas cinéticas, se simuló la incorporación de fosfato por una comunidad de fitoplancton utilizando el modelo uniespecífico reciente de Plaetzer et al. (2005). Este modelo fue modificado en la presente tesis, a través de la programación en el lenguaje de PSpice (OrCAD), para lograr la conexión de los metabolismos de tres especies algales al mismo recurso externo, en el cual el valor de  $L_p$  reflejó la tasa de remoción relativa a la biomasa y los valores umbrales fueron conferidos de forma proporcional e inversa al  $\Delta pH$  de la membrana tilacoide (ver Apéndice 1 por más detalles) (Fig. 3-12). En el primer caso (Fig. 3-12A y B), la primera especie (sp1) se caracterizó con una biomasa (73%), una tasa de remoción del fosfato externo dominante y una capacidad de alcanzar valores umbrales altos; la segunda especie (sp2) con una biomasa (24.5%) y valores umbrales intermedios, y la tercera especie representada por menos biomasa (2.5%) y mayor eficiencia para alcanzar valores umbrales bajos (rango nanomolar). La simulación resultó en una cinética de incorporación compleja, en la cual se alcanzó finalmente un valor umbral mínimo correspondiente a sp3 (Fig. 3-12A). En la Figura 3-12B se representa la formación de reservas de polifosfato intracelular y refleja la posibilidad de sobrevivencia en el medio. En este caso, la especie sp3 excluye a corto plazo a las coexistentes debido a la constante pérdida y transferencia de P intracelular desde las dominantes ( $P_i$ ). En el segundo ejemplo (Fig. 3-12C y D) se atribuyeron las mismas características de biomasa y tasa de remoción de fosfato a cada especie, con la diferencia que se incluyó el mismo valor de  $\Delta pH$ . La curva de remoción resultante fue uniforme y estable con respecto al valor umbral (Fig. 3-12C). Esta condición metabólica permitió que las tres especies obtuvieran polifosfato de forma equivalente a su biomasa, sin la ocurrencia de extinción a corto plazo. Este tipo de curvas de remoción neta de fosfato son las usualmente obtenidas en comunidades de fitoplancton, cuando las condiciones experimentales permiten reflejar la situación previa de crecimiento en el lago (Aubriot et al. 2000, Capítulo 2). Por lo tanto, en el escenario de este modelo, puede concluirse que, de no existir modificación de las propiedades cinéticas, las especies de fitoplancton coexistentes deben necesariamente compartir el mismo valor umbral para evitar su rápida exclusión del ecosistema acuático.

Para simular el proceso adaptativo a los incrementos de concentración externa se utilizaron ramificaciones condicionales tal como fueron usadas en el modelo de Plaetzer et al. (2005), aplicados al caso de tres especies coexistentes (Fig. 3-13). Los pequeños incrementos del valor umbral pueden ser explicados por un incremento en la concentración de fosfato citoplasmático, durante la cual la conversión de energía en la membrana puede mantenerse inalterada (Wagner et al. 2000). Sin embargo, cuando ocurren cambios dramáticos del valor umbral se asumirían concentraciones citoplasmáticas de fosfato irreales, requiriendo de modificaciones fisiológicas adicionales, como una disminución del acoplamiento indirecto entre la traslocación de fosfato y la hidrólisis de ATP (Wagner & Falkner 1992, Plaetzer et al. 2005). Se utilizaron propiedades de incorporación de fosfato inicialmente diferentes para cada especie, pero con la posibilidad de que a un tiempo dado de exposición las tres especies puedan "monitorear" la concentración externa de fosfato y compararla con la concentración de ATP intracelular. Si al tiempo predeterminado la concentración externa es mayor a la concentración de ATP, disminuyen el gradiente de pH de la

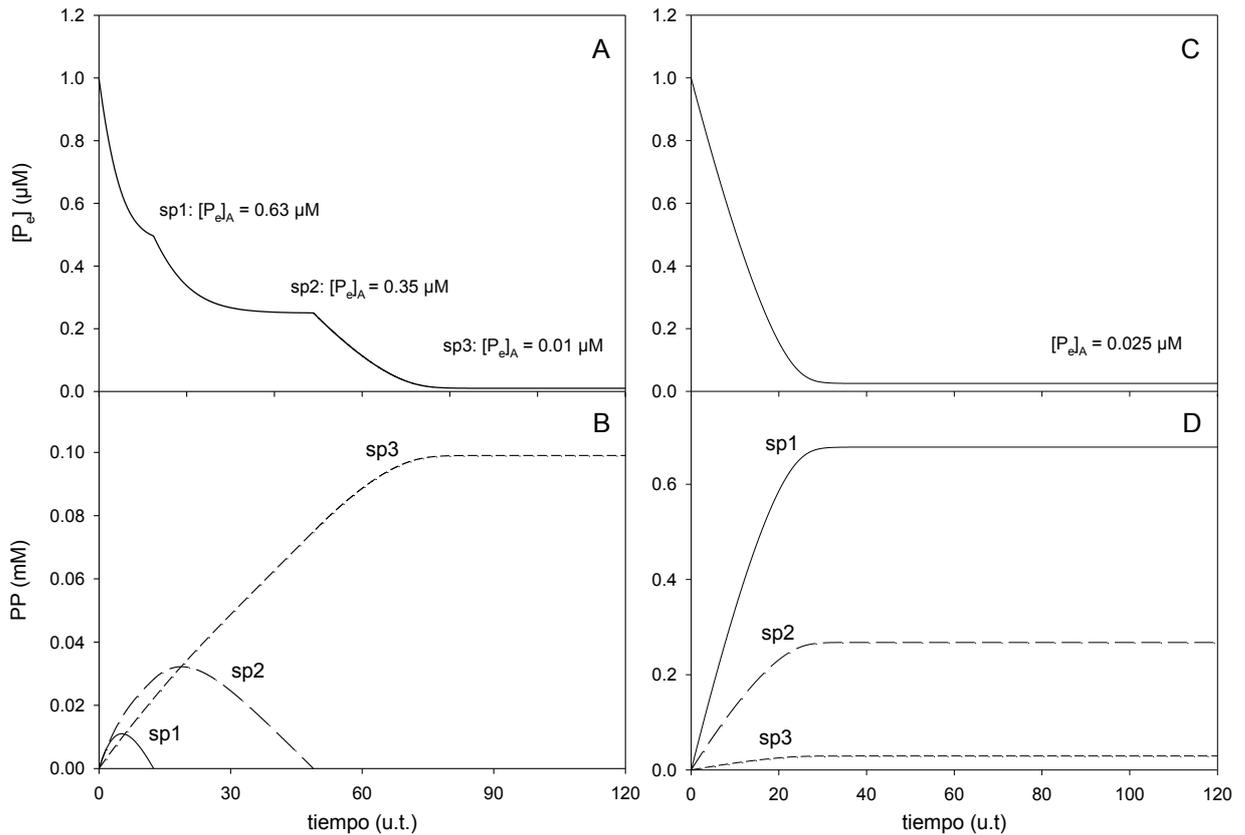


Figura 3-12. Simulación del transcurso de la remoción de fosfato del medio externo por dos comunidades de fitoplancton compuesta cada una de tres especies (sp1, sp2 y sp3) y con propiedades de incorporación combinadas. Izquierda: A: sp1, representada con una biomasa dominante (73%), mayor aporte a la tasa de remoción y capacidad de alcanzar umbrales altos (0.63  $\mu\text{M}$ ); sp2, con una biomasa intermedia (24.5%), aporte intermedio a la tasa de remoción y valores umbrales medios (0.35  $\mu\text{M}$ ); sp3, representada con una menor biomasa (2.5%) y capacidad de alcanzar umbrales muy bajos (0.01  $\mu\text{M}$ ). B: Transcurso de la formación de polifosfato intracelular en cada especie durante la remoción de fosfato en A. Para la simulación se usaron los siguientes parámetros: sp1:  $L_p = 3.0 \cdot 10^{-6}$ ,  $\Delta\text{pH} = 2.2$ ; sp2:  $L_p = 1.0 \cdot 10^{-6}$ ,  $\Delta\text{pH} = 2.45$ ; sp3:  $L_p = 0.1 \cdot 10^{-6}$ ,  $\Delta\text{pH} = 4.0$ . Derecha: C: Tres especies con las mismas biomásas y actividad de incorporación representadas anteriormente pero con la capacidad de alcanzar el mismo valor umbral (0.025  $\mu\text{M}$ ). D: Transcurso de la formación de polifosfato intracelular en cada especie durante la remoción de fosfato en C. Para la simulación se usaron los siguientes parámetros: sp1:  $L_p = 3.0 \cdot 10^{-6}$ ,  $\Delta\text{pH} = 3.6$ ; sp2:  $L_p = 1.0 \cdot 10^{-6}$ ,  $\Delta\text{pH} = 3.6$ ; sp3:  $L_p = 0.1 \cdot 10^{-6}$ ,  $\Delta\text{pH} = 3.6$ . El tiempo de exposición en el eje x esta expresado en unidades de tiempo apropiadas para el funcionamiento del programa y pueden ser comparadas con datos experimentales cuando 1 u.t. = 1 min.

membrana tilacoide ( $\Delta\text{pH}$ ) y, si el  $[P_e]$  es menor, mantienen las propiedades anteriores más activas (estado inicial adaptable). El resultado de este proceso es que las tres especies alteran su cinética de incorporación de acuerdo a la permanencia de una alta concentración durante un tiempo dado, mediante la disminución de la velocidad de remoción (Fig. 3-13A, línea continua). Esto permite a los organismos alcanzar un valor umbral mayor o igual al de la especie con el valor más alto (estado final adaptado). De no ocurrir el monitoreo de la concentración exterior, la remoción resultante tiende a alcanzar el valor umbral mínimo (Fig. 3-13A, línea punteada) y a la consiguiente extinción de las dos especies con mayor biomasa (Fig. 3-13B). De acuerdo al escenario planteado en el modo adaptativo del modelo modificado, los cambios de la concentración externa dependen de la actividad de incorporación de la comunidad de fitoplancton, los cuales son la referencia externa que tienen las poblaciones para modificar sus propiedades cinéticas. Considerando que el monitoreo de la concentración exterior se realiza probablemente en varios intervalos de tiempo durante el curso de la remoción del fosfato, el proceso observado aquí resulta

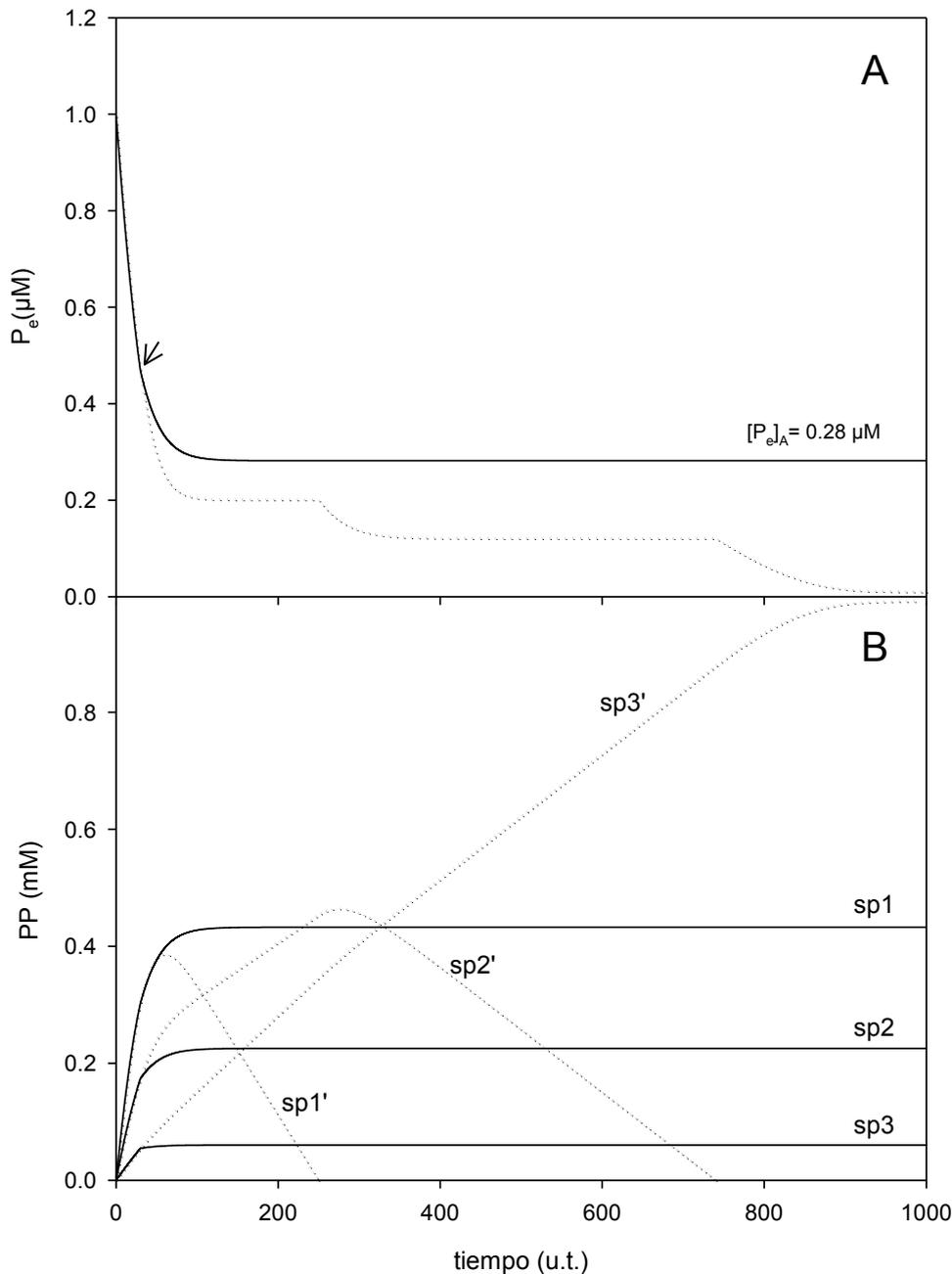


Figura 3-13. A: Simulación del transcurso de la remoción de fosfato del medio externo por una comunidad de fitoplancton compuesta de tres especies (sp1, sp2 y sp3) con las mismas biomazas y tasas de incorporación que las usadas en la Figura 3-12. A: Línea continua: los parámetros iniciales fueron: sp1:  $\Delta\text{pH} = 2.6$ ; sp2:  $\Delta\text{pH} = 2.8$ ; sp3:  $\Delta\text{pH} = 4.0$ . La flecha indica el intervalo  $t = 30$  u.t. (unidades de tiempo) de la ramificación condicional: *es tiempo <30?*  $\rightarrow$  si: usar valores iniciales, no: *es  $[P_e] > a$  los moles de ATP hidrolizado por moles de fosfato activamente transportado a través de la membrana celular?*  $\rightarrow$  si: usar nuevos  $\Delta\text{pH}$ , no: usar  $\Delta\text{pH}$  iniciales. Parámetro nuevo:  $\Delta\text{pH} = 2.55$ , para las 3 especies. Se indica en la Figura el valor resultante de  $[P_e]_A$ . Línea punteada: Simulación realizada con los mismos parámetros anteriores y sin usar la ramificación condicional. B: Transcurso de la formación de polifosfato intracelular en cada especie durante la remoción de fosfato en A, para el caso con y sin ramificación condicional (líneas continuas y punteadas respectivamente).

en un mutuo ajuste cinético y energético basado en los cambios que cada población produce en su medio. Asimismo, debido a que las respuestas cinéticas están asociadas al tiempo de exposición del fitoplancton a la concentración externa, el cual es modificado por la actividad de la propia comunidad, ésta podría funcionar como un "sistema autorreferencial" (Falkner et al. 1996). Esta cinética adaptable refleja una gran interdependencia entre los microorganismos, la comunidad y el ambiente. Consecuentemente, se puede concluir a partir del modelo modificado que la comunidad

de fitoplancton se adapta de forma conjunta a los incrementos de fosfato externo debido a que el aumento del valor umbral se produce previo a colmar su capacidad de incorporación, y que este alto valor puede ser mantenido estable por el fitoplancton por un período prolongado (Fig. 3-8 y 3-10). Por lo tanto, la utilización del fosfato durante la adaptación no está caracterizada por la necesidad de acumular la mayor proporción de fosfato posible, sino que estaría relacionada con la utilización del nutriente disponible de la forma energéticamente más eficiente.

Este nuevo estado adaptado en el cual el fosfato externo es incorporado con mayor eficiencia debería reflejarse en la tasa de crecimiento. Wagner et al. (2000) demostraron que las respuestas a las adiciones de fosfato en *A. nidulans* desencadena alteraciones en la distribución de los pesos moleculares de los compuestos de carbono almacenados, aumentando la proporción de compuestos de bajo peso molecular los que son rápidamente utilizables (Wagner et al. 2000). Se ha demostrado que este tipo de fenómeno tiene efectos sobre las tasas de crecimiento de cepas aisladas de *A. nidulans* (Wagner et al. 2000). Por tal motivo, el alcance a largo plazo del estado adaptado y sus consecuencias en el crecimiento fitoplanctónico son investigados en el siguiente capítulo.

## Persistencia a largo plazo de las alteraciones cinéticas de incorporación de fosfato por fitoplancton y su influencia en la tasa de crecimiento

---

### Introducción

Uno de los aspectos fundamentales de investigación en ecología acuática refiere al estudio de las ventajas adaptativas que permiten a los organismos obtener los recursos necesarios para sustentar el crecimiento y cómo la interacción entre poblaciones influye en la estructura de la comunidad (Reynolds 1997). Bajo condiciones naturales de crecimiento deficiente por fosfato, el fitoplancton debe sobrellevar fluctuaciones significativas de la concentración externa del nutriente. Debido a la activa incorporación de fosfato, la concentración de este nutriente en lagos decrece hasta concentraciones nanomolares (Rigler 1956, Hudson et al. 2000). La concentración externa límite que los organismos alcanzan incorporar dependerá de sus propiedades energéticas, debido a que solamente pueden superar el gradiente de concentración cuando el fosfato externo sobrepasa cierto valor (Falkner et al. 1989, Falkner et al. 1996, Wagner et al. 1995). En esta situación, la incorporación de fosfato se detendrá a un valor estacionario o concentración umbral, el cual dependerá del grado de acoplamiento entre el proceso de incorporación y la energía disponible para impulsarlo (Falkner et al. 1989). En lagos, la concentración de fosfato puede alcanzar rápidamente valores altos, por ejemplo, por la excreción del zooplancton, peces o la liberación del nutriente del sedimento. Bajo estas condiciones, el crecimiento continuo es posible cuando los organismos poseen un sistema de incorporación que les permita una rápida respuesta para incorporar el fosfato de una forma energéticamente favorable (Falkner et al. 1996). Esta propiedad cinética de los sistemas de incorporación de los organismos será decisiva para determinar la tasa a la cual un incremento transitorio es utilizado por cada organismo. En estos casos, el fosfato es almacenado predominantemente como polifosfato para permitir el crecimiento durante períodos de escasez del recurso (Kulaev & Vagabov 1983). Debido a que la utilización de un mismo recurso por varias especies impone ciertas restricciones, el poseer una alta velocidad de incorporación y/o una mayor capacidad de almacenamiento del nutriente, son considerados factores decisivos para determinar la exclusión del competidor debido al agotamiento del recurso por parte de la especie dominante (ej.: Tilman 1982, Sommer 1999, Ducobu et al. 1998, Fu et al. 2005). Otros autores

sugieren que los organismos exitosos deben necesariamente poseer una fisiología flexible que les permita adaptarse a la variabilidad ambiental a pequeña escala (Reynolds 1998). En esta línea, estudios determinaron que la cianobacteria unicelular *Anacystis nidulans* y la filamentosa *Anabaena variabilis* poseen la capacidad de adaptarse fisiológicamente a un patrón de incrementos de fosfato de forma energéticamente favorable (Falkner et al 1989, Wagner et al 1995, Falkner & Falkner 2003). Esta adaptación consiste en la alteración de los parámetros energéticos y cinéticos hasta alcanzar nuevas propiedades uniformes de incorporación, las cuales ocurren independientemente de la cantidad de fosfato almacenado (Wagner et al. 1995, Falkner et al. 1995). En un estudio previo en lagos se determinó que la cinética de incorporación y los valores umbrales de fosfato del fitoplancton variaron asociados a cambios en el aporte de fosfato (Aubriot et al. 2000). En el Capítulo 3 se mostró que estos cambios cinéticos se deben a adaptaciones fisiológicas (entendidas en los términos de Begon et al. 1990 y Falkner et al. 1996) de la comunidad de fitoplancton a los incrementos en la concentración externa de fosfato. Por lo tanto, dos evidencias surgidas del Capítulo 3 cuestionan la validez del principio de exclusión competitiva: i) la existencia de valores umbrales variables en el ambiente y ii) que el evento adaptativo implica que un ensamblaje de poblaciones deficientes por fosfato pueden alcanzar un estado fisiológico en el cual incorporan menos nutriente limitante del que potencialmente pueden acumular. En el presente capítulo investigamos la persistencia a largo plazo de las respuestas cinéticas a diferentes patrones de fluctuaciones de fosfato y cómo esta nueva propiedad fisiológica influye en la tasa de crecimiento de fitoplancton natural. Los resultados con cultivos de cianobacterias determinaron que las alteraciones cinéticas confieren ventajas energéticas, debido a que los organismos incorporan el fosfato con una mayor eficiencia lo que debería reflejarse en un mayor crecimiento posterior (Wagner & Falkner 1992, Falkner et al. 1996, Wagner et al. 2000, Falkner & Falkner 2003). Estos resultados se discuten en relación a la noción de competencia por nutrientes y al rol del comportamiento cinético adaptable en la proliferación y sobrevivencia de las poblaciones de fitoplancton.

## Materiales y métodos

Las investigaciones sobre las alteraciones cinéticas de la incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones del nutriente se realizaron en junio de 2003, enero a marzo de 2004 y enero de 2006. Las muestras fueron tomadas del Lago Rodó, Parque Rodó, Montevideo. Los antecedentes del Lago Rodó y sus principales características morfológicas, así como la obtención y procesamiento de las muestras, las mediciones in situ, las determinaciones espectrofotométricas y el análisis cualitativo y cuantitativo de fitoplancton se detallan en Materiales y Métodos del Capítulo 2. La caracterización del sistema por la concentración de los principales nutrientes y clorofila *a* (Clo *a*) se muestra en Materiales y Métodos del Capítulo 3.

### Determinación de la incorporación neta de fosfato

Se tomaron dos submuestras de 50 ml ( $S_1$  y  $S_2$ ) de la misma muestra original de agua del Lago Rodó usada para análisis químico y biológico. La determinación de la incorporación neta de fosfato por fitoplancton en dichas submuestras se realizó de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 2.

Para excluir una respuesta fisiológica al incremento externo de fosfato por la acumulación intracelular del recurso, el tratamiento consistió en la aplicación de la misma concentración total de [ $^{32}\text{P}_e$ ] a las dos submuestras ( $S_1$  y  $S_2$ ), dosificada en dos patrones de pulsos: 5–10 pulsos de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato agregados a  $S_1$  y un único pulso de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato aplicado a  $S_2$ . La remoción del fosfato agregado se siguió hasta el inicio del período de la fase oscura (9 horas). Al día siguiente (entre 15–20 horas luego de iniciado el tratamiento) se determinó la concentración externa de fosfato [ $\text{P}_e$ ] en cada submuestra y se aplicó un pulso de igual concentración a cada submuestra, para comparar la cinética de incorporación y el valor umbral resultante. Dependiendo de la actividad de incorporación, se siguió la remoción de [ $^{32}\text{P}_e$ ] hasta el día siguiente, si es indicado en las figuras correspondientes. Los pulsos de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato correspondieron a un valor superior al 10% del  $\text{P}_T$  de la muestra, luego del primer pulso.

#### Análisis de la cinética de incorporación

Se utilizó la relación flujo-fuerza de Falkner et al. (1989) entre la tasa de incorporación y la fuerza impulsora de ese proceso. La determinación del coeficiente de conductividad ( $L_p$ ) y el valor umbral de fosfato [ $\text{P}_e$ ] $_A$  se muestra en el Capítulo 2. Para el análisis de la dependencia lineal y no lineal de dicha relación se utilizó la expresión completa de la ecuación de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 3. Asimismo, la determinación de los valores umbrales medidos experimentalmente ( $[\text{P}'_e]_A$ ), el tiempo de exposición del fitoplancton al fosfato externo ( $t_E$ ), el regraficado Thellier de los datos de incorporación de fosfato (Thellier 1970) y la confianza del método utilizado se detallan en el Capítulo 3.

#### Incubación de muestras de fitoplancton y determinación del crecimiento

Se tomó una submuestra de la misma muestra original (5–10 l) usada para la determinación de la incorporación de fosfato y se subdividió en 9 réplicas de 350 ml cada una, las que fueron prefiltradas por una red de 80  $\mu\text{m}$  de malla e incubadas con las mismas condiciones de luz y temperatura que las usadas en los experimentos de incorporación de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato. Para prevenir la limitación del crecimiento por disminución de  $\text{CO}_2$  y la sedimentación del fitoplancton, cada réplica fue constantemente burbujeada con aire previamente mezclado con agua Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore) y filtrado con filtros estériles. Las réplicas fueron incubadas en botellas de cultivo con tapa esmerilada. Tres réplicas fueron destinadas como control (C) sin adición de nutrientes, a tres réplicas se le aplicó el mismo tratamiento que a  $S_1$  y a otras tres se les aplicó el tratamiento de  $S_2$ . Los pulsos de concentración se realizaron con fosfato no radiactivo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). El crecimiento se evaluó mediante la concentración de clorofila *a* inicial y final para cada tratamiento. Se tomó una alícuota de 20–30 ml de cada réplica de los tratamientos y se filtraron con un filtro GF/F Whatman (13 mm diámetro) a los intervalos de tiempo indicados por las figuras. Asimismo, se midió la composición relativa de los principales pigmentos fotosintetizadores en alícuotas de 2 ml, mediante la absorbancia in vivo a las respectivas longitudes de onda (430 nm: clorofila, 490 nm: carotenoides, 565 nm: allofocianina, 620 nm: ficoeritrina, 650 nm: ficocianina y 680 nm: clorofila) y la turbidez total en cada réplica (750 nm). Las alícuotas de pigmentos fueron tomadas a los intervalos de tiempo indicados en las figuras. Se aplicó un fotoperíodo de 15 y 9 horas de luz y oscuridad, respectivamente.

## Resultados

### Persistencia y alcance de las nuevas propiedades cinéticas

Para conocer la persistencia y alcance de los cambios cinéticos se aplicó la misma concentración total de [ $^{32}\text{P}_e$ ] a dos submuestras de fitoplancton tomadas del Lago Rodó ( $S_1$  y  $S_2$ ), dosificada en cinco pulsos de  $2 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato agregados a  $S_1$  y un pulso de  $10 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato a  $S_2$  (Fig. 4-1A) para excluir una respuesta fisiológica causada por la acumulación del nutriente. La muestra del Lago Rodó tuvo una biomasa de  $240.3 \pm 1.0 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$  y el biovolumen ( $B_T$ ) de la comunidad de fitoplancton correspondió 94.0% a cianobacterias (75.5% *Planktothrix agardhii*; 17.2% *Raphidiopsis mediterranea*; 1.3% *Planktolyngbya sp.* y 1.0% *Limnothrix sp.*), 5.0 % a dinoflagelados (4.6% *Peridinium sp.*) y criptofitas (0.4% *Cryptomonas ovata*).

El fitoplancton mostró una alta actividad de remoción de fosfato, debido a que incorporó más de 1.5 veces el contenido de  $P_T$  de la muestra ( $P_T = 6.16 \mu\text{M}$  fosfato) en menos de una hora en  $S_1$  (Fig. 4-1A). El tiempo de exposición ( $t_E$ ) a los pulsos aplicados en la submuestra  $S_2$  fue equivalente al de  $S_1$ . La concentración umbral [ $P'_e$ ] $_A$  alcanzada por ambas submuestras luego de los pulsos y posterior a la fase oscura fue esencialmente la misma ([ $P'_e$ ] $_A = 0.055 \pm 0.002 \mu\text{M}$  y  $0.048 \pm 0.007 \mu\text{M}$  fosfato,  $S_1$  y  $S_2$  respectivamente) (Fig. 4-1A). Los subsiguientes pulsos de  $2 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato aplicados en el siguiente día ( $t = 16.5 \text{ h}$ , luego de iniciado el tratamiento) tuvieron un  $t_E$  de 30 min. La cinética y valores umbrales ajustados fueron aproximadamente los mismos entre las submuestras, considerando el solapamiento de los  $\text{IC}_{99\%}$  (Fig. 4-1B). El gráfico Thellier del flujo de incorporación ( $J_p$ ) vs  $\log [P_e]$  obtenidos de la Figura 4-1, muestra la relación lineal entre ambos parámetros (Fig. 4-2), observándose una disminución de  $J_p$  entre los primeros y segundos pulsos en ambas submuestras. En este experimento, no se observaron alteraciones de los valores umbrales entre los pulsos de cada submuestra y entre submuestras, dentro de los rangos de concentración externos aplicados (2.3 veces la concentración de  $P_T$  inicial) y en combinación con la alta actividad de remoción mostrada por el fitoplancton.

Se investigó una muestra de fitoplancton con menor actividad de incorporación de fosfato que la mostrada previamente. Debido a esta menor actividad, se aplicó la mitad de [ $^{32}\text{P}_e$ ] total que la aplicada en el caso anterior ( $5 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}_e$ ] fosfato). La muestra de fitoplancton contuvo  $196.5 \pm 2.0 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$  y estuvo compuesta principalmente por cianobacterias filamentosas *P. agardhii* (biovolumen del taxa,  $B_T = 80.4\%$ ) y *R. mediterranea* ( $B_T = 18.9\%$ ), con el restante biovolumen representado por criptofitas ( $B_T = 0.69 \%$ ). La submuestra  $S_1$  recibió cuatro pulsos de  $1 \mu\text{M}$  y dos de  $0.5 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato, los cuales no fueron enteramente incorporados antes de que se aplicara el siguiente pulso. Esta secuencia de pulsos resultó en un incremento escalonado de la concentración externa hasta la aplicación del último pulso (Fig. 4-3A). En  $S_2$  se produjo una reducción de ca. treinta veces la velocidad lineal inicial de incorporación de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato ( $31.8 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.88$ ,  $n = 4$ ;  $0.95 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.95$ ,  $n = 4$ , tramo inicial y final respectivamente), luego de dos horas de agregado el pulso de  $5 \mu\text{M}$  (Fig. 4-3A). Ambas submuestras alcanzaron valores de [ $P'_e$ ] $_A$  similares en el siguiente día, luego de la fase oscura ([ $P'_e$ ] $_A = 0.313 \mu\text{M}$  y  $0.322 \mu\text{M}$ ,  $S_1$  y  $S_2$  respectivamente). A las 24 horas de haberse iniciado el tratamiento, se aplicaron dos pulsos consecutivos de  $0.4 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}_e$ ] fosfato (Fig. 4-3B). Debido a la baja tasa de incorporación de fosfato por el fitoplancton no se determinaron las concentraciones umbrales ([ $P'_e$ ] $_A$ ). Se observó una disminución de 1.4 veces el  $J_p$  inicial entre  $S_1$  y  $S_2$  durante el primer pulso. Luego de la segunda

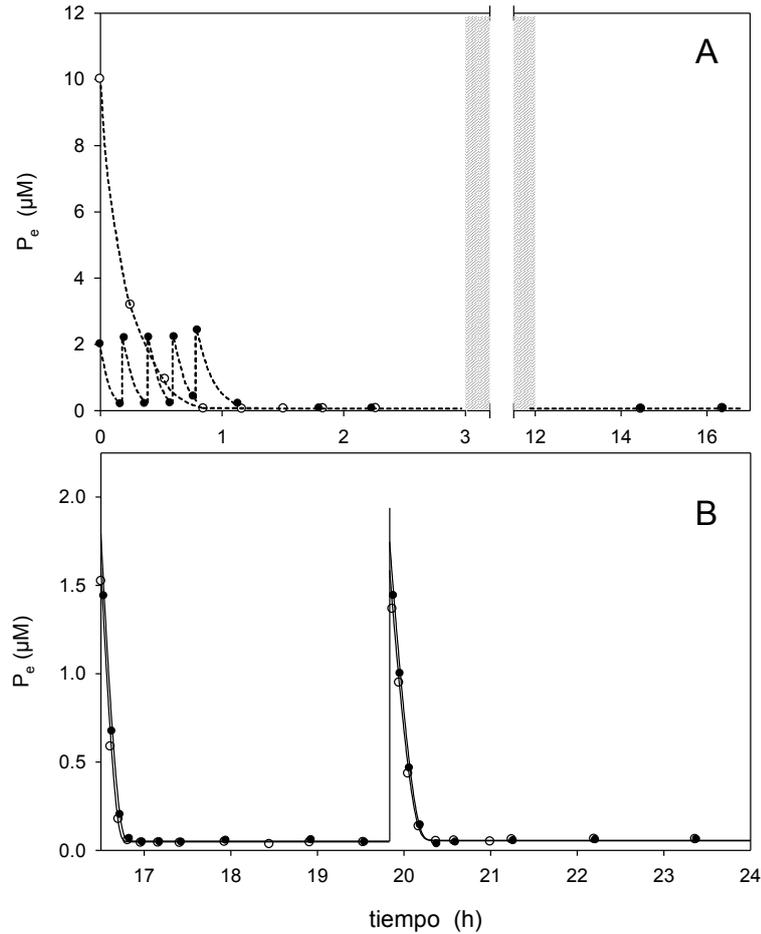


Figura 4-1. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ : símbolos negros y  $S_2$ : símbolos blancos) obtenidas del Lago Rodó. A: pretratamiento de 5 pulsos de  $2 \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de  $10 \mu\text{M}$  a  $S_2$ . Se muestra la concentración inicial y final para cada pulso de  $2 \mu\text{M}$ . Las áreas sombreadas representan el período oscuro de 9 h. B: Comparación de la cinética entre submuestras por el agregado de 2 pulsos consecutivos de  $2 \mu\text{M}$  a cada una, a  $t = 16.5$  h del agregado de los pulsos iniciales en A. Las curvas continuas (B) representan el mejor ajuste computado con la ecuación lineal para cada submuestra independiente, con los siguientes parámetros: primer pulso  $S_1$ :  $L_p = 0.045 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.052 \mu\text{M}$ ,  $IC_{99\%} = \pm 0.025 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9996$ ; primer pulso  $S_2$ :  $L_p = 0.046 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.048 \mu\text{M}$ ,  $IC_{99\%} = \pm 0.044 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9990$ ; segundo pulso  $S_1$ :  $L_p = 0.031 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.054 \mu\text{M}$ ,  $IC_{99\%} = \pm 0.031 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9996$ ; segundo pulso  $S_2$ :  $L_p = 0.031 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.056 \mu\text{M}$ ,  $IC_{99\%} = \pm 0.028 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9996$ .

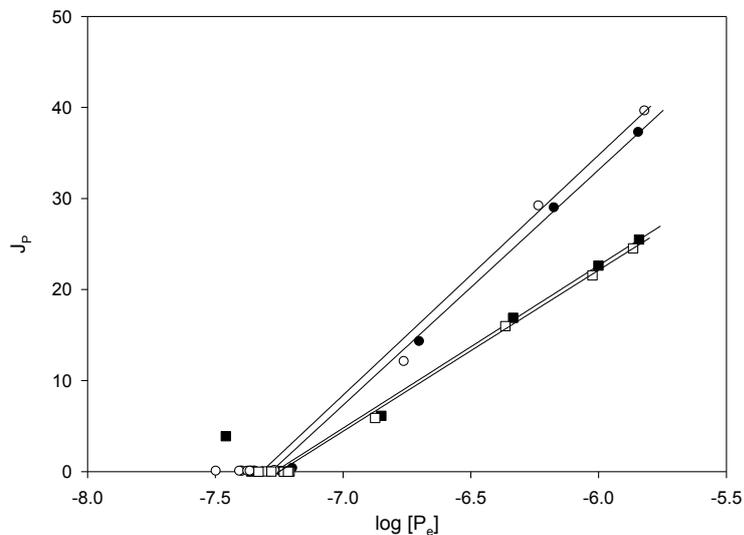


Figura 4-2. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurso de tiempo de la Fig. 4-1 ( $S_1$ : símbolos negros y  $S_2$ : símbolos blancos; círculos: primer pulso, cuadrados: segundo pulso). El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo a h})^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

adición de  $0.4 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato, el fitoplancton de la submuestra  $S_2$  redujo el  $J_p$  casi a la mitad con respecto al pulso anterior y 2.6 veces en comparación con el pulso paralelo en  $S_1$  (Fig. 4-3B). La incorporación en  $S_2$  se detuvo a un alta concentración externa ( $[\text{P}'_e]_A = 0.740 \pm 0.009 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato), mientras que  $S_1$  mantuvo una tasa de incorporación constante. Durante el transcurso del presente experimento se produjo una importante desactivación de la incorporación de fosfato por el fitoplancton, la que fue más acentuada en la submuestra que mostró una desactivación inicial ca. 30 horas antes ( $S_2$ ).

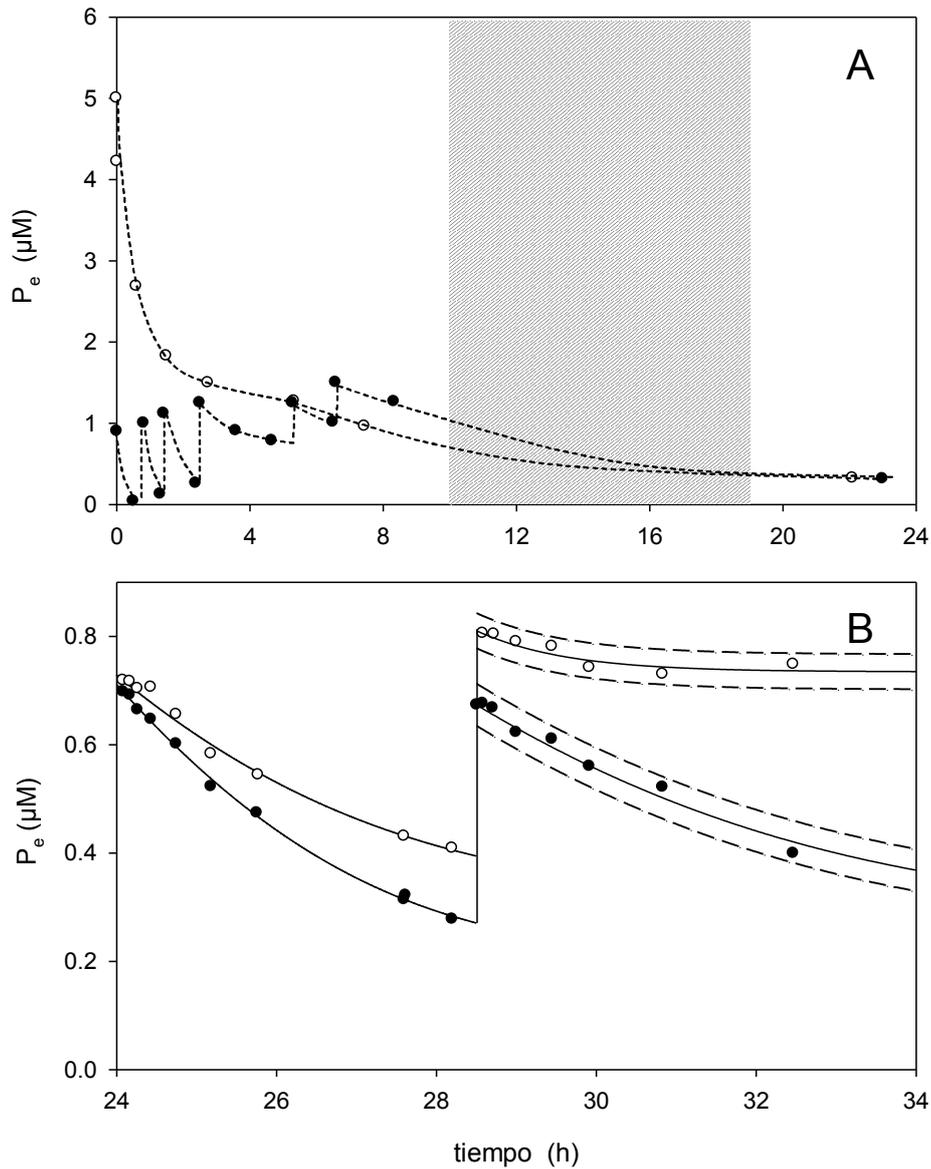


Figura 4-3. Transcurso de la incorporación neta de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ : símbolos negros y  $S_2$ : símbolos blancos) obtenidas del Lago Rodó. A: pretratamiento de 4 pulsos  $1 \mu\text{M}$  y 2 de  $0.5 \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de  $5 \mu\text{M}$  a  $S_2$ . Se muestra la concentración inicial y final para cada pulso de  $1 \mu\text{M}$ . Las áreas sombreadas representan el período oscuro de 9 h. B: Comparación de la cinética entre las submuestras por el agregado de 2 pulsos consecutivos de  $0.4 \mu\text{M}$  a cada una, a  $t = 24$  h del agregado de los pulsos iniciales en A (notar que la concentración inicial es igual al [ $^{32}\text{P}$ ] agregado más el valor umbral anterior). Las líneas continuas representan el mejor ajuste computado con la ecuación lineal para cada submuestra, con los siguientes parámetros: primer pulso  $S_1$ :  $L_p = 2.19 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[\text{P}'_e]_A = 0.201 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9981$ ; primer pulso  $S_2$ :  $L_p = 2.36 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[\text{P}'_e]_A = 0.308 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9887$ ; segundo pulso  $S_1$ :  $L_p = 1.69 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[\text{P}'_e]_A = 0.280 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9786$ ; segundo pulso  $S_2$ :  $L_p = 11.43 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[\text{P}'_e]_A = 0.735 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.8617$ . Las líneas punteadas (B) corresponden al  $\text{IC}_{99\%}$  del ajuste de la función flujo-fuerza.

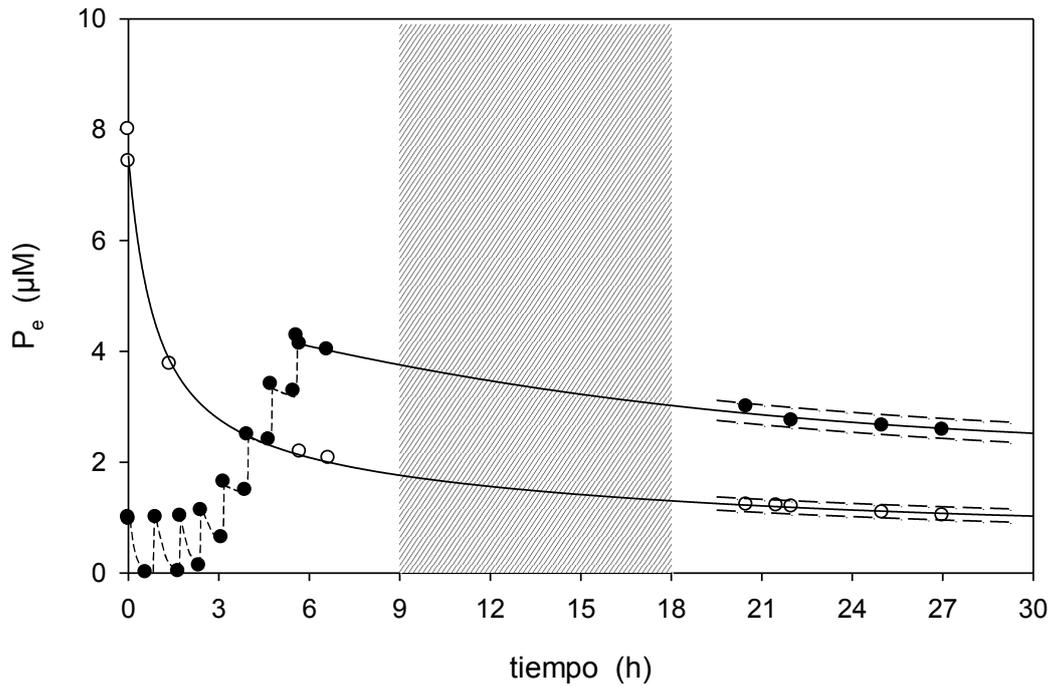


Figura 4-4. Transcurso de la incorporación neta de  $^{32}\text{P}$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ : símbolos negros y  $S_2$ : símbolos blancos) obtenidas del Lago Rodó, luego de la adición de 8 pulsos de  $1 \mu\text{M}$  a  $S_1$  y 1 pulso de  $8 \mu\text{M}$  a  $S_2$ . Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado con la ecuación lineal en  $S_1$ , con los parámetros:  $L_p = 3.2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 2.205 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9921$  y la ecuación no lineal en  $S_2$ , con los parámetros:  $L_p = 1.2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.833 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9996$ . Las áreas sombreadas representan el período oscuro de 9 h. Las líneas punteadas corresponden al IC<sub>99%</sub> del ajuste de la función flujo-fuerza.

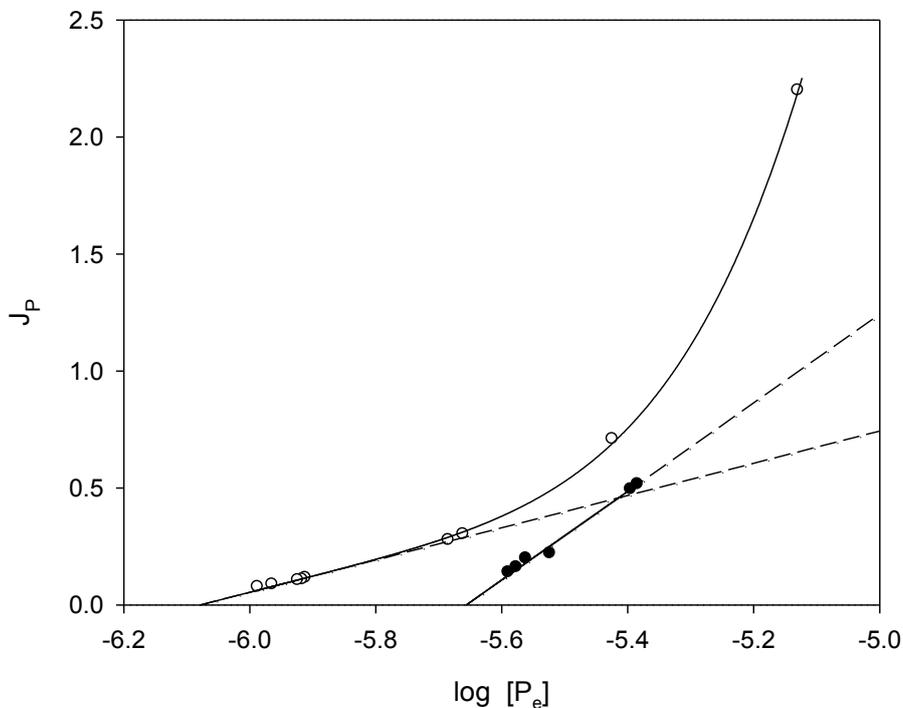


Figura 4-5. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_P$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 4-4 en la submuestra  $S_1$  (círculos negros) y  $S_2$  (círculos blancos). La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_P$ ) está expresado en  $\mu\text{mol Pi (mg Clo a h)}^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

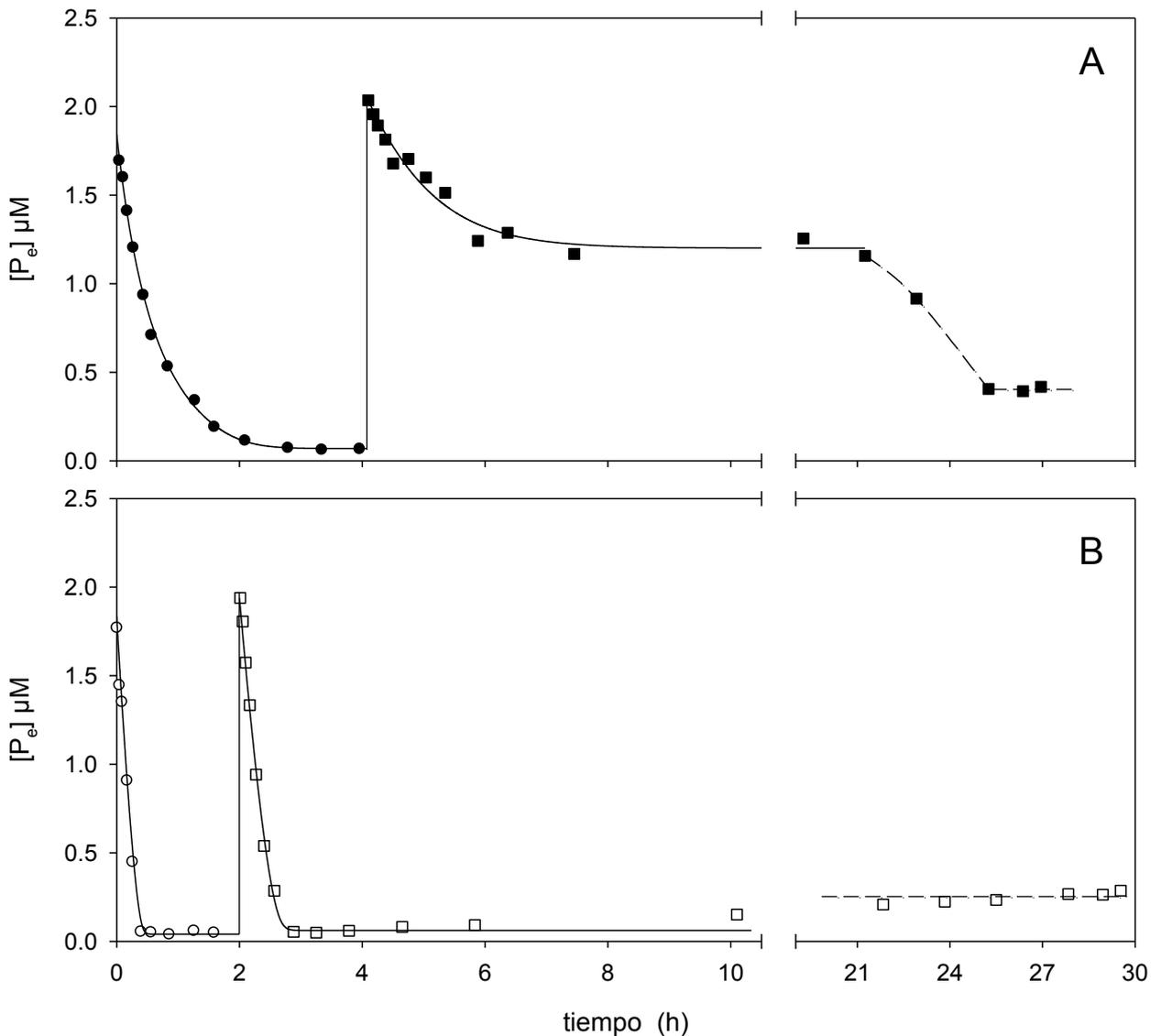


Figura 4-6. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$  y  $S_2$ ) obtenidas del Lago Rodó. El pretratamiento consistió en 10 pulsos de  $1 \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de  $10 \mu\text{M}$  a  $S_2$ , dos horas antes de iniciar los pulsos en A y B. A: Remoción de 2 pulsos de  $2 \mu\text{M}$  fosfato por el fitoplancton de la submuestra  $S_1$ . Las curvas representan el mejor ajuste computado con la ecuación no lineal ( $m = 5$ ), con los parámetros: primer pulso (círculos negros):  $L_p = 3.98 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.069 \mu\text{M}$ ,  $IC_{99\%} = \pm 0.084 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9974$ ; segundo pulso (cuadrados negros):  $L_p = 0.023 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $L = 0.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 1.201 \mu\text{M}$ ,  $IC_{99\%} = \pm 0.159 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9617$ . Concentración final de  $[P'_e]_A = 0.405 \pm 0.012 \mu\text{M}$ . B: Remoción de 2 pulsos de  $2 \mu\text{M}$  fosfato por el fitoplancton de la submuestra  $S_2$ . Las curvas representan el mejor ajuste computado con la ecuación lineal, con los parámetros: primer pulso (círculos blancos):  $L_p = 0.026 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.040 \mu\text{M}$ ,  $IC_{99\%} = \pm 0.105 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9970$ ; segundo pulso (cuadrados blancos):  $L_p = 0.019 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.062 \mu\text{M}$ ,  $IC_{99\%} = \pm 0.109 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9972$ . Concentración final de  $[P'_e]_A = 0.247 \pm 0.030 \mu\text{M}$ . El corte en el eje x incluye a la fase oscura.

Se determinó una diferencia más acentuada entre las submuestras cuando se expuso a una muestra con similar composición de fitoplancton a una mayor concentración de  $[^{32}\text{P}_e]$ . La muestra contuvo una biomasa de fitoplancton de  $236.8 \pm 0.1 \mu\text{g Clo l}^{-1}$  y estuvo compuesta por *P. agardhii* ( $B_T = 77.5\%$ ) y *R. mediterranea* ( $B_T = 18.9\%$ ), con el restante biovolumen representado por cf. *Limnothrix* ( $B_T = 1.4\%$ ), cf. *Planktolyngbya* ( $B_T = 1.0\%$ ), *Cyclotella* sp. y criptofitas. En la Figura 4-4 se muestra la remoción de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato luego del agregado de ocho pulsos de  $1 \mu\text{M}$  a la submuestra  $S_1$  y un pulso de  $8 \mu\text{M}$  a  $S_2$ . Al igual que en el caso anterior, la remoción de fosfato siguió durante el período de fase oscura; sin embargo, ambas submuestras no alcanzaron el mismo

valor umbral. En este caso, el tratamiento que detuvo su incorporación a un valor umbral extremadamente alto ( $[P_e]_A = 2.205 \mu\text{M}$ ) fue el que recibió la sucesión de pulsos, y resultó en una secuencia ascendente de la concentración externa, en contraste con las concentraciones bajas luego de los dos primeros pulsos de  $1 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato ( $7.0 \cdot 10^{-3} - 25.8 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$  fosfato). El fitoplancton de la submuestra  $S_2$  mostró una disminución neta de  $[^{32}\text{P}_e]$  hasta cesar la incorporación a un valor alto, aunque significativamente inferior a  $S_1$  ( $[P_e]_A = 0.833 \mu\text{M}$ , submuestra  $S_2$ ). La relación de  $J_p$  vs  $\log [P_e]$  del fitoplancton de  $S_2$  mostró una dependencia considerablemente curva desde la concentración inicial de  $[P_e]$  hasta alcanzar una relación cercana a la linealidad (Fig. 4-5). En contraste, el fitoplancton de la submuestra  $S_1$  mostró una relación lineal durante todo el transcurso de la remoción de fosfato al menos durante 21 horas (desde  $4.13 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}_e]$  fosfato). A partir de estos resultados, se investigó el alcance y persistencia del valor umbral alto. Se utilizó una muestra con un contenido de *Clo a* y composición fitoplanctónica similar al experimento anterior ( $Clo a = 220 \pm 6.2 \mu\text{g l}^{-1}$ ; *P. agardhii* ( $B_T = 61.4\%$ ) y *R. mediterranea* ( $B_T = 34.5\%$ ), con el restante biovolumen representado por cf. *Planktolyngbya*  $B_T = 1.6\%$ , células cf. *Microcystis sp.*, *Cyclotella sp.* y criptofitas). El fitoplancton fue sometido a un pretratamiento consistente en diez pulsos de  $1 \mu\text{M}$  en la submuestra  $S_1$  y un pulso de  $10 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato en  $S_2$ . Luego de dos horas de aplicados los pulsos, el fitoplancton de cada submuestra fue expuesto a dos pulsos consecutivos de  $2 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato (Fig. 4-6) cuya remoción fue seguida durante ca. 30 horas. Similar a lo mostrado previamente, se observó una diferencia marcada en los parámetros cinéticos: se produjo una reducción de seis veces el  $L_p$  durante el primer pulso en  $S_1$  y un aumento cercano a veinte veces el valor umbral alcanzado por el fitoplancton de  $S_1$  (Fig. 4-6A). El

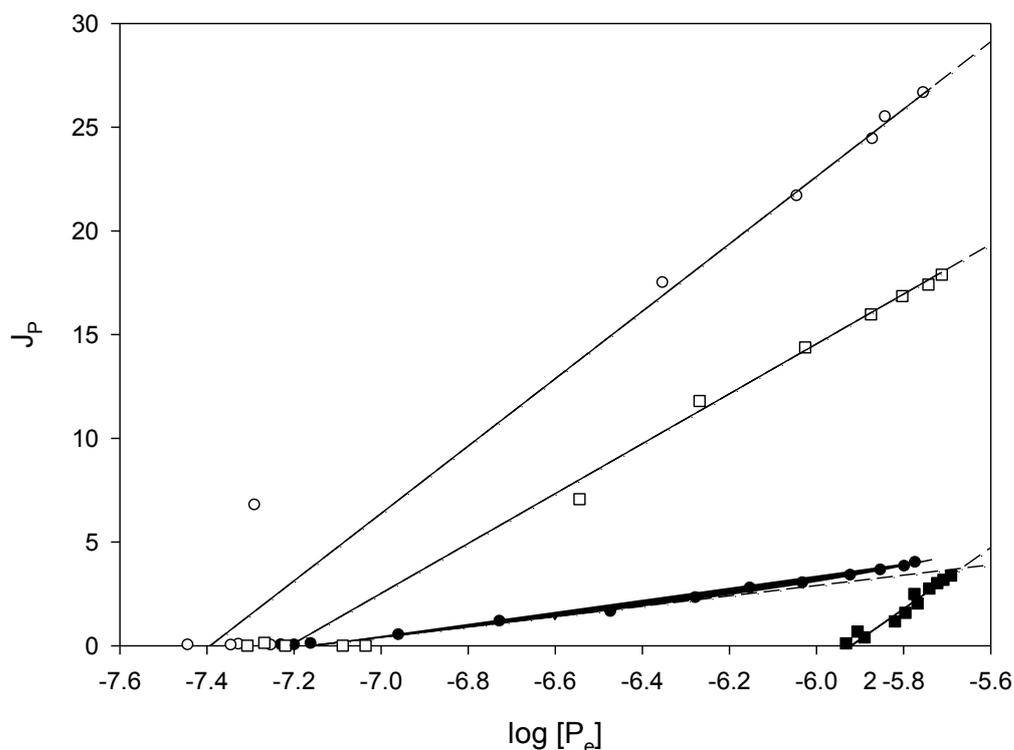


Figura 4-7. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 4-6 en la submuestra  $S_1$  (círculos negros: primer pulso, cuadrados negros: segundo pulso) y  $S_2$  (círculos blancos: primer pulso, cuadrados blancos: segundo pulso). La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo a h}$ ) $^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

fitoplancton de  $S_2$  mantuvo una relativamente constante y rápida cinética de incorporación (Fig. 4-6B), incorporando ca. 3 veces el contenido de  $P_T$  de la muestra y 30% más fosfato que  $S_1$ . Luego de 18 horas de permanencia del valor umbral en el rango micromolar, el fitoplancton en  $S_1$  reinició la incorporación durante las siguientes 4 horas hasta que se alcanzó un tercer valor estacionario intermedio ( $[P'_e]_A = 0.405 \pm 0.012 \mu\text{M}$ ). En  $S_2$  se produjo un incremento progresivo de la concentración umbral hasta alcanzar un valor cercano a la mitad del de  $S_1$ . El gráfico Thellier muestra los cambios significativos de  $L_p$  entre submuestras y pulsos (GLM-ANCOVA,  $p \ll 0.01$ ). Se produjo una menor disminución de  $L_p$  entre los pulsos de  $S_2$ , mientras que el  $J_p$  inicial del primer pulso en  $S_1$  fue aproximadamente siete veces inferior y levemente alejado de la relación lineal (Fig. 4-7). El siguiente pulso en  $S_1$  (Fig. 4-7, cuadrados negros) mostró cambios extremos en la relación entre  $J_p$  y  $\log [P_e]$ : se aproximó nuevamente a la linealidad, en todo el rango de concentración, concomitantemente con una disminución del  $J_p$  inicial y un aumento de  $L_p$  (Fig. 4-7, cuadrados negros).

#### Propagación a largo plazo de las nuevas propiedades cinéticas

Con el objetivo de conocer las alteraciones cinéticas y energéticas a largo plazo así como su efecto en el crecimiento fitoplanctónico, se siguió la remoción de  $[^{32}\text{P}_e]$  fosfato paralelamente con el incremento de la biomasa durante 45 horas. La muestra del Lago Rodó tuvo una alta biomasa inicial ( $\text{Clo } a = 411.6 \pm 9.8 \mu\text{g } a \text{ l}^{-1}$ ) y una comunidad dominada por cianobacterias filamentosas (*P. agardhii*,  $B_T = 65.9\%$  y *R. mediterranea*,  $B_T = 33.6\%$ , con el restante biovolumen representado por cf. *Planktolyngbya* y células cf. *Microcystis sp.*). Se aplicó el mismo pretratamiento que en el experimento anterior a dos submuestras ( $S_1$  y  $S_2$ ) y se comparó la cinética de incorporación con un pulso de  $2 \mu\text{M}$  a cada submuestra, luego de 17 horas de iniciada la incubación (Fig. 4-8). La concentración umbral alcanzada por el fitoplancton luego de los pulsos fue cinco veces superior en  $S_1$  ( $S_1$ :  $[P'_e]_A = 0.533 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.084 \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $0.092 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.046 \mu\text{M}$ ), el cual fue constante por más de 15 horas. Sin embargo, ambas suspensiones de fitoplancton mostraron una cinética de incorporación compleja, con al menos un punto de discontinuidad de la derivada primera del transcurso de la remoción de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato (Fig. 4-8). Debido al cambio en la velocidad de remoción, el mejor ajuste de la relación flujo–fuerza se obtuvo separadamente con los intervalos anterior y posterior a la discontinuidad, con los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 4-1. El mejor ajuste de la parte superior de la curva se realizó con la función no lineal de flujo fuerza, seguido de la linealización del sector final de la curva. El gráfico Thellier muestra que la relación entre  $J_p$  y  $\log [P_e]$  en  $S_1$  fue lineal en ambos sectores de la curva de remoción. En  $S_2$  esta relación partió lejana a la linealidad hasta ca.  $0.6 \mu\text{M}$   $[P_e]$  fosfato y continuó lineal hasta alcanzar el valor umbral (Fig. 4-9). Los cambios de  $L_p$  entre submuestras y pulsos fueron altamente significativos (GLM-ANCOVA,  $p \ll 0.01$ ).

Se determinó crecimiento del fitoplancton ( $S_1 = 475.2 \pm 15.6 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ ) únicamente en la submuestra que mostró el mayor incremento del valor umbral a 49 horas de iniciado el tratamiento ( $[P_e]_{Aini} = 0.069 \mu\text{M}$  fosfato;  $[P_e]_{Afin} = 0.503 \mu\text{M}$  fosfato, Tabla 4-1). La submuestra  $S_2$  y el control no mostraron diferencias significativas entre sí y con la biomasa inicial ( $\text{Clo } a = 375.7 \pm 31.3 \mu\text{g l}^{-1}$  y  $397.8 \pm 31.0 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $S_2$  y C, respectivamente).

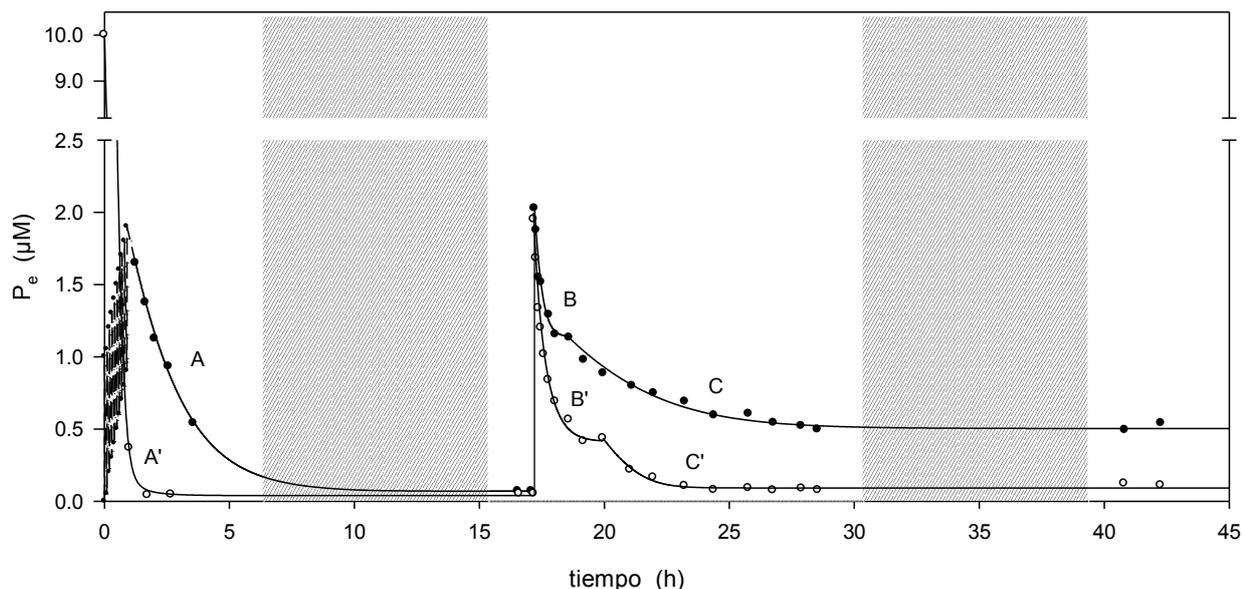


Figura 4-8. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ , círculos negros y  $S_2$ , círculos blancos) obtenidas del Lago Rodó. El pretratamiento consistió en 10 pulsos de  $1 \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de  $10 \mu\text{M}$  a  $S_2$ . Luego de 17 horas, se agregó un pulso de  $2 \mu\text{M}$  a cada submuestra de fitoplancton. Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado con la relación no lineal de flujo-fuerza (A, B, A' y B') y lineal en C y C'. Los parámetros de los ajustes se muestran en la Tabla 4-1. Las áreas sombreadas representan el período oscuro de 9 h.

Tabla 4-1. Parámetros del ajuste de las curvas de remoción de fosfato de la Figura 4-8, en dos submuestras de fitoplancton  $S_1$  y  $S_2$  del Lago Rodó.  $L_p$ : coeficiente de conductividad; L: coeficiente de conductividad de la ecuación no lineal;  $[P_e]_A$ : concentración umbral esperada  $\pm \text{IC}_{99\%}$ ;  $r^2$ : coeficiente de determinación; n: número de alícuotas incluidas en el ajuste. En la ecuación no lineal  $m = 3$ .

submuestra	curva	$L_p$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	L ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	$[P_e]_A$ ( $\mu\text{M}$ )	n	$r^2$
$S_1$	A	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$0.3 \cdot 10^{-3}$	$0.069 \pm 0.070$	7	0.9982
$S_1$	B	$80.0 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.137 \pm 0.130$	7	0.9821
$S_1$	C	$3.5 \cdot 10^{-3}$	—	$0.503 \pm 0.084$	13	0.9773
$S_2$	A'	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-3}$	$0.039 \pm 0.062$	7	0.9999
$S_2$	B'	$15.1 \cdot 10^{-3}$	$10.0 \cdot 10^{-3}$	$0.413 \pm 0.096$	10	0.9955
$S_2$	C'	$2.5 \cdot 10^{-3}$	—	$0.092 \pm 0.046$	11	0.9741

En el experimento anterior, el crecimiento se constató por determinación del valor inicial y final de la biomasa. En el experimento siguiente se analizó el transcurso del crecimiento. En este caso se observa nuevamente una correlación entre el aumento del valor umbral y el crecimiento del fitoplancton. La muestra de fitoplancton tuvo una biomasa y composición similar al experimento de la figura 4-8 ( $\text{Clo } a = 308.5 \pm 10.9 \mu\text{g l}^{-1}$ ;  $B_T = 65.9$  y  $33.6\%$ , *P. agardhii* y *R. mediterranea*, respectivamente, y  $B_T = 3.6\%$  representado por cf. *Limnothrix*, *Microcystis* sp. y células cf. *Microcystis* sp.). Se aplicó el mismo pretratamiento que en el experimento anterior a las dos submuestras ( $S_1$  y  $S_2$ ) y se comparó la cinética de incorporación con un pulso de  $2 \mu\text{M}$  luego de

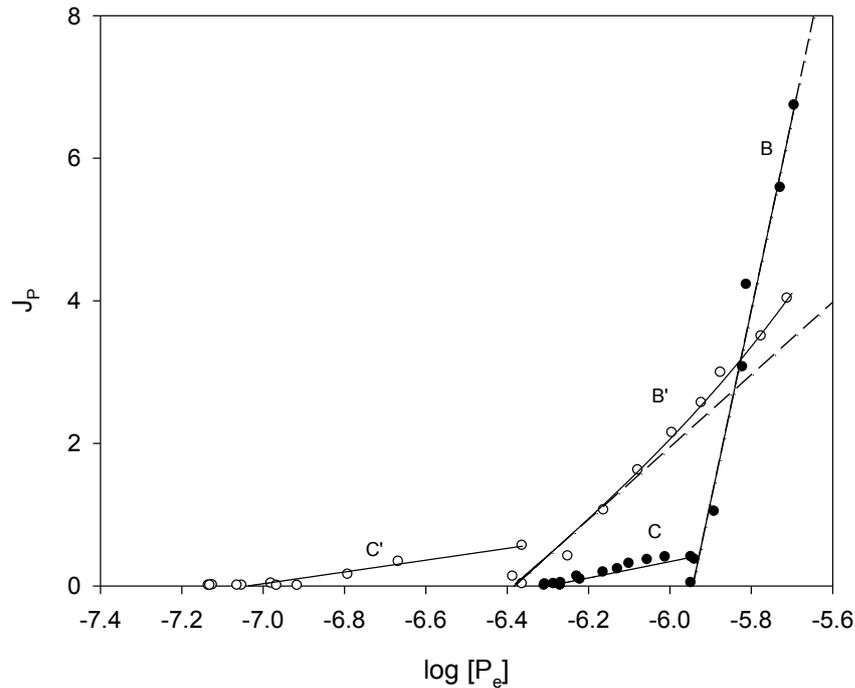


Figura 4-9. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 4-8 en la submuestra  $S_1$  (B y C, círculos negros) y  $S_2$  (B' y C', círculos blancos). La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo a h}^{-1}$ ) y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

16.7 horas de iniciada la incubación (Fig. 4-10). La cinética de incorporación  $[^{32}\text{P}]$  fosfato mostró, también en este experimento, un punto de discontinuidad en la pendiente de la curva de remoción de la submuestra  $S_1$ . En cambio, toda la curva de incorporación de  $S_2$  se ajustó a la función no lineal de flujo-fuerza. A pesar de que se observó un incremento en la concentración umbral hacia el final en  $S_2$ , el  $[P'_e]_A$  de  $S_1$  resultó tres veces mayor (Tabla 4-2).

El análisis de  $J_p$  vs.  $\log [P_e]$  mostró una relación curvilínea acentuada en ambas submuestras, cuya linealidad se alcanzó a una concentración externa de  $0.780 \mu\text{M}$  fosfato en  $S_1$  (luego del punto de discontinuidad), mientras que en  $S_2$  se produjo a partir de  $0.231 \mu\text{M}$  fosfato (Fig. 4-11). El inicio de la linealidad en  $S_1$  fue concomitante con un incremento de  $J_p$  de  $0.1764 \mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo a h}^{-1}$ ). El transcurso del crecimiento, determinado a partir de las longitudes de onda correspondientes a la turbidez de la muestra y de los pigmentos fotosintéticos in vivo de las incubaciones, mostró un incremento progresivo de los valores medios en el fitoplancton de  $S_1$  (Fig. 4-12A). La tasa de incremento promedio entre 15 – 30 horas fue nueve veces mayor a la determinada para  $S_2$  (Fig. 4-12B). Luego de 40 horas se produjo una estabilización del crecimiento en  $S_1$ , mientras que disminuyó la absorbancia en  $S_2$ , relativa al intervalo 15 – 30 horas. El aumento de la absorbancia en  $S_1$  se corroboró con la extracción de clorofila *a* de las mismas incubaciones a  $t = 49 \text{ h}$ , la que representó un incremento mayor a 25% en  $S_1$  ( $S_1 = 524.5 \pm 35.5 \mu\text{g Clo a l}^{-1}$ ;  $S_2 = 391.3 \pm 11.8 \mu\text{g Clo a l}^{-1}$ ).

No se observaron diferencias en el crecimiento entre los tratamientos cuando el patrón de pulsos no produjo una alteración persistente del valor umbral. En estos casos se produjo una convergencia de la respuesta durante la aplicación del mismo pretratamiento de pulsos que el

realizado anteriormente. La Figura 4-13 muestra un ejemplo representativo de estos casos. En este experimento, la principal diferencia entre los tratamientos de pulsos luego de 17 horas de iniciada la incubación fue la disminución de  $L_p$  cercana a cinco veces en  $S_1$  (Fig. 4-13B), mientras que las concentraciones umbrales fueron esencialmente las mismas ( $S_1$ :  $[P_e]_A = 0.100 \mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$  fosfato,  $IC_{99\%} = \pm 0.033 \mu\text{M}$ ;  $S_2$ :  $[P_e]_A = 0.096 \mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$  fosfato,  $IC_{99\%} = \pm 0.044 \mu\text{M}$ ). La tasa promedio de incremento de la absorbancia entre 15 y 30 horas fue levemente superior en  $S_1$  (Fig. 4-13C y D), aunque la concentración de Clo *a* final en  $S_1$  y  $S_2$  no mostró diferencias significativas (Clo *a* inicial =  $391.1 \pm 27.6 \mu\text{g l}^{-1}$ ; Clo *a* 30 h:  $S_1 = 412.1 \pm 9.7 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$  y  $S_2 = 410.7 \pm 23.2 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ ).

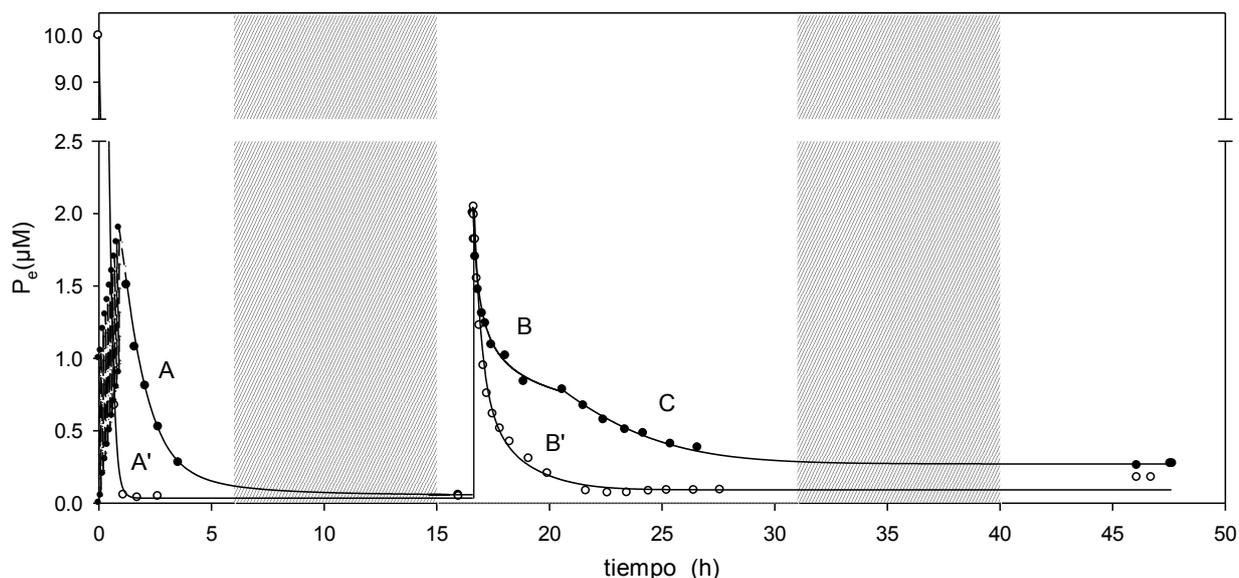


Figura 4-10. Transcurso de la incorporación neta de  $^{32}\text{P}$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ , círculos negros y  $S_2$ , círculos blancos) obtenidas del Lago Rodó. El pretratamiento consistió en 10 pulsos de  $1 \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de  $10 \mu\text{M}$  a  $S_2$ . Luego de 17 horas, se agregó un pulso de  $2 \mu\text{M}$  a cada submuestra de fitoplancton. Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado con la relación no lineal de flujo-fuerza (A, B, A' y B') y lineal en C. Los parámetros de los ajustes se muestran en la Tabla 4-2. Las áreas sombreadas representan el período oscuro de 9 h.

Tabla 4-2. Parámetros del ajuste de las curvas de remoción de fosfato de la Figura 4-10, en dos submuestras de fitoplancton  $S_1$  y  $S_2$  del Lago Rodó.  $L_p$ : coeficiente de conductividad; L: coeficiente de conductividad de la ecuación no lineal;  $[P_e]_A$ : concentración umbral esperada  $\pm IC_{99\%}$ ; m: exponente entero  $>1$  del término no lineal de la relación flujo-fuerza; n: número de alícuotas incluidas en el ajuste;  $r^2$ : coeficiente de determinación.

submuestra	curva	$L_p$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	L ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	$[P_e]_A$ ( $\mu\text{M}$ )	m	n	$r^2$
$S_1$	A	$0.2 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.053 \pm 0.081$	3	6	0.9972
$S_1$	B	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$10.0 \cdot 10^{-3}$	$0.473 \pm 0.067$	5	9	0.9965
$S_1$	C	$1.8 \cdot 10^{-3}$	—	$0.270 \pm 0.038$	—	9	0.9935
$S_2$	A'	$3.9 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-3}$	$0.034 \pm 0.057$	3	7	1.0000
$S_2$	B'	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$0.2 \cdot 10^{-3}$	$0.091 \pm 0.096$	5	21	0.9967

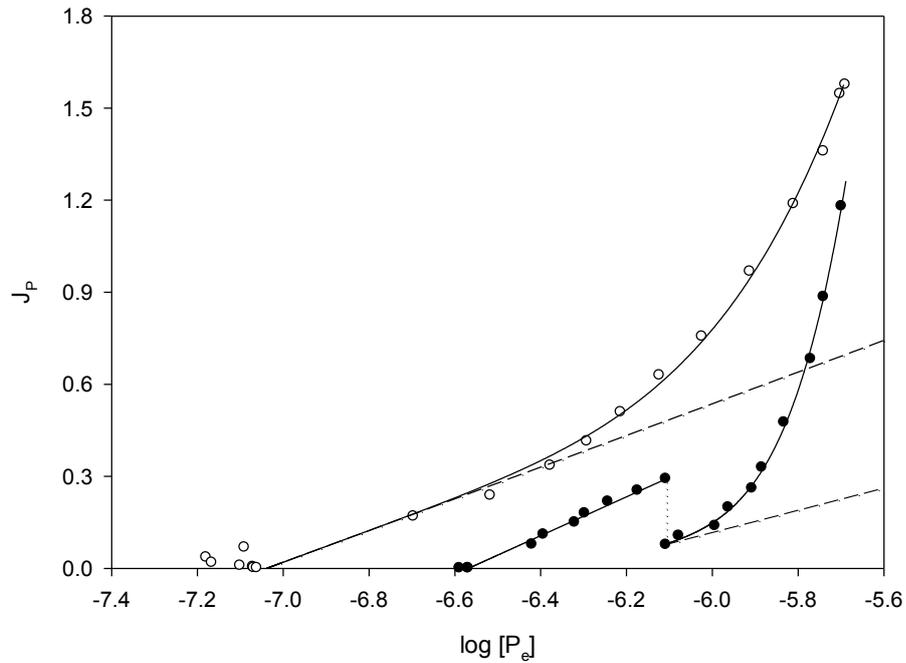


Figura 4-11. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 4-10 en la submuestra  $S_1$  (círculos negros) y  $S_2$  (círculos blancos). La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. La línea punteada vertical indica el punto de discontinuidad en el flujo. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol } P_i \text{ (mg Clo } a \text{ h)}^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

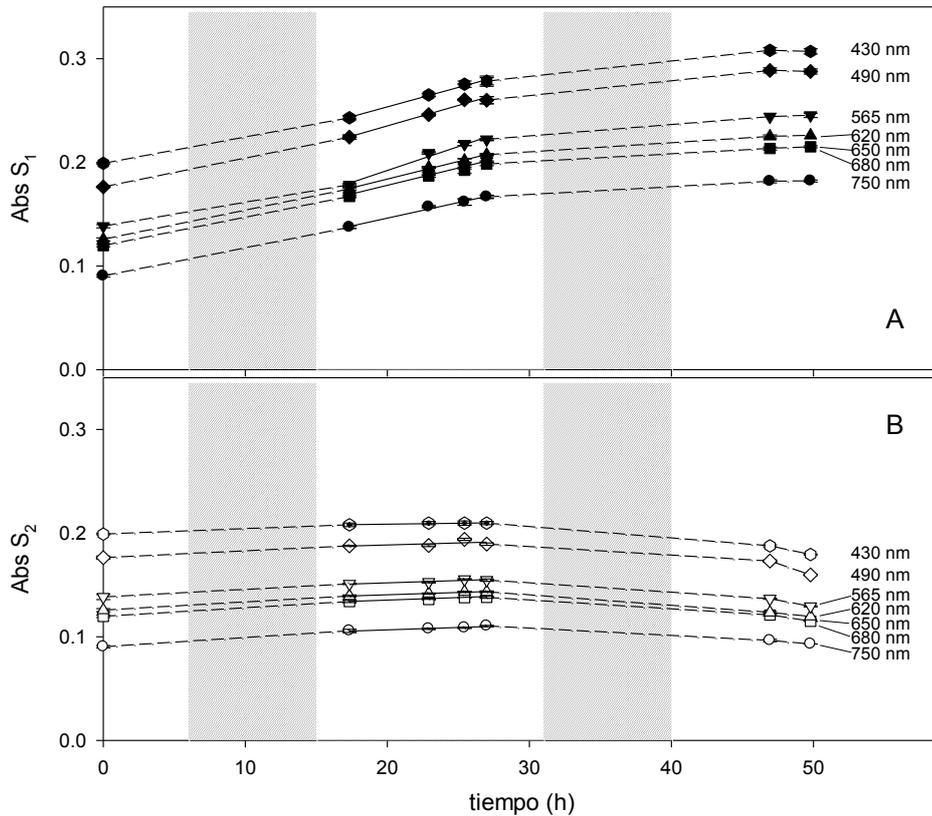
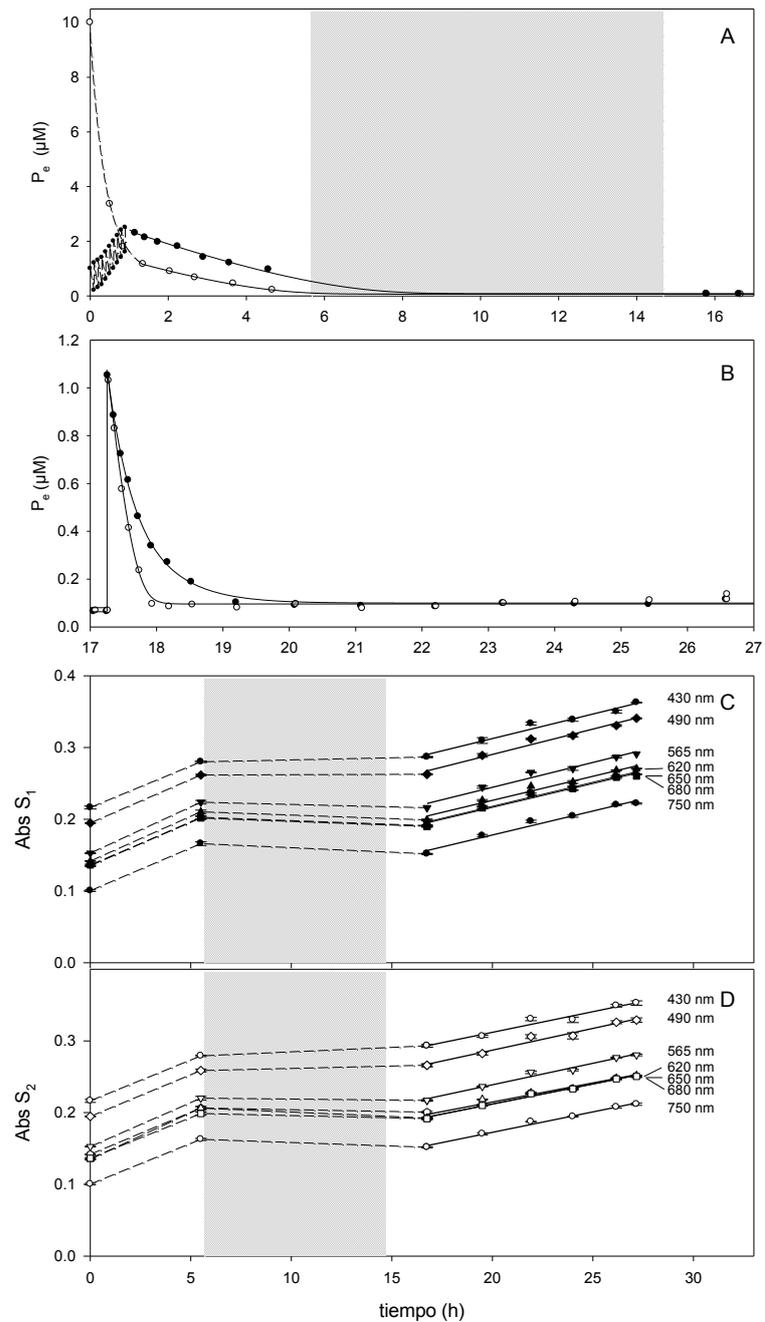


Figura 4-12. Transcurso de la absorbancia in vivo de incubaciones expuestas en forma paralela al mismo patrón de pulsos del experimento mostrado en la Figura 4-10. Las longitudes de onda usadas corresponden al máximo de absorbancia de los principales pigmentos fotosintéticos (430 nm: clorofila, 490 nm: carotenoides, 565 nm: alioficocianina, 620 nm: ficoeritrina, 650 nm: ficocianina y 680 nm: clorofila) y la turbidez total de la muestra (750 nm). La línea continua corresponde al intervalo utilizado para el cálculo de la tasa de crecimiento promedio, con los siguientes parámetros: A:  $3.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.5 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ; B:  $0.4 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ; rango de  $r^2 = 0.97 - 0.99$ . Las áreas sombreadas representan el período oscuro de 9 h.

Figura 4-13. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato (A y B) y de la absorbancia in vivo (C y D) en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ , símbolos negros y  $S_2$ , símbolos blancos) obtenidas del Lago Rodó. A: Pretratamiento con 10 pulsos de  $1\ \mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de  $10\ \mu\text{M}$  a  $S_2$ . B: Aplicación de un pulso de  $1\ \mu\text{M}$  a cada submuestra de fitoplancton luego de 17 horas de iniciado el pretratamiento. Las curvas representan el mejor ajuste computado con los parámetros:  $S_1$ , ecuación no lineal ( $m = 3$ ):  $L_p = 3.16 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $L = 2.0 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.100\ \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.033\ \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9985$ ;  $S_2$ , ecuación lineal:  $L_p = 17.28 \cdot 10^{-3}\ \mu\text{M}\ \text{min}^{-1}$ ,  $[P_e]_A = 0.096\ \mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{99\%} = \pm 0.044\ \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.9968$ . C y D: Transcurso de la absorbancia in vivo de incubaciones expuestas en forma paralela al mismo patrón de pulsos del experimento mostrado en A y B. Las longitudes de onda usadas corresponden al máximo de absorbancia de los principales pigmentos fotosintéticos (430 nm: clorofila, 490 nm: carotenoides, 565 nm: alioficocianina, 620 nm: ficoeritrina, 650 nm: ficocianina y 680 nm: clorofila) y la turbidez total de la muestra (750 nm). La línea continua corresponde al intervalo utilizado para el cálculo de la tasa de crecimiento promedio, con los siguientes parámetros: C:  $6.8 \cdot 10^{-3} \pm 0.2 \cdot 10^{-3}\ \text{h}^{-1}$ ; D:  $5.7 \cdot 10^{-3} \pm 0.3 \cdot 10^{-3}\ \text{h}^{-1}$ ; rango de  $r^2 = 0.97 - 0.99$ . Las áreas sombreadas representan el período oscuro de 9 h.



## Discusión

Los resultados presentados en este capítulo apoyan la hipótesis general de trabajo de la tesis y permitieron determinar que la comunidad fitoplanctónica altera su cinética de incorporación de fosfato frente a los incrementos temporales en la concentración externa y que estos cambios afectan la tasa de crecimiento de la comunidad fitoplanctónica (objetivos específicos 2 y 5). El valor umbral del fitoplancton fue menor o igual a  $55\ \text{nM}$  fosfato (rango =  $7.1 - 55.0\ \text{nM}$  fosfato) previo a una alteración significativa de las propiedades originales de incorporación. Luego de la alteración cinética provocada por los pulsos de fosfato, el valor umbral aumentó hasta tres órdenes

de magnitud y permaneció estable por períodos mayores a 20 horas. Como fue mostrado en el Capítulo 3, la adaptación de la cinética se produjo de acuerdo al tiempo de exposición del fitoplancton al incremento de la concentración externa ( $t_E$ ). Una respuesta similar de adaptación dependiente del tiempo de exposición al fosfato externo se determinó previamente con monocultivos de *Anacystis nidulans* y *Anabaena variabilis*, en los cuales las suspensiones de células diluidas removieron el  $[P_e]$  agregado más lento y por lo tanto modificaron la cinética de incorporación (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995, Wagner et al. 2000, Falkner & Falkner 2003). En este sentido, la secuencia de pulsos de menor concentración e intervalos de tiempo cortos aplicados en este trabajo determinó que no se alcanzara el valor umbral luego de cada incremento de  $[^{32}P_e]$ . Esto implicó que el fitoplancton experimentara una fluctuación de la concentración externa con una tendencia ascendente neta y el fosfato externo permaneciera elevado por un período de tiempo cercano a 5 horas. La respuesta cinética fue mayor cuando se acentuó la diferencia de  $[P_e]$  de los pulsos aplicados a cada tratamiento. El principal factor que pudo determinar este comportamiento fue que los organismos que mostraron un mayor  $J_p$  alcanzaron el valor umbral luego del primer pulso, lo que disminuyó el  $t_E$  en ca. 30 min. Esta disminución de la actividad de incorporación ha sido tradicionalmente interpretada como la regulación de las tasas de incorporación por la acumulación intracelular del recurso debido a la saturación de la capacidad de incorporación (ej.: Rhee & Gotham 1981, Riegman & Mur 1984, Ducobu et al. 1998, Fu et al. 2005). En cambio, los resultados de la presente tesis muestran que el fitoplancton reduce su velocidad y capacidad de incorporación de fosfato previo a la saturación por acumulación del recurso. En cada experimento en el que se produjo la adaptación fisiológica se comprobó que la submuestra paralela pudiera mantener una mayor actividad de incorporación del fosfato externo, una vez que fueron sometidas a la misma concentración de  $[^{32}P_e]$  total dosificada en dos patrones de pulsos.

La persistencia a largo plazo del alto valor umbral encontrado en este estudio es paradójica en el contexto contemporáneo de la noción de organismos competidores por el recurso limitante; particularmente, si se considera que esta respuesta se produjo lejos de colmar la capacidad del fitoplancton de almacenar el nutriente. Esta evidencia experimental contradice la idea de exclusión competitiva por agotamiento del recurso limitante como fuerza estructuradora de las comunidades de fitoplancton en lagos, originalmente propuesta por Tilman (1982) y respaldada principalmente por Sommer (1999). Contrariamente, el fenómeno observado en este estudio se debió a la regulación de los sistemas de incorporación del fitoplancton deficiente por fosfato cuando es sometido a pulsos previos del nutriente. La respuesta obtenida al final del proceso de remoción muestra que la alteración cinética es lograda de forma conjunta y uniforme por la comunidad de fitoplancton (Aubriot et al. 2000, Wagner et al. 2000, Capítulo 3). Como se analizó en el Capítulo 3, el valor umbral representa el valor mínimo posible para la incorporación de fosfato. De existir competencia, la concentración externa hubiera descendido de forma escalonada con una tasa correspondiente a la del mejor competidor y hasta alcanzar el mismo valor umbral previo al pulso (Wagner et al. 2000, Capítulo 3). En algunos casos se observó una respuesta bifásica evidenciada en puntos de aparente discontinuidad en la derivada primera del transcurso de la remoción de un pulso de fosfato, lo que implicó un aumento de la incorporación (Fig. 4-8 y 4-10). Este tipo de respuesta se caracterizó por dos cinéticas de incorporación con propiedades diferentes, la cual ocurrió durante el transcurso de la remoción de fosfato o luego de varias horas de haber alcanzado el valor estacionario intermedio. Este comportamiento (mostrado en las Figuras 4-8 y 4-10) podría

explicarse con dos hipótesis: la primera sostiene que la cinética compleja resultante se debe al comportamiento de incorporación independiente entre las dos especies dominantes en el ambiente, *Planktothrix agardhii* y *Raphidiopsis mediterranea* (comportamiento competitivo, similar al simulado en la Figura 3-12A, Capítulo 3). En este caso, el tramo inicial de la curva de remoción correspondería a la actividad de remoción de ambas especies y el sector final sólo a la especie que mantuvo un umbral más bajo (ver Apéndice 2). Sin embargo, no se cumple lo esperado por el modelo competitivo debido a que: primero, se hubiese observado una cinética escalonada también en el transcurso del primer pulso (10  $\mu\text{M}$ ); segundo, a que en el siguiente pulso se observa una tendencia a alcanzar un umbral más alto que no se produjo previamente, y tercero, a que la incorporación se detiene a un umbral correspondiente al doble del anterior (Fig. 4-8, curva A', B' y C'). En el caso paralelo  $S_2$ , los mismos organismos muestran una tendencia a detener la incorporación a una concentración más alta (1.137  $\mu\text{M}$  fosfato), pero la incorporación continúa hasta un valor intermedio (0.503  $\mu\text{M}$  fosfato). De haber existido competencia pura, la remoción del fosfato en  $S_2$  continuaría hasta alcanzar el valor umbral del pulso previo. Asimismo, si los puntos previos y posteriores a la discontinuidad de la derivada correspondiesen a las propiedades de incorporación de al menos una de las especies dominantes, debería haberse producido al mismo nivel de concentración e intervalo de tiempo en ambas curvas de remoción ( $S_1$  y  $S_2$ ).

La segunda hipótesis propone que este transcurso bifásico de remoción de fosfato externo se debe a un desfase entre el estado "adaptable" y el "adaptado" de las dos poblaciones dominantes de fitoplancton (*P. agardhii* y *R. mediterranea*). Esta hipótesis se apoya en que los puntos de discontinuidad ocurrieron a diferentes concentraciones y tiempos, debido a la tendencia de alcanzar un valor umbral alto por una o ambas poblaciones. Este fenómeno reflejaría las propiedades adaptativas de cada población, las que posiblemente puedan diferir en su rango de sensibilidad de respuesta frente al estímulo externo (Apéndice 2). Esta segunda hipótesis podría ser analizada mediante al menos dos vías en futuros estudios: la aplicación de un nuevo pulso de fosfato posterior al comportamiento escalonado de incorporación que resulte en una cinética uniforme de remoción del nutriente, y/o a través de la obtención de cepas aisladas de cada población con valores umbrales diferentes, tal que mezcladas en un mismo medio muestren un comportamiento uniforme de incorporación posterior a la cinética escalonada. Esta respuesta escalonada de incorporación también fue observada en monocultivos de *A. variabilis*, sugiriendo que dicho comportamiento puede deberse al transcurso de la adaptación cinética de la incorporación de fosfato dentro de la misma población (G. Falkner, comunicación personal).

En general, el resultado del transcurso de la adaptación cinética en este estudio y en el Capítulo 3 fue un nuevo estado uniforme de incorporación, reflejada en la relación lineal entre  $J_p$  y  $\log [P_e]$ . De acuerdo a lo previsto por el modelo adaptativo (Capítulo 3, Fig. 3-13), el tiempo de exposición  $t_E$  a la concentración externa elevada es la referencia externa que tienen las poblaciones para modificar sus propiedades cinéticas. Por lo tanto, el proceso observado aquí consistiría en un mutuo ajuste cinético y energético basado en los cambios que cada población produjo en el medio. De forma similar a lo observado en el Capítulo 3, esta interdependencia entre las poblaciones, la comunidad y el ambiente constituiría un "sistema autorreferencial", como fue propuesto por Falkner et al. (1996). Podemos postular entonces que la cinética bifásica de remoción de fosfato externo pudo deberse a un desfase en la respuesta cinética adaptativa entre los componentes de la comunidad.

La capacidad de adaptar la incorporación de fosfato a los incrementos ambientales de fosfato previos resultó en un aumento del crecimiento fitoplanctónico. Este resultado se determinó tanto en la absorbancia de los principales pigmentos fotosintéticos y la turbidez total, como en la mayor concentración de clorofila *a*. Esta evidencia directa es consistente con Wagner et al. (2000), quienes determinaron que se produce un cambio en el flujo del carbono asimilado hacia compuestos de bajo peso molecular, rápidamente disponibles para el proceso de crecimiento, cuando cultivos de *A. nidulans* deficiente por fosfato son sometidos a pulsos del nutriente. Usualmente se considera que la tasa de crecimiento algal es mayor cuanto más polifosfato se haya acumulado previamente (Droop 1973). Por lo tanto, la relación de crecimiento de Droop, originalmente propuesta para cultivos de crecimiento continuo, no sería extrapolable al crecimiento de fitoplancton debido a que las condiciones naturales de suministro de fosfato en lagos se asemejan a condiciones de crecimiento discontinuas (Wagner et al. 2000, Istvánovics et al. 2000). En condiciones naturales existiría un desfase temporal entre el proceso de incorporación y el crecimiento. A dicha condición ambiental fluctuante se le suma la capacidad de los organismos de ajustar la cinética de incorporación a los incrementos de fosfato, lo que resulta en una mayor formación de biomasa a expensas de una menor concentración de polifosfato intracelular. Esta aparente contradicción, podría explicarse por la desventaja para el crecimiento que puede implicar el almacenamiento excesivo del nutriente en gránulos de polifosfato: por un lado, suficiente nutriente debe ser incorporado durante cada pulso para mantener el crecimiento, y por otro, el tamaño de los gránulos de polifosfato no debe ser demasiado grande como para modificar las estructuras celulares (Falkner et al. 2006) o provocar la precipitación de las células a zonas menos iluminadas de la columna de agua debido a su mayor densidad (Reynolds 1988). Estos problemas estructurales podrían explicar la ausencia de crecimiento e incluso la disminución final de la biomasa del fitoplancton que alteró menos su cinética, lo que resultó en la incorporación de casi dos veces el contenido de fósforo total de la muestra en menos de 1 hora (Fig. 4-10, curva A').

Un mayor crecimiento a expensas de menos recursos podría explicarse por un incremento significativo de la eficiencia de la conversión de energía durante el estado adaptado (Falkner et al. 1989, Falkner et al. 1994). Según Falkner et al. (2006) existen teóricamente dos estados estables de los sistemas de conversión de energía con mínima producción de entropía: uno es en el valor umbral, donde la fuerza impulsora del flujo desaparece, y el otro, cuando aumenta el grado de acoplamiento entre el flujo de fosfato hacia el interior celular, la reacción de la ATPasa, la estequiometría  $H^+/ATP$  y la ATPsintetasa. En este trabajo se determinó que la relación lineal entre flujo y fuerza reflejó el grado de adaptación cinética del fitoplancton. En general, la relación lineal fue característica de las condiciones originales de incorporación de fosfato en el lago (Aubriot et al. 2000, Capítulo 3). Frente a un incremento de fosfato externo, esta relación lineal es alterada en regiones lejanas al valor umbral y, de acuerdo a la intensidad de la respuesta, esta relación tendió a linealizarse a medida que se alcanzaron las nuevas propiedades cinéticas. Por lo tanto, la capacidad de adaptarse rápidamente a los incrementos de fosfato, podría ser un factor decisivo para el crecimiento fitoplanctónico en general (Falkner et al. 1996). Esta ventaja fisiológica facilitaría la permanencia de poblaciones típicamente persistentes bajo condiciones ambientales de estrés nutricional.

Las nuevas propiedades cinéticas reflejaron los incrementos en la concentración de fosfato externo ocurridos 24 horas antes y concomitantemente, estas nuevas propiedades fueron mantenidas durante la división celular 45 horas después de iniciado el proceso (Fig. 4-12A). La

diferencia en la intensidad y duración del estímulo (pulsos) fue el desencadenador de la respuesta del fitoplancton, la cual ocurrió con un desfase temporal. Esta secuencia de adaptaciones cinéticas sugiere que debe existir un tipo de "monitoreo" del ambiente, mediante el cual los microorganismos pueden responder posteriormente de forma coherente y energéticamente favorable (Falkner et al. 1996, Falkner et al. 2006). La propiedad de plantas y microalgas de "almacenar" información de señales ambientales y que esta pueda ser "llamada" luego de un intervalo de tiempo, es un tópico de intensa investigación (ej.: Thellier et al. 1982, Wagner et al. 1995, Falkner et al. 1996, Thellier et al. 2000, Falkner et al. 2006, Tafforeau et al. 2006). Los resultados del presente trabajo muestran una gran sensibilidad del fitoplancton a las fluctuaciones de fosfato. A partir de estos resultados, surge necesario profundizar en la respuesta adaptativa del fitoplancton y conocer si la secuencia de las fluctuaciones de la concentración de fosfato externo puede ser traducida por los microorganismos como una sucesión de señales ambientales, capaces de provocar modificaciones metabólicas y del crecimiento de las comunidades fitoplanctónicas. Esta sensibilidad de la respuesta fue determinada recientemente con la cianobacteria *A. variabilis*, la cual posee la capacidad de adaptarse de forma diferencial a un conjunto de pulsos cuando están ordenados en diferente secuencia (Falkner et al. 2006). Para profundizar en las respuestas comunitarias se investigó en el Capítulo 5 si esta capacidad de adaptarse diferencialmente a patrones de pulsos idénticos ordenados en secuencias diferentes es compartida por una comunidad de fitoplancton, así como su posible rol en la proliferación algal.

## La respuesta de la incorporación de fosfato por fitoplancton es sensible a la secuencia de pulsos del nutriente

---

### Introducción

El crecimiento y permanencia de fitoplancton en lagos ocurre a expensas de frecuentes fluctuaciones extremas de la concentración ambiental de fosfato. Bajo condiciones nutricionales deficientes por el nutriente, estos incrementos son rápidamente incorporados hasta concentraciones umbrales de rango nanomolar, en donde la incorporación neta cesa por razones energéticas (Falkner et al. 1989, Falkner et al. 1993). El fosfato incorporado es almacenado mediante la polimerización y agregación del nutriente en gránulos osmóticamente inertes (Kulaev & Vagabov 1983), los que serán la fuente de fósforo para la proliferación celular (Liss & Langen 1962). Usualmente se considera que la tasa de crecimiento es mayor cuanto más polifosfato es acumulado (Droop 1973). Sin embargo, no existen evidencias para suponer que la célula pueda realizar un monitoreo del tamaño de la reserva, a efectos de fijar la tasa de crecimiento (Wagner et al. 2000). Por esta razón, el almacenamiento de fosfato plantea un problema de regulación: se debe incorporar suficiente fosfato durante los incrementos externos transitorios para sustentar el crecimiento constante, pero los gránulos de polifosfato no deben ser demasiado grandes como para distorsionar las estructuras celulares. Este problema puede resolverse a través de un tipo de adaptación fisiológica (Begon et al. 1990) que permita regular la incorporación de fosfato de forma energéticamente favorable frente a los cambios en el suministro del nutriente (Falkner et al. 1996). Asimismo, si estas propiedades cinéticas adaptables del sistema de incorporación de fosfato se relacionan con una mayor eficiencia en la utilización del recurso, podrían determinar procesos celulares subsecuentes que resulten en una regulación del crecimiento de los organismos (Wagner et al. 2000).

Investigaciones con cultivos de una cianobacteria picoplanctónica (*Anacystis nidulans*) y otra filamentosa (*Anabaena variabilis*) determinaron que, bajo condiciones fluctuantes del suministro de fosfato, los sistemas de incorporación de estas cianobacterias modifican sus propiedades cinéticas y energéticas independientemente de la cantidad de fosfato almacenado (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995, Falkner & Falkner 2003). Asimismo, un monitoreo del comportamiento de

incorporación de fosfato por comunidades naturales de fitoplancton dominadas por cianobacterias en lagos reveló cambios en las propiedades de incorporación frente a las fluctuaciones en el suministro del nutriente (Aubriot et al. 2000). En el Capítulo 3 se mostró que si una comunidad de fitoplancton tiene suficiente tiempo para adaptarse cinéticamente a los cambios de la concentración externa provocados por toda la comunidad, las poblaciones desarrollan normalmente un comportamiento uniforme con respecto a sus propiedades cinéticas de los sistemas de incorporación del nutriente. Las propiedades resultantes del proceso adaptativo de la cinética del fitoplancton pueden perdurar por períodos prolongados y reflejan el patrón de pulsos de fosfato ocurridos en las 24 horas previas (Capítulo 4). Estas nuevas propiedades fisiológicas resultan en un mayor crecimiento fitoplanctónico, a pesar de que involucraron una menor acumulación del nutriente. Recientemente se demostró que la alteración de la concentración externa de fosfato es convertida por la cianobacteria *A. variabilis* en una señal desencadenante del comportamiento adaptativo, de tal forma que es capaz de discriminar entre dos patrones de pulsos (Falkner et al. 2006). En este capítulo se investigó si el fitoplancton deficiente por fosfato es capaz de adaptar la cinética de incorporación al orden en que se suceden los incrementos de fosfato. Este evento podría reflejarse en el modo de acumulación de las reservas de fosfato, así como en la proliferación microalgal. Los resultados se discuten en relación a la sensibilidad de la respuesta fisiológica del fitoplancton frente a la ocurrencia de fluctuaciones de fosfato en el medio y al rol de la historia de los eventos ambientales en la persistencia y la propagación de los "estados adaptados" (Falkner & Falkner 2003).

## Materiales y métodos

### Área de estudio

Las investigaciones sobre las alteraciones cinéticas de la incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones de fosfato se realizaron en el Lago Rodó, Parque Rodó, Montevideo, en junio de 2006 y de enero a marzo de 2007. Los antecedentes del Lago Rodó y sus principales características morfológicas, así como la obtención y procesamiento de las muestras, las mediciones in situ, las determinaciones espectrofotométricas, el análisis cualitativo y cuantitativo de fitoplancton se detallan en Materiales y Métodos del Capítulo 2.

Durante el período que comprende el presente estudio, el Lago Rodó se caracterizó por una concentración de  $\text{PO}_4$  alta y variable (promedio =  $1.18 \pm 1.02 \mu\text{M PO}_4$ ) en comparación los valores típicamente no detectables del nutriente (Capítulo 2). El fósforo total ( $\text{P}_T$ ) fue relativamente estable (promedio =  $6.15 \pm 1.9 \mu\text{M}$ ), mientras que el nitrógeno total ( $\text{N}_T$ ) fue promedialmente menor a datos previos (promedio =  $157.2 \pm 72.1 \mu\text{M}$ ; rango =  $56.5 - 262.8 \mu\text{M}$ ). El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) fue significativamente menor a los valores previos a 2006 (Capítulo 2) y fluctuó entre  $1.3 - 33.2 \mu\text{M}$ , con valores predominantemente no detectables de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) y nitrito. La concentración de amonio varió desde valores indetectables a valores altos (máx. =  $24.0 \mu\text{M}$ ). Esta disminución de NID y aumento de  $\text{PO}_4$  resultó en una relación estequiométrica N:P baja y muy variable (relación atómica  $\text{NID}:\text{PO}_4 = 9.3 \pm 9.8$ ). Las concentraciones mínimas de clorofila *a* ( $\text{Clo } a$ ) durante el período de estudio fueron las menores de los últimos 5 años, fluctuando entre  $45.7 - 208.6 \mu\text{g l}^{-1}$  (promedio =  $109.0 \pm 43.8 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ ).

## Preincubación de muestras de fitoplancton y determinación del crecimiento

Debido a la baja relación NID:PO<sub>4</sub> presente en el lago durante el período de estudio y para prevenir una limitación del crecimiento por N en las incubaciones de fitoplancton, se realizó una preincubación de la muestra original con NO<sub>3</sub>, excepto cuando se constató disponibilidad del nutriente. La muestra original se subdividió en 12 réplicas de 350 ml cada una, las que fueron prefiltradas por una red de 80 µm de malla e inmediatamente incubadas a una intensidad de luz de 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (fotoperíodo de 12 y 9 horas de luz y oscuridad, respectivamente) y mantenidas en un baño con termostato (25 ± 0.5 °C). Para prevenir la limitación del crecimiento por disminución del CO<sub>2</sub> y la sedimentación del fitoplancton, cada réplica fue constantemente burbujeada con aire previamente mezclado con agua Milli-Q® (Millipore) y filtrado con filtros estériles. Las réplicas fueron incubadas en botellas de cultivo esterilizadas (Simax – Rep. Checa). De las 12 réplicas originales, 6 se incubaron sin la adición de NO<sub>3</sub>, de las cuales tres fueron usadas como control (C, sin adición de nutrientes) y tres se destinaron para la adición posterior de fosfato (+P); a las seis muestras restantes se les aplicó 250 µM KNO<sub>3</sub> (+N). Luego de 40 horas de iniciada la preincubación se aplicó el mismo tratamiento de pulsos de fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a las réplicas +P y +N que el aplicado para la determinación de la incorporación de [<sup>32</sup>P] fosfato. A tres réplicas +N se les aplicó un pulso de concentración alto y otro bajo (AB+N) y un pulso bajo y otro alto (BA+N) a las restantes tres (el tratamiento inverso). Al tratamiento +P se le aplicó la misma concentración de fosfato que a BA+N. Los tratamientos aplicados y las determinaciones se esquematizan en la Tabla 5-1.

Tabla 5-1. Descripción temporal de la aplicación de los tratamientos (\*) y determinaciones analíticas (+) realizadas durante las incubaciones (ver texto por abreviaciones).

tiempo (h)	tratamiento	determinaciones	C	+P	AB+N	BA+N
0	- inicio de incubación (luz y temp.)	- Clo <i>a</i>	*	*	*	*
		- análisis de fitoplancton - pigmentos in vivo	+	+	+	+
	- 250 µM KNO <sub>3</sub>				*	*
40	- pulso alto y bajo de [ <sup>32</sup> P] PO <sub>4</sub>	- pigmentos in vivo - incorporación de PO <sub>4</sub> - análisis de fitoplancton - polifosfatos	+	+	+	+
64		- Clo <i>a</i> - pigmentos in vivo	+	+	+	+
90		- pigmentos in vivo	+	+	+	+
140		- Clo <i>a</i> - pigmentos in vivo	+	+	+	+

El crecimiento se midió de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 4. No se realizaron incubaciones paralelas en los experimentos de incorporación de [<sup>32</sup>P] que se muestran en la Figura 5-5 y 5-7B.

## Determinación de la incorporación neta de fosfato

Las suspensiones de fitoplancton para la determinación de la incorporación neta de [<sup>32</sup>P] fosfato provinieron de los tratamientos +P, AB+N y BA+N, de la muestra original del Lago Rodó. Luego de 40 horas del inicio de la preincubación se tomó una alícuota de 20 ml de cada una de las réplicas +P, AB+N y BA+N, previo a la adición de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (ver cuadro explicativo). Las tres alícuotas correspondientes a cada tratamiento se integraron en un volumen final de 60 ml para cada tratamiento. Estos tratamientos fueron incubados con las mismas condiciones de luz y temperatura

que las usadas para la preincubación. Se agitaron suavemente con agitador magnético 30 min antes de iniciar la adición de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato y durante el transcurso del experimento. El [ $^{32}\text{P}$ ] fue suministrado por PerkinElmer ( $370 \text{ MBq ml}^{-1}$ ) y utilizado luego de la dilución con fosfato no radiactivo. Para excluir una respuesta fisiológica al incremento externo de fosfato por la acumulación intracelular del recurso, el tratamiento consistió en la aplicación de la misma concentración total de [ $^{32}\text{P}_e$ ] a las tres submuestras integradas (AB+N, BA+N y +P), dosificada en el mismo patrón de pulsos en orden inverso: un pulso de  $3 \mu\text{M}$  seguido de  $1 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato a AB+N y un pulso de  $1 \mu\text{M}$  seguido de  $3 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato a BA+N. A la submuestra +P se aplicaron las mismas concentraciones que a BA+N. Posteriormente se comparó la cinética de incorporación de fosfato entre las submuestras luego del agregado de dos pulsos consecutivos de  $2 \mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato a cada una. Dependiendo de la actividad de incorporación se siguió la remoción de [ $^{32}\text{P}_e$ ] hasta el día siguiente, si es indicado en las figuras correspondientes. La determinación de la incorporación neta de fosfato por fitoplancton en dichas submuestras se realizó de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 2.

#### Análisis de la cinética de incorporación

Se utilizó la relación flujo-fuerza de Falkner et al. (1989) entre la tasa de incorporación y la fuerza impulsora de ese proceso para la determinación del coeficiente de conductividad ( $L_p$ ) y el valor umbral de fosfato [ $P_e$ ]<sub>A</sub> como se muestra en el Capítulo 2. Para el análisis de la dependencia lineal y no lineal de dicha relación se utilizó la expresión completa de la ecuación de acuerdo a lo detallado en el Capítulo 3. Asimismo, la determinación de los valores umbrales medidos experimentalmente ( $[P'_e]_A$ ), el tiempo de exposición del fitoplancton al fosfato externo ( $t_E$ ), el regraficado Thellier de los datos de incorporación de fosfato (Thellier 1970) y la confianza del método utilizado se detallan en el Capítulo 3.

#### Tinción de gránulos de polifosfato

La tinción de los gránulos de polifosfato se realizó para microscopía óptica con las incubaciones con fosfato no radiactivo y luego de la incorporación del fosfato aplicado. La alícuota que se utilizó para la tinción se obtuvo de la integración de tres réplicas de cada tratamiento. Se utilizó básicamente el método de Fuhs (1973). Se tomaron alícuotas de 10 ml de cada una de las réplicas de los tratamientos y se integraron en 30 ml. Posteriormente se centrifugaron y el subnadrante se fijó con una solución 2.5% Glutaraldehído con buffer HEPES-KOH a pH 7.6. Luego de lavado del fitoplancton con agua Milli-Q, se impregnaron con  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  a pH 3.5 (buffer acetato-acido acético) por 20 min. Las muestras fueron lavadas nuevamente y expuestas a una solución incolora y saturada con  $\text{Na}_2\text{S}$  en  $\text{NH}_3$  (25%) por 2 min. Para visualizar los gránulos de polifosfato se usó campo claro en un microscopio óptico Olympus a 1000 aumentos (Olympus, Tokio, Japón).

## Resultados

#### Respuesta cinética de la incorporación de fosfato al orden de la secuencia de pulsos

Para determinar si la secuencia de pulsos previos de fosfato produce alteraciones cinéticas y energéticas en la incorporación de fosfato, se aplicaron pulsos altos y bajos a dos submuestras de fitoplancton, pero en orden inverso: una submuestra fue expuesta a un pulso de fosfato alto y otro

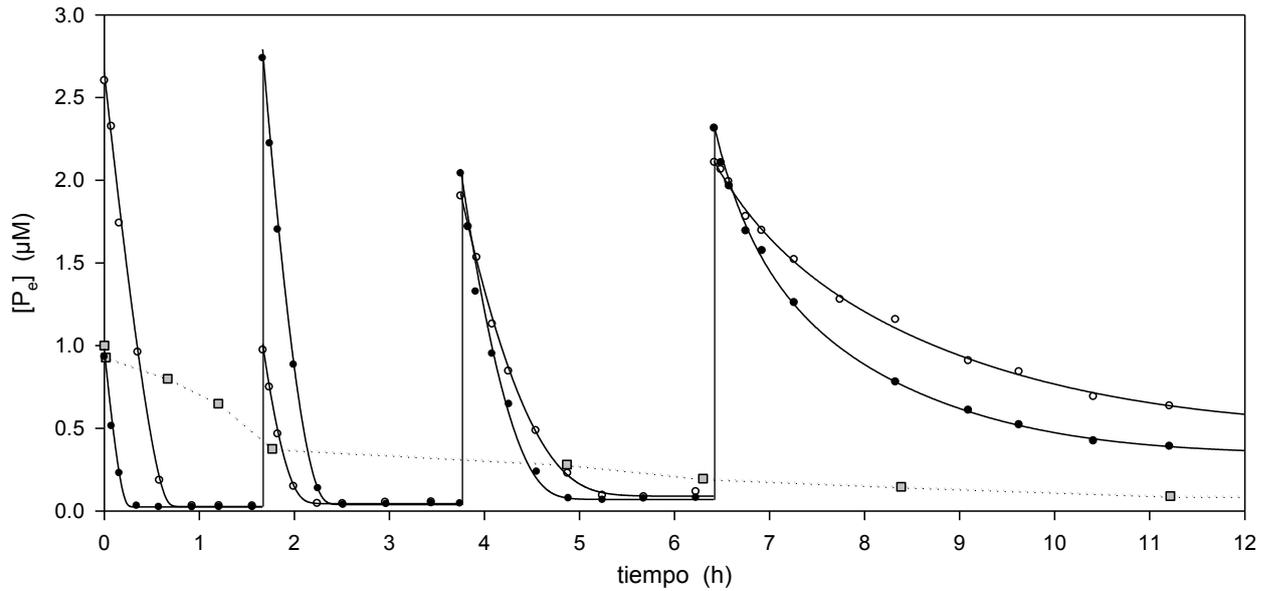


Figura 5-1. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en tres submuestras de fitoplancton (AB+N: círculos blancos, BA+N: círculos negros y +P: cuadrados grises) incubadas a partir de la misma muestra original obtenida del Lago Rodó. La preincubación consistió en el agregado de  $250 \mu\text{M KNO}_3$  a AB+N y BA+N, 41 horas antes de la aplicación de  $[^{32}\text{P}]$  que se muestra en la figura. El tratamiento +P no recibió adición de  $\text{KNO}_3$ . Se muestra la remoción de 1 pulso de  $3 \mu\text{M}$  seguido de otro pulso de  $1 \mu\text{M}$  por AB+N y 1 pulso de  $1 \mu\text{M}$  más otro de  $3 \mu\text{M}$  a BA+N. Posteriormente se aplicaron 2 pulsos de  $2 \mu\text{M}$  a cada tratamiento +N. Se muestra la remoción de fosfato luego de la adición de  $1 \mu\text{M}$  a +P (debido a la baja tasa inicial de incorporación no se prosiguió con los siguientes pulsos). Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado con la relación lineal de flujo-fuerza en el primer pulso y no lineal en los subsiguientes. Los parámetros de los ajustes se muestran en la tabla 5-2.

Tabla 5-2. Parámetros del ajuste de las curvas de remoción de fosfato de la figura 5-1, en dos submuestras de fitoplancton AB+N y BA+N de incubaciones +N de fitoplancton proveniente del Lago Rodó.  $L_p$ : coeficiente de conductividad; L: coeficiente de conductividad de la ecuación no lineal;  $[P_e]_A$ : concentración umbral esperada  $\pm$   $\text{IC}_{99\%}$ ; m: exponente entero  $>1$  del término no lineal de la relación flujo-fuerza; n: número de alícuotas incluidas en el ajuste;  $r^2$ : coeficiente de determinación.

submuestra	pulso	$L_p$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	L ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	$[P_e]_A$ ( $\mu\text{M}$ )	m	n	$r^2$
AB+N	1	$19.1 \cdot 10^{-3}$	—	$0.026 \pm 0.130$	—	8	0.9982
	2	$15.8 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.044 \pm 0.018$	3	9	0.9997
	3	$9.3 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.090 \pm 0.053$	3	9	0.9993
	4	$5.2 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$0.493 \pm 0.068$	5	12	0.9979
BA+N	1	$25.7 \cdot 10^{-3}$	—	$0.024 \pm 0.044$	—	8	0.9978
	2	$18.3 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.039 \pm 0.029$	3	9	0.9999
	3	$12.2 \cdot 10^{-3}$	$0.6 \cdot 10^{-3}$	$0.070 \pm 0.159$	3	9	0.9939
	4	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$0.341 \pm 0.069$	5	11	0.9988

bajo (AB), mientras que la otra recibió los mismos pulsos en orden inverso (BA). El experimento de la Figura 5-1 muestra la remoción de fosfato por dos submuestras provenientes de la preincubación con  $\text{NO}_3$  (+N) de la muestra original tomada del lago Rodó (ver Materiales y métodos). Una tercera submuestra se mantuvo bajo las mismas condiciones sin adición de  $\text{NO}_3$  (+P). A partir de entonces, se aplicaron dos pulsos de  $3 \mu\text{M}$  y  $1 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato a la submuestra AB+N, mientras que en la submuestra BA+N se aplicaron en orden inverso. Una vez alcanzado el valor umbral por ambas submuestras, se aplicaron dos pulsos consecutivos de  $2 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato para comparar la cinética

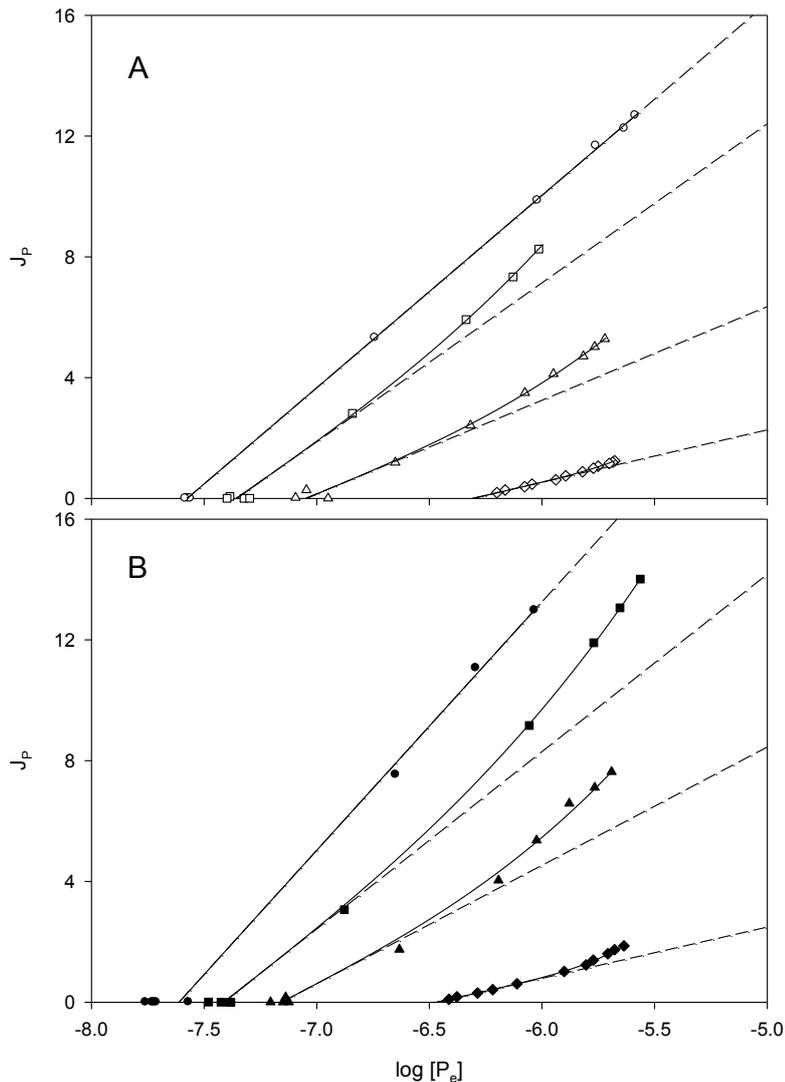


Figura 5-2. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la figura 5-1, para los tratamientos AB+N (A) y BA+N (B). Círculos: primer pulso, cuadrados: segundo pulso, triángulos: tercer pulso y rombo: cuarto pulso. La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol } P_i \text{ (mg Clo } a \text{ h)}^{-1}$  y el log  $[P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

de incorporación del nutriente. El fitoplancton duplicó el contenido de fósforo total ( $P_T$ ) de la muestra una vez que se incorporaron los pulsos aplicados. La biomasa de fitoplancton en el momento del experimento fue  $413.7 \pm 24.4 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$  y  $430.8 \pm 39.7 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ , en la submuestra AB+N y BA+N respectivamente. El  $B_T$  de fitoplancton de las incubaciones AB+N y BA+N, respectivamente, a 83.9 y 86.6% a cianobacterias (46.9 y 57.3% *Planktothrix agardhii*; 24.2 y 13.8% *Planktolyngbya sp.*; 6.2 y 5.6% *Raphidiopsis mediterranea*; 6.0 y 9.7% *Anabaena sp.* y 0.6 y 0.2 *Microcystis sp.*), 7.1 y 8.8% a dinoflagelados, 5.6 y 0.0% a criptofitas, 2.5 y 1.4% a crisófitas, 0.7 y 2.0% a clorfitas (*Monoraphidium sp.* y *Scenedesmus sp.*) y 0.3 y 1.2% a diatomeas (*Synedra sp.*). La Clo  $a$  de submuestra +P fue cuatro veces inferior ( $102.9 \pm 19.0 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ ) respecto de AB+N y BA+N. Las concentraciones umbrales de fosfato luego de la aplicación de los pulsos en orden invertido fueron esencialmente las mismas en ambas submuestras (solapamiento de los  $IC_{99\%}$ , Tabla 5-2). Los coeficientes de conductividad  $L_p$  durante el primer pulso aplicado a cada submuestra fueron significativamente diferentes (GLM-ANCOVA,

$p \ll 0.01$ , Fig. 5-1, Tabla 5-2). Estas diferencias en  $L_p$  entre las submuestras se reflejaron en el  $t_E$  acumulado durante los dos primeros pulsos ( $t_E = 85.4$  y  $67.0$  min, AB+N y BA+N, respectivamente). Esta diferencia entre los tratamientos se acentuó en el siguiente pulso comparativo de  $2 \mu\text{M}$  fosfato, aunque sin diferencias significativas de  $[P_e]_A$  (Tabla 5-2). El  $[P_e]_A$  se incrementó significativamente en ambos tratamientos luego del cuarto pulso (Tabla 5-2), con el mayor valor umbral determinado en el fitoplancton que recibió primero la concentración alta de fosfato (AB+N). La remoción del primer pulso de fosfato por el fitoplancton del tratamiento +P (sin adición de  $\text{NO}_3$ ) se mantuvo durante ca. 12 horas. El gráfico Thellier del flujo  $J_p$  vs  $\log [P_e]$  obtenido de la Figura 5-1 muestra la disminución de  $J_p$  entre el primer y segundo pulso en AB+N ( $12.7$  y  $8.4 \mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ , primer y segundo pulso, respectivamente) (Fig. 5-2A). En contraste, el fitoplancton en BA+N mantuvo aproximadamente el mismo  $J_p$  entre ambos pulsos iniciales ( $13.2$  y  $14.1 \mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$  primer y segundo pulso, respectivamente) (Fig. 5-2B). Se observó una pérdida de la linealidad a partir del segundo pulso, la cual tendió a linealizarse en los pulsos consecutivos. Esta tendencia a la linealización fue más pronunciada en la submuestra que recibió el primer pulso alto (AB+N, Fig. 5-2A).

Para determinar si se produce una mayor respuesta cinética se analizó un caso similar al anterior, pero con una mayor diferencia en el  $t_E$  acumulado en los dos primeros pulsos entre las submuestras (AB+N y BA+N). Se sometió una muestra del Lago Rodó a la misma preincubación con  $\text{NO}_3$  y al mismo patrón de pulsos de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato que los aplicados en el experimento de la Figura 5-1 (Fig. 5-3). En este caso, la concentración de *Clo a* fue menor que en el experimento anterior ( $\text{Clo } a = 277.3 \pm 3.4 \mu\text{g l}^{-1}$  y  $280.2 \pm 14.0 \mu\text{g l}^{-1}$ , AB+N y BA+N respectivamente). El  $B_T$  de las incubaciones AB+N y BA+N de fitoplancton correspondió respectivamente: 91.0 y 89.4% a cianobacterias (82.0 y 82.3% *P. agardhii*; 7.6 y 5.1% *Anabaena sp.*; 1.8 y 0.0% *Planktolyngbya sp.*; 0.1 y 2.0% *R. mediterranea*), 6.6 y 0.7% a diatomeas (*Synedra sp.*), 2.1 y 2.5% a clorfitas (*Monoraphidium sp.* y *Scenedesmus sp.*), 0.0 y 4.1% a criptofitas, 0.0 y 2.5% a crisófitas, y 0.3 y 0.7% a dinoflagelados. El tratamiento +P tuvo una concentración de *Clo a* menor ( $143.1 \pm 12.3 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y una baja tasa de incorporación ( $< 1.0 \text{ nM min}^{-1}$ ), respecto de AB+N y BA+N. La velocidad de remoción del  $[^{32}\text{P}_e]$  del pulso inicial fue levemente menor al caso previo en ambos tratamientos (Tabla 5-3); sin embargo, las concentraciones umbrales fueron mayores en el tratamiento AB+N luego de cada pulso. Las mayores diferencias en  $L_p$ , con respecto al caso anterior, entre las submuestras (GLM-ANCOVA,  $p \ll 0.01$ , Tabla 5-3) determinaron un mayor  $t_E$  acumulado durante los dos primeros pulsos ( $t_E = 91.9$  y  $66.1$  min AB+N y BA+N, respectivamente) (Fig. 5-2). Conjuntamente con un aumento del valor umbral se determinó una progresiva diferencia en  $L_p$ , la cual resultó dos veces inferior en AB+N con respecto a BA+N, luego del último pulso. Esta diferencia determinó que  $[P_e]$  permaneciera elevada por un mayor período de tiempo (Fig. 5-3) y que la remoción del nutriente se detuviera a un mayor valor umbral (Tabla 5-3). El gráfico Thellier del flujo  $J_p$  vs  $\log [P_e]$  obtenido de la Figura 5-3 muestra la disminución de  $J_p$  entre el primer y segundo pulso en  $S_1$  ( $17.9$  y  $13.4 \mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ , primer y segundo pulso, respectivamente) (Fig. 5-4A). En contraste, y de forma similar al caso previo, el fitoplancton en  $S_2$  mantuvo aproximadamente el mismo  $J_p$  entre ambos pulsos iniciales ( $19.8$  y  $19.5 \mu\text{mol P}_i$  ( $\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$  primer y segundo pulso, respectivamente) (Fig. 5-4B).

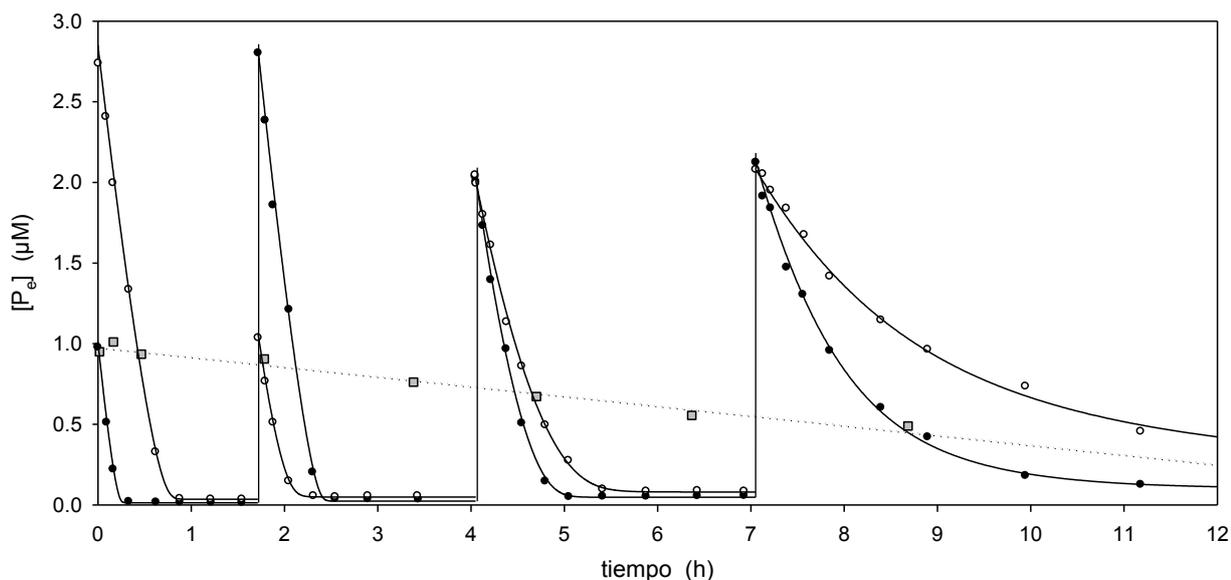


Figura 5-3. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en tres submuestras de fitoplancton (BA+N: círculos negros, AB+N: círculos blancos y +P: cuadrados grises) incubadas a partir de la misma muestra original obtenida del Lago Rodó. La preincubación consistió en el agregado de  $250 \mu\text{M KNO}_3$  a BA+N y AB+N, 41 horas antes de la aplicación de  $[^{32}\text{P}]$  que se muestra en la gráfica. El tratamiento +P no recibió adición de  $\text{KNO}_3$ . Se muestra la remoción de 1 pulso de  $1 \mu\text{M}$  seguido de otro pulso de  $3 \mu\text{M}$  por BA+N y 1 pulso de  $3 \mu\text{M}$  más otro de  $1 \mu\text{M}$  a AB+N. Posteriormente se aplicaron 2 pulsos de  $2 \mu\text{M}$  a cada tratamiento +N. Se muestra la remoción de fosfato luego de la adición de  $1 \mu\text{M}$  a +P (línea punteada representa la regresión lineal,  $r^2 = 0.97$ ). Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado con la relación lineal de flujo-fuerza en el primer pulso y no lineal en los subsiguientes. Los parámetros de los ajustes se muestran en la Tabla 5-3.

Tabla 5-3. Parámetros del ajuste de las curvas de remoción de fosfato en dos submuestras de fitoplancton AB+N y BA+N mostrados en la Figura 5-3.  $L_p$ : coeficiente de conductividad; L: coeficiente de conductividad de la ecuación no lineal;  $[P_e]_A$ : concentración umbral esperada  $\pm \text{IC}_{99\%}$ ; m: exponente entero  $>1$  del término no lineal de la relación flujo-fuerza; n: número de alícuotas incluidas en el ajuste;  $r^2$ : coeficiente de determinación.

submuestra	pulso	$L_p$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	L ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	$[P_e]_A$ ( $\mu\text{M}$ )	m	n	$r^2$
AB+N	1	$18.8 \cdot 10^{-3}$	—	$0.035 \pm 0.065$	—	8	0.9995
	2	$19.1 \cdot 10^{-3}$	$0.2 \cdot 10^{-3}$	$0.049 \pm 0.012$	3	8	0.9999
	3	$9.6 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.080 \pm 0.057$	3	11	0.9992
	4	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$0.184 \pm 0.133$	3	10	0.9969
BA+N	1	$21.2 \cdot 10^{-3}$	—	$0.014 \pm 0.004$	—	8	1.0000
	2	$18.9 \cdot 10^{-3}$	—	$0.024 \pm 0.131$	—	8	0.9977
	3	$10.8 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.048 \pm 0.060$	3	11	0.9992
	4	$2.1 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$0.103 \pm 0.088$	3	10	0.9986

Se investigó el alcance y la persistencia de los cambios energéticos y cinéticos a largo plazo con una muestra del Lago Rodó ( $\text{Clo } a = 107.8 \pm 4.4 \mu\text{g l}^{-1}$ ). En este caso el fitoplancton presentó deficiencia moderada por fosfato, por lo cual no fue necesario preincubar la muestra con  $\text{NO}_3$ . El  $B_T$  de la comunidad de fitoplancton correspondió 97.2% a cianobacterias (82.0% *P. agardhii*; 14.1% *R. mediterranea*; 0.6% *Limnothrix sp.*; 0.5% *Planktolyngbya sp.* y 0.1 % *Anabaena sp.*), 1.2% a diatomeas (*Aulacocaira granulata*) y 1% a criptofitas y dinoflagelados. Debido a la menor biomasa fitoplanctónica y a la deficiencia moderada por fosfato, se aplicaron pulsos de menor concentración que en los casos anteriores. Se aplicó un pulso de  $1 \mu\text{M}$  y  $0.5 \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato a la submuestra AB y

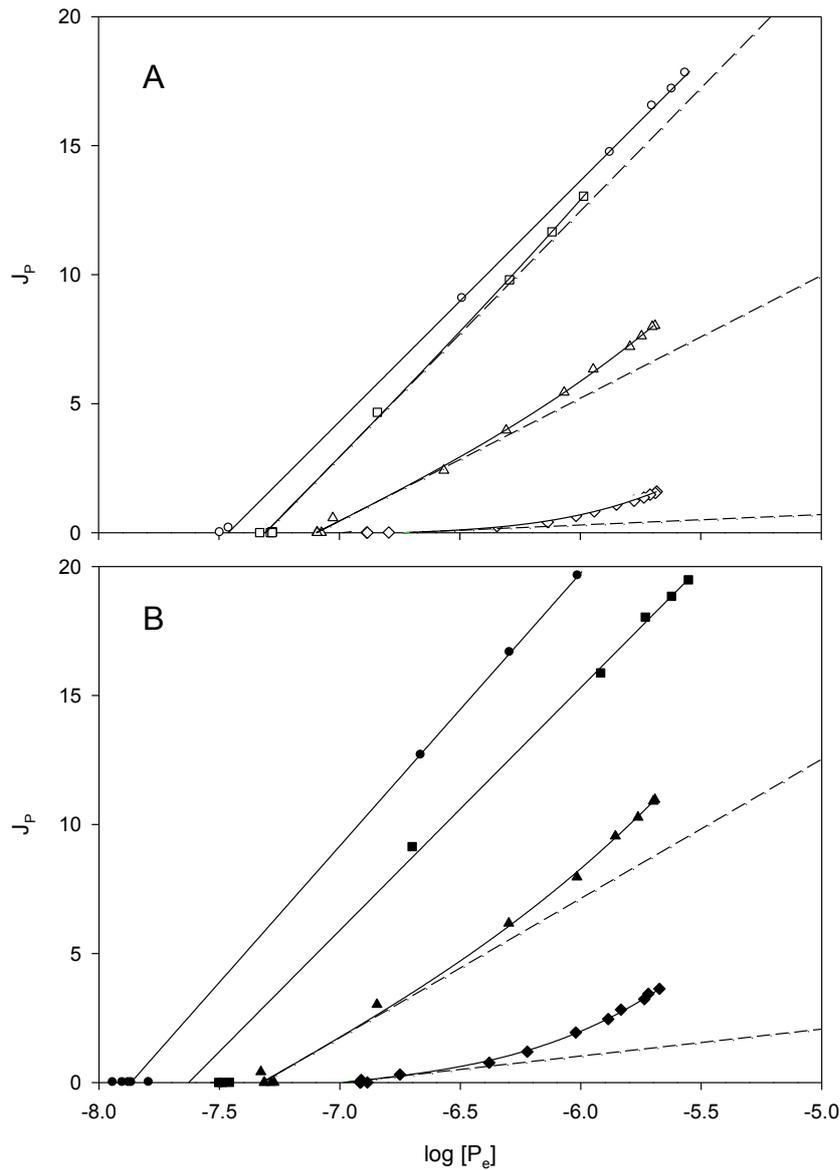


Figura 5-4. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 5-3, para los tratamientos AB+N (A) y BA+N (B). Círculos: primer pulso, cuadrados: segundo pulso, triángulos: tercer pulso y rombo: cuarto pulso. La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol } P_i \text{ (mg Clo a h)}^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

en forma inversa a la BA (Fig. 5-5). La remoción de ambos pulsos de  $[^{32}\text{P}]$  persistió por más de 12 horas. A las 24 horas de iniciado el proceso, se determinó que ambas submuestras alcanzaron la misma concentración umbral ( $[P'_e]_A = 0.074 \mu\text{M}$ , AB y BA). El fitoplancton de AB removió el primer pulso agregado con un  $L_p$  correspondiente a la mitad del de BA (GLM-ANCOVA,  $p < 0.01$ , Fig. 5-6). Esta diferencia entre  $L_p$  se incrementó a cinco veces en la siguiente adición (GLM-ANCOVA,  $p < 0.01$ , Tabla 5-4). La diferencia en  $L_p$  contribuyó a obtener marcadas diferencias en  $t_E$ : la submuestra AB tuvo 217 min más  $t_E$  que BA ( $t_E = 720$  min y 503 min, AB y BA, respectivamente). Posteriormente al tiempo 24 h se aplicó un pulso de  $0.2 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato a ambas submuestras para comparar la cinética de incorporación. La submuestra AB detuvo la incorporación inmediatamente a un valor alto (AB:  $[P_e]_A = 0.185 \mu\text{M } [^{32}\text{P}]$  fosfato,  $IC_{99\%} = \pm 0.043 \mu\text{M}$ ), mientras que BA mantuvo la

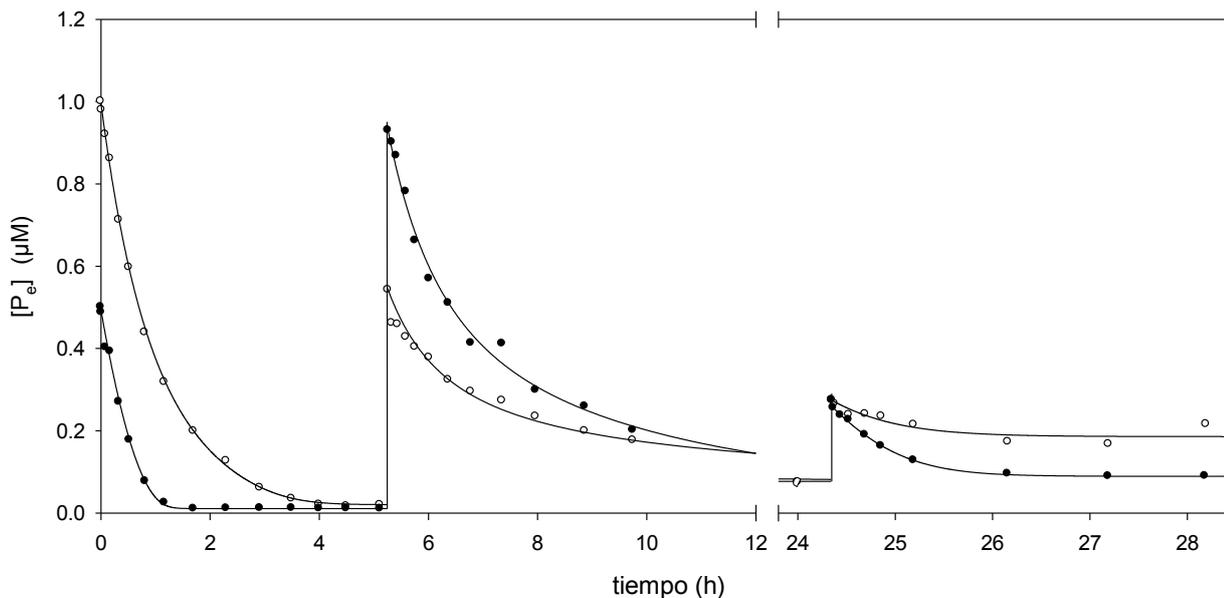


Figura 5-5. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton (AB: círculos blancos y BA: círculos negros) obtenidas del Lago Rodó. La gráfica muestra la remoción de 1 pulso de  $1\ \mu\text{M}$  seguido de otro pulso de  $0.5\ \mu\text{M}$  por AB y 1 pulso de  $0.5\ \mu\text{M}$  más otro de  $1\ \mu\text{M}$  a BA. Posteriormente se aplicó 1 pulso de  $0.2\ \mu\text{M}$  a cada submuestra. Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado con la relación no lineal de flujo-fuerza en los primeros y segundos pulsos y lineal en los terceros. Los parámetros de los ajustes se muestran en la Tabla 5-4.

Tabla 5-4. Parámetros del ajuste de las curvas de remoción de fosfato por dos submuestras de fitoplancton AB y BA mostrados en la Figura 5-5.  $L_p$ : coeficiente de conductividad;  $L$ : coeficiente de conductividad de la ecuación no lineal;  $[P_e]_A$ : concentración umbral esperada;  $m$ : exponente entero  $>1$  del término no lineal de la relación flujo-fuerza;  $n$ : número de alícuotas incluidas en el ajuste;  $r^2$ : coeficiente de determinación.

submuestra	pulso	$L_p$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	$L$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )	$[P_e]_A$ ( $\mu\text{M}$ )	$m$	$n$	$r^2$
AB+N	1	$0.90 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$	0.020	5	15	0.9994
	2	$0.12 \cdot 10^{-3}$	$0.1 \cdot 10^{-3}$	0.057	5	13	0.9997
	3	$5.64 \cdot 10^{-3}$	–	0.186	–	9	0.8220
BA+N	1	$1.85 \cdot 10^{-3}$	$0.1 \cdot 10^{-3}$	0.011	3	15	0.9969
	2	$0.54 \cdot 10^{-3}$	$0.1 \cdot 10^{-3}$	0.076	5	13	0.9932
	3	$3.75 \cdot 10^{-3}$	–	0.089	–	10	0.9990

incorporación hasta alcanzar un valor aproximado al determinado previo al pulso (BA:  $[P_e]_A = 0.089\ \mu\text{M}$   $[^{32}\text{P}]$  fosfato,  $IC_{99\%} = \pm 0.006\ \mu\text{M}$ ) (Fig. 5-5). La relación entre  $J_p$  y  $\log [P_e]$  fue aproximada a la linealidad en el primer pulso de BA, mientras en AB abarcó un menor rango de concentración (Fig. 5-6). La región lineal disminuyó en los siguientes pulsos y se reestableció luego de 24 horas.

En la Figura 5-7 se muestran dos experimentos con fitoplancton del Lago Rodó preincubados con N, en los cuales no se obtuvo diferencias en las cinéticas de incorporación de fosfato entre los tratamientos de pulsos altos y bajos aplicados en forma invertida, AB+N y BA+N (solapamiento del  $IC_{99\%}$ , datos no mostrados). En el primer caso (Fig. 5-7A), el pulso de mayor concentración ( $2\ \mu\text{M}$  fosfato) fue removido por el fitoplancton en un tiempo cercano a 40 min y el pulso menor se subdividió en varios de rango nanomolar (6 pulsos de  $100\ \text{nM}$  fosfato). Estos pulsos bajos de fosfato fueron aplicados a un intervalo de tiempo tal que, cada incremento fue incorporado previo a

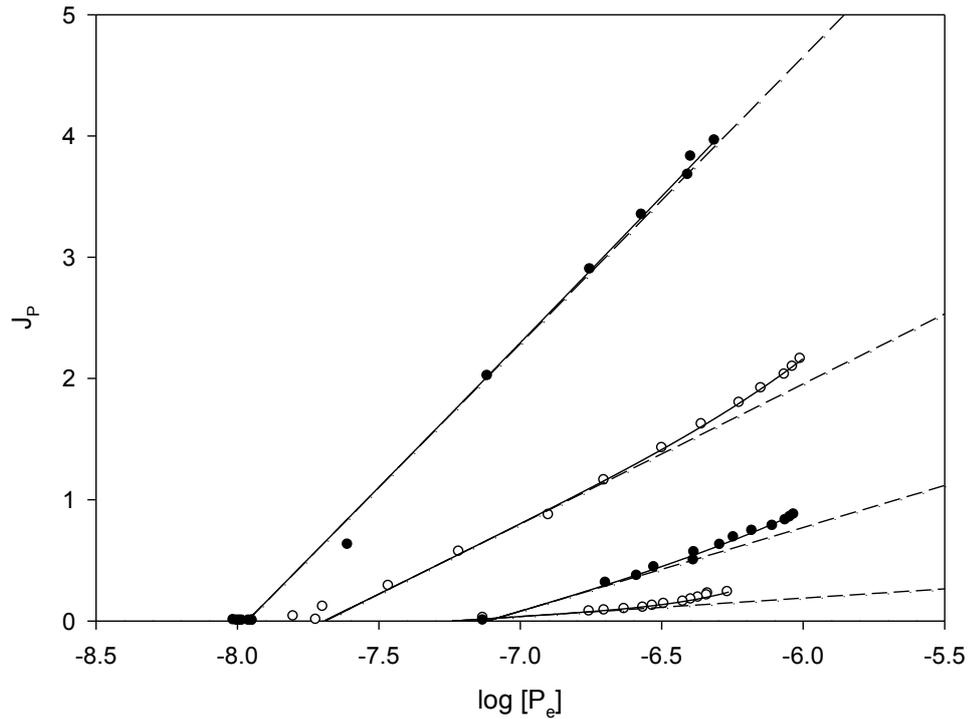


Figura 5-6. Gráfico Thellier de la dependencia del flujo de incorporación de fosfato ( $J_p$ ) en el logaritmo de la concentración externa  $[P_e]$ , obtenido de los transcurros de tiempo del experimento de la Figura 5-5, para los tratamientos AB (símbolos blancos) y BA (símbolos negros). La línea punteada representa la extrapolación del término lineal calculado con los mismos parámetros de la ecuación ajustada. El flujo neto ( $J_p$ ) está expresado en  $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo a h})^{-1}$  y el  $\log [P_e]$  es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

la siguiente adición. En estos casos, los pulsos subsiguientes de igual concentración inicial mostraron esencialmente los mismos valores umbrales entre AB+N y BA+N ( $[P'_e]_A = 0.107 \pm 0.013 \mu\text{M}$  y  $0.097 \pm 0.009 \mu\text{M}$ , AB+N y BA+N respectivamente) (Fig. 5-7A). Se observó una convergencia de las respuestas al aumentar las concentraciones umbrales en ambos tratamientos cuando la secuencia de pulsos bajos (5 pulsos de  $0.25 \mu\text{M}$ ) fue realizada a un intervalo de tiempo menor que el caso anterior (Fig. 5-7B). De esta forma, cada adición de fosfato no fue completamente incorporada antes de recibir la siguiente. En este caso, ambos tratamientos convergieron en valores umbrales más altos ( $[P'_e]_A = 0.272 \pm 0.043 \mu\text{M}$  y  $0.302 \pm 0.018 \mu\text{M}$ , AB+N y BA+N respectivamente).

Los experimentos presentados en este capítulo mostraron que, cuando se aplica una secuencia de pulsos de fosfato a submuestras de fitoplancton en dos modalidades, un pulso de concentración alta y otro menor a una submuestra y a la otra los mismos pulsos pero en orden inverso, se producen alteraciones cinéticas y energéticas de la incorporación de fosfato. El experimento de la Figura 5-3 mostró mayores diferencias en  $L_p$  y  $[P'_e]_A$  que el experimento de la Figura 5-1. La diferencia de  $t_E$  entre las submuestras durante los pulsos inversos fue mayor en el experimento de la Figura 5-3 (18.4 y 25.8 min, experimentos de las Figuras 5-1 y 5-3, respectivamente). El experimento de la Figura 5-5 mostró que, bajo una deficiencia moderada del fitoplancton por fosfato, la tasa baja de remoción de concentraciones de fosfato menores pueden resultar en mayores diferencias de  $t_E$  (217 min) y que estos cambios cinéticos pueden ser persistentes por más de 24 horas. Cuando los pulsos de fosfato de concentración menor se aplicaron de forma espaciada

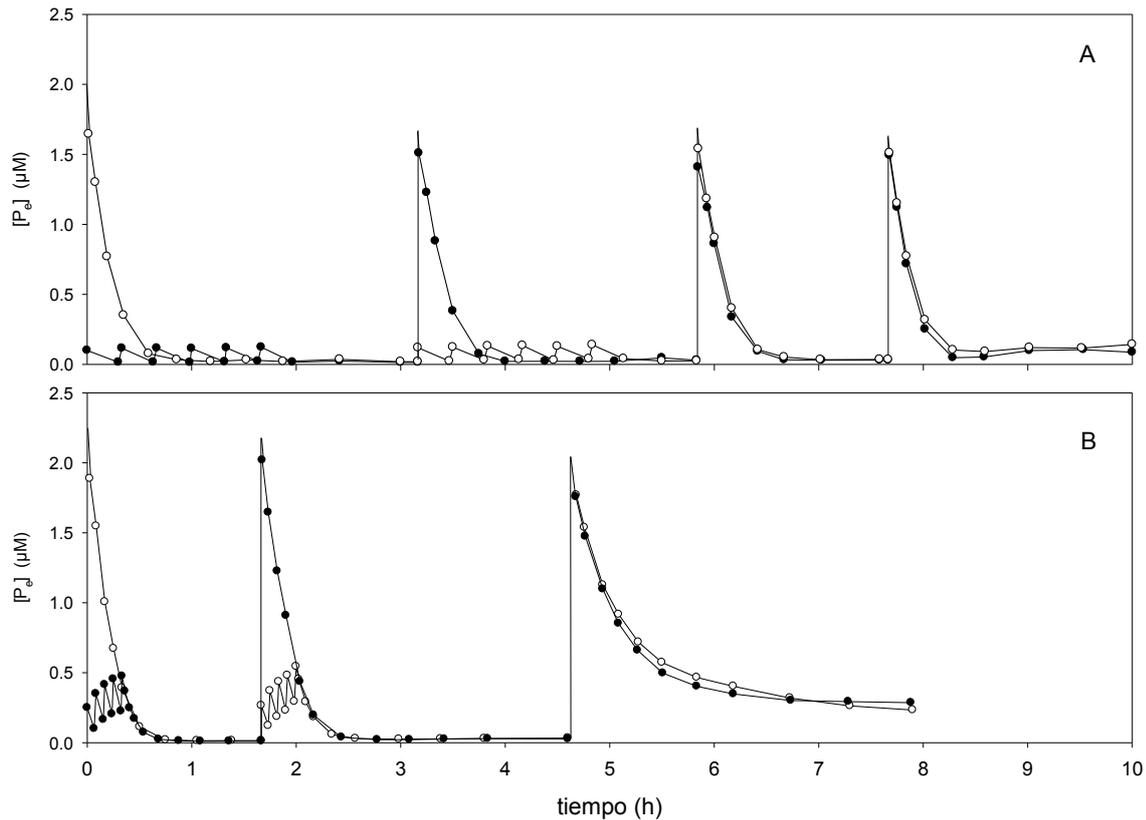


Figura 5-7. Transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos muestras de fitoplancton del Lago Rodó. A: Remoción de 1 pulso de  $2\ \mu\text{M}$  seguido de 6 pulsos de  $0.1\ \mu\text{M}$  por la submuestra AB (círculos blancos) y la secuencia inversa de pulsos aplicados a BA (círculos negros). Posteriormente se aplicaron 2 pulsos de  $1.5\ \mu\text{M}$  a cada submuestra. B: Remoción de 1 pulso de  $2.5\ \mu\text{M}$  seguido de 5 pulsos de  $0.25\ \mu\text{M}$  por la submuestra AB (círculos blancos) y la secuencia inversa de pulsos aplicados a BA (círculos negros). Posteriormente se aplicaron 2 pulsos de  $2.0\ \mu\text{M}$  a cada submuestra.

o a intervalos cortos, no se observaron diferencias en el comportamiento de incorporación entre las submuestras (AB y BA) (Fig. 5-7).

#### Efecto de la secuencia de pulsos en la formación de polifosfato

La Figura 5-8 muestra la formación de polifosfato (PP) en filamentos de cianobacteria deficiente por fosfato tomadas del Lago Rodó. La determinación de PP se realizó 30 min después de la adición de  $10\ \mu\text{M}$  fosfato. Se observa que, bajo estas condiciones experimentales, la acumulación de PP puede ocupar un importante volumen del citoplasma. Se realizó la tinción de gránulos de PP en submuestras paralelas al experimento que se muestra en la Figura 5-5. Estas submuestras fueron expuestas al mismo patrón de pulsos que en dicho experimento, pero utilizando fosfato no radiactivo. La tinción se realizó luego de 28 horas de iniciado el experimento y una vez finalizado el proceso de incorporación. La Figura 5-9 muestra seis microfotografías de una submuestra control (C), a la cual no se le aplicaron pulsos de fosfato. En esta submuestra no se observó presencia de gránulos oscuros característicos. La tinción fue positiva en la submuestra BA, la cual recibió  $0.5\ \mu\text{M}$  y  $1\ \mu\text{M}$  fosfato (Fig. 5-10). La formación de gránulos en filamentos de *Planktothrix agardhii* se caracterizó por un conjunto de puntos en la zona central del filamento (Fig. 5-10B, F y G), mientras que en la diatomea *Aulacoseira granulata* se observó un menor número de gránulos de PP pero de mayor tamaño (Fig. 5-10C y D).

El diámetro de los gránulos en los filamentos de las cianobacterias fue de 0.1 – 0.5  $\mu\text{m}$ , mientras que en la diatomea fue sensiblemente mayor (2 – 3  $\mu\text{m}$  de diámetro). La submuestra que recibió primero el pulso de mayor concentración y que incrementó el valor umbral al final del tratamiento (AB), mostró una menor presencia de PP que en las mismas especies registradas en BA y en algunos casos la ausencia de los mismos (Fig. 5-11).

#### Efecto de la secuencia de pulsos en el crecimiento

Se determinaron diferencias significativas en el crecimiento de fitoplancton en el experimento que mostró la mayor alteración de la cinética de incorporación de fosfato (ver Fig. 5-3). La Figura 5-12 muestra el transcurso de la absorbancia in vivo de los principales pigmentos fotosintéticos y turbidez, en incubaciones expuestas en forma paralela al mismo patrón de pulsos del experimento de la Figura 5-3 usando fosfato no radiactivo. Se observó una marcada diferencia en el crecimiento de las muestras tratadas con  $\text{NO}_3$  (+N) en comparación con C y +P durante todo el transcurso del experimento. Se determinaron diferencias en las tasas de crecimiento a partir de la aplicación del tratamiento con la secuencia de pulsos invertidos (>53 h), las que fueron significativamente mayores en AB+N ( $p < 0.05$  KW) (Tabla 5-5). El incremento en BA+N alcanzó el estado estacionario luego de 100 h en las absorbancias mayores a 650 nm (Fig. 5-12). Debido a que AB+N mantuvo un incremento relativamente constante, las absorbancias finales determinadas en todas las longitudes de onda fueron significativamente mayores que las de BA+N ( $p < 0.05$  KW, AB+N) (Fig. 5-12). La extracción de Clo *a* del fitoplancton muestra una duplicación de la biomasa para los tratamientos +N con respecto a C y +P a las 70 horas, sin observarse diferencias entre las incubaciones AB+N y BA+N, como tampoco entre C y +P (Fig. 5-13). El mayor crecimiento en las incubaciones AB+N se confirmó al tiempo 142 h, el cual fue significativamente mayor que el de las respectivas BA+N ( $p < 0.05$  KW). Este aumento fue de ca. 15 % (51.0  $\mu\text{g}$  Clo *a*  $\text{l}^{-1}$ ).

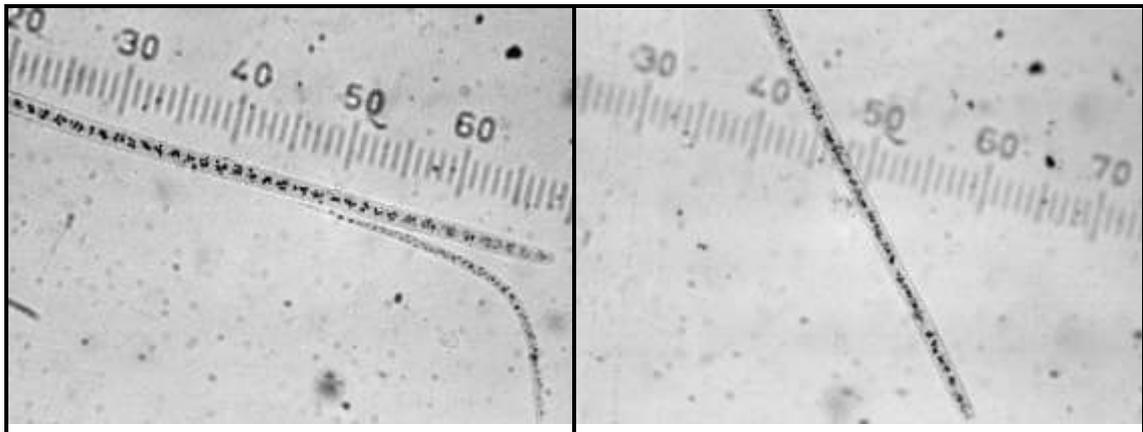


Fig. 5-8. Formación de gránulos de polifosfato por fitoplancton deficiente por fosfato obtenido del Lago Rodó (puntos oscuros intracelulares). La tinción se realizó 30 min luego de la aplicación de 10  $\mu\text{M}$  fosfato. A: *Planktothrix agardhii* (pa) y *Raphidiopsis mediterranea* (rm), B: *P. agardhii*. La escala esta expresada en micrómetros.

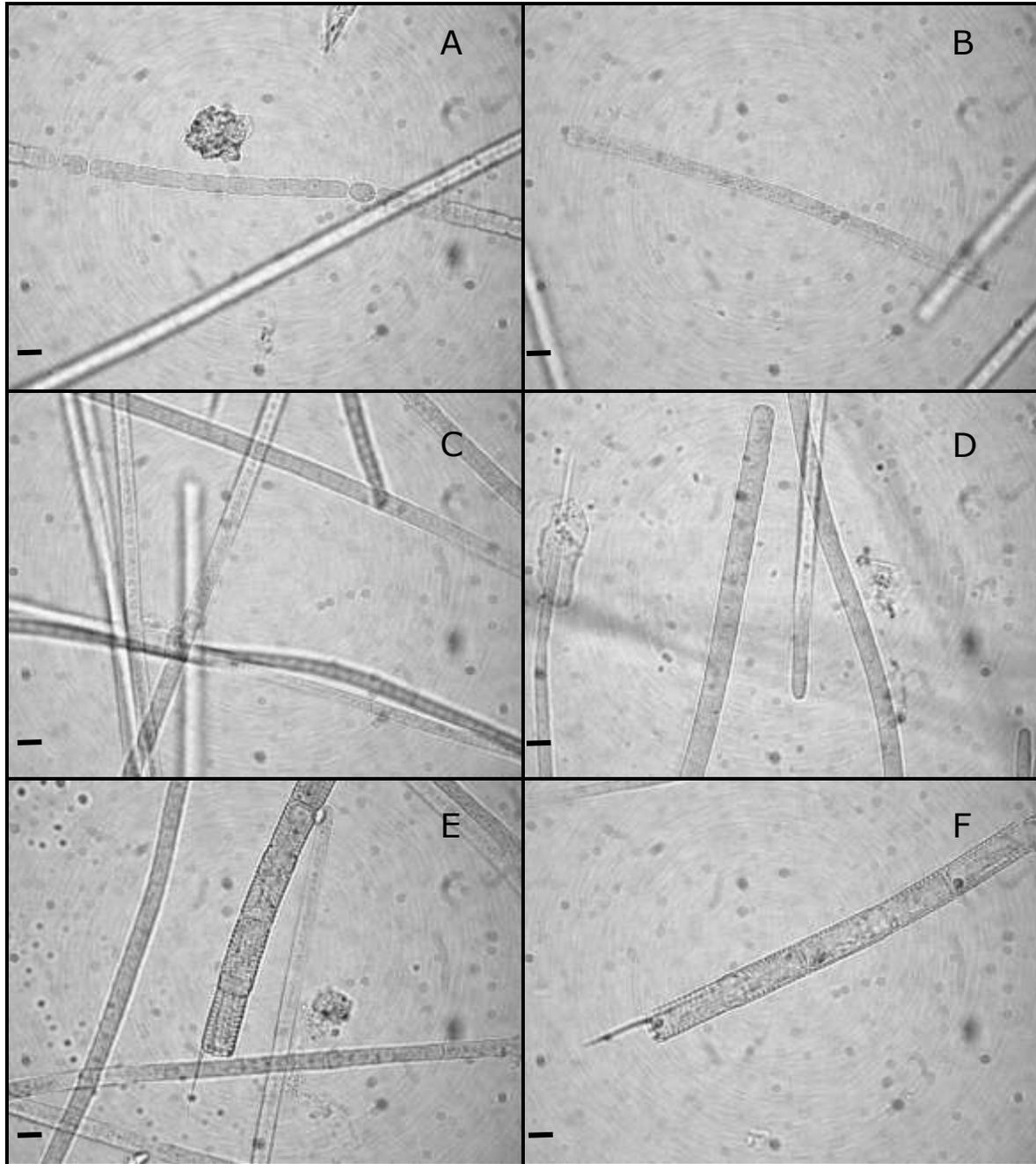


Figura 5-9. Micrografías ópticas de fitoplancton tratado con el procedimiento de tinción de polifosfato y sin la aplicación de pulsos de fosfato (control) proveniente del experimento mostrado en la Figura 5-5. La tinción se realizó a 28 horas de iniciada la incubación. A: *Anabaena sp.*; B, C y D: *Planktothrix agardhii*; E y F: *Aulacoseira granulata*. Las barras horizontales representan 5 µm.

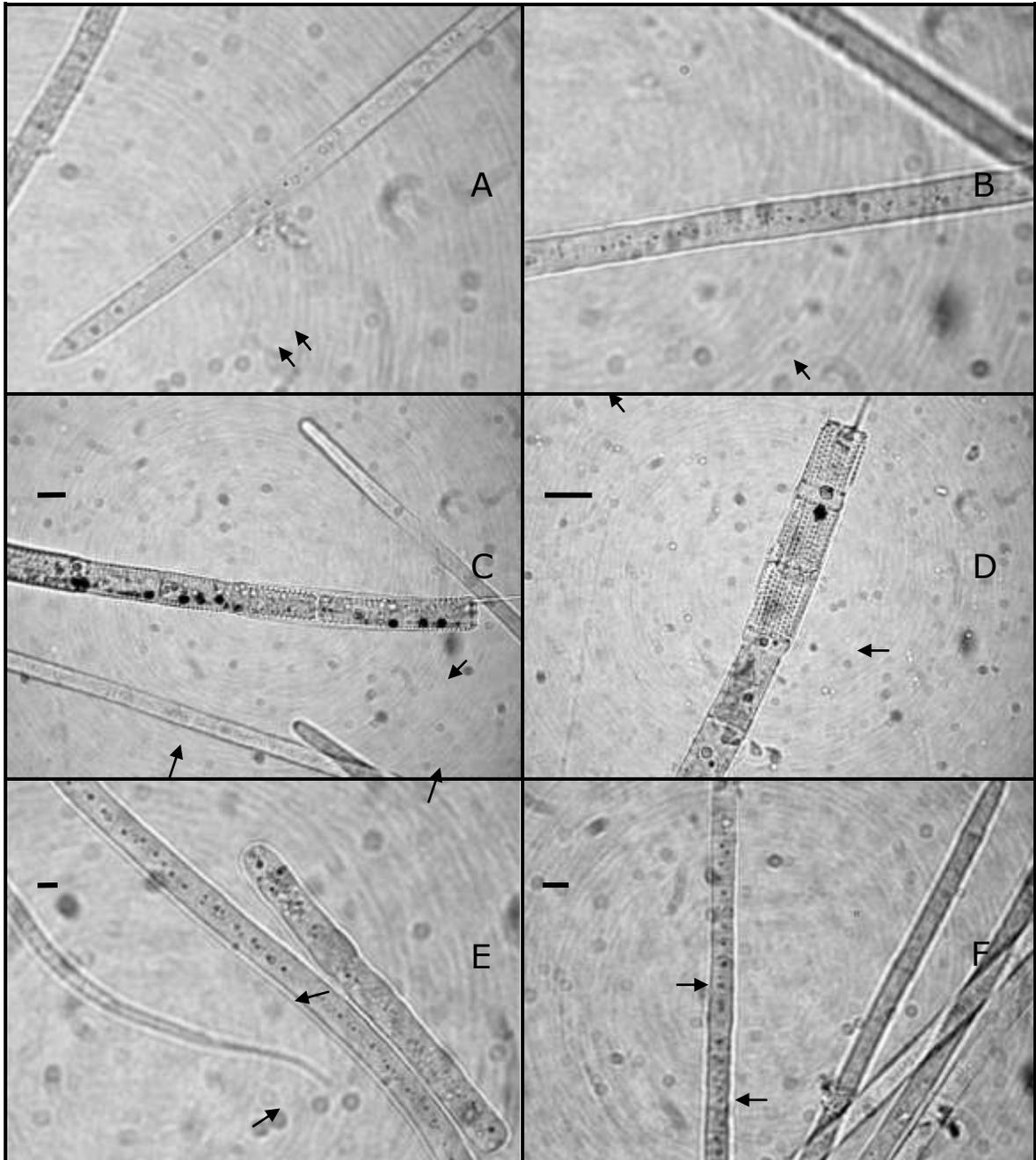


Figura 5-10. Micrografías ópticas de fitoplancton tratado con el procedimiento de tinción de polifosfato proveniente del experimento mostrado en la Figura 5-5 y correspondiente a la submuestra BA (t = 28 h). La tinción se realizó luego de la aplicación de tres pulsos de fosfato: 0.5 µM, 1 µM y 0.2 µM fosfato. A, B, E, F: *Planktothrix agardhii*; C y D: *Aulacoseira granulata*. Las flechas indican la presencia de gránulos de polifosfato. Las barras horizontales representan 5 µm.

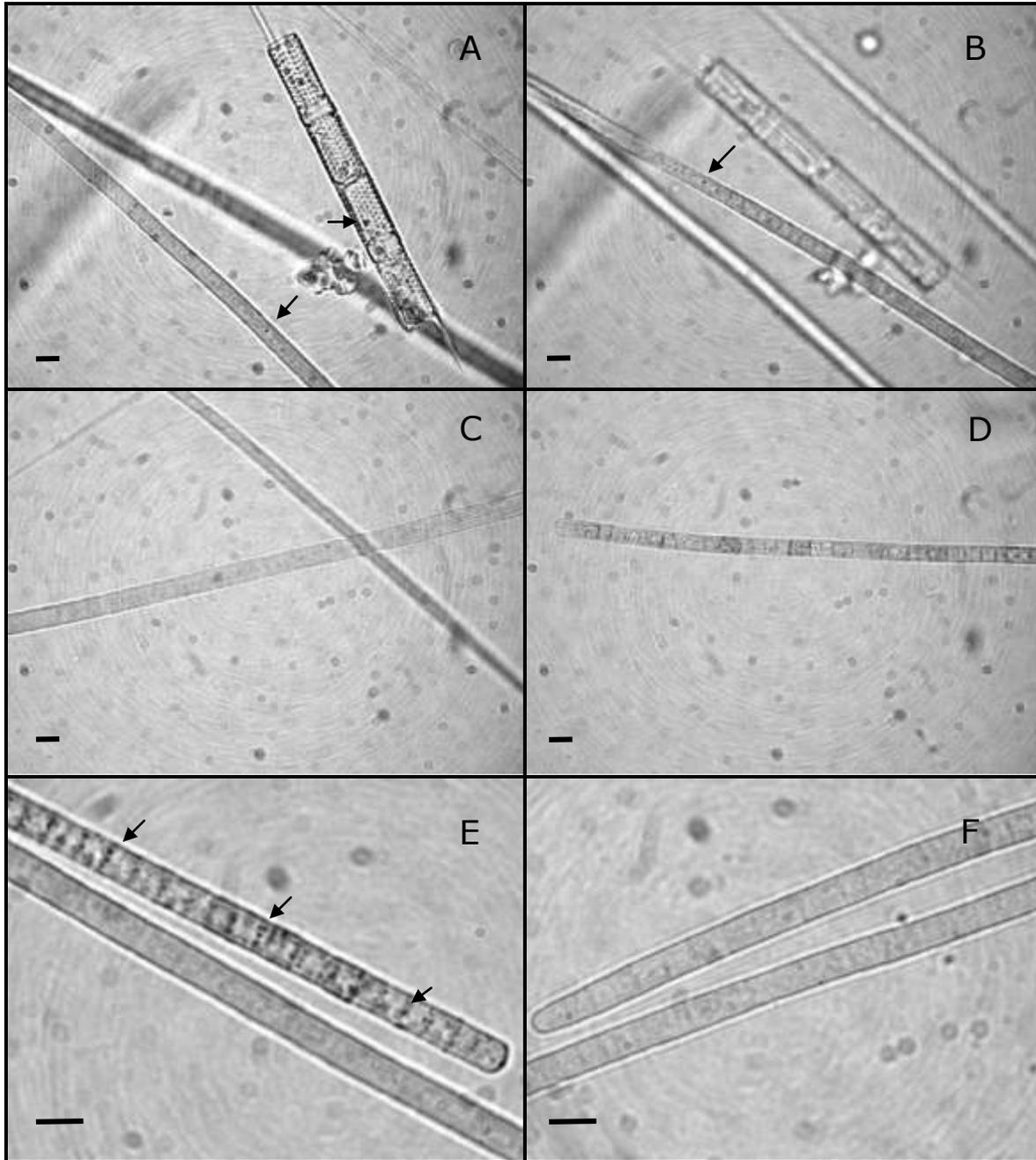


Figura 5-11. Micrografías ópticas de fitoplancton tratado con el procedimiento de tinción de polifosfato proveniente del experimento mostrado en la Figura 5-5 y correspondiente a la submuestra AB ( $t = 28$  h). La tinción se realizó luego de la aplicación de tres pulsos de fosfato: 1, 0.5 y 0.2  $\mu\text{M}$  fosfato. A: *Aulacoseira granulata* y *Planktothrix agardhii*; B, C, D, E, F: *Planktothrix agardhii*. Las flechas indican la presencia de gránulos de polifosfato. Las barras horizontales representan 5  $\mu\text{m}$ .

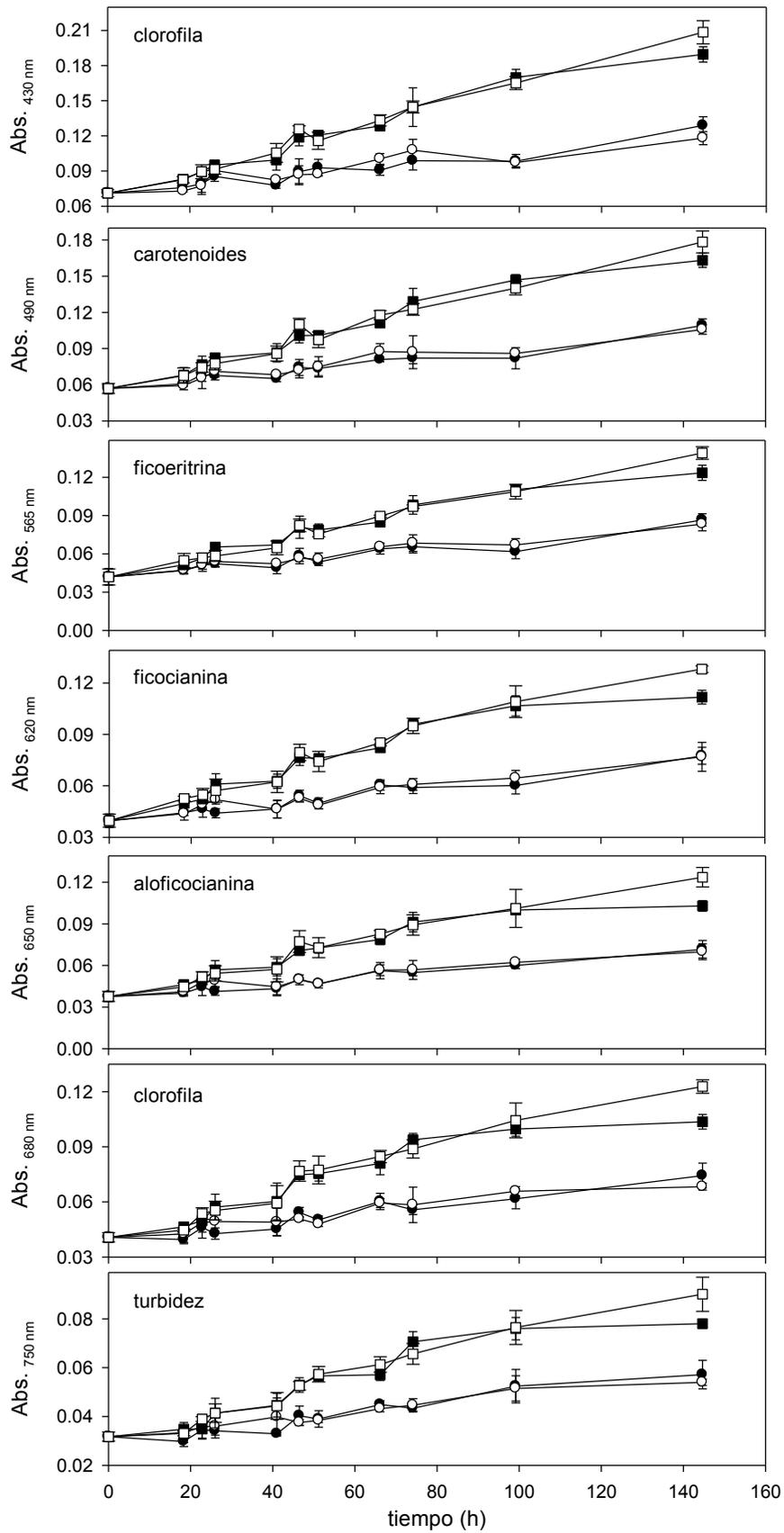


Figura 5-12. Transcurso de la absorbancia in vivo de los principales pigmentos fotosintéticos y turbidez, de incubaciones expuestas en forma paralela al mismo patrón de pulsos del experimento mostrado en la Figura 5-3. Círculos negros: control; círculos blancos: tratamiento con fosfato +P; cuadrados negros: preincubación con  $\text{NO}_3$  y un pulso bajo y alto de fosfato BA+N; cuadrados blancos: preincubación con  $\text{NO}_3$  y un pulso alto y bajo de fosfato AB+N. A los dos últimos tratamientos se les agregó dos pulsos consecutivos de igual concentración (ver detalles en el texto). Los símbolos y las barras de error representan la media y el desvío estándar de tres incubaciones independientes, respectivamente.

Tabla 5-5. Tasas de crecimiento expresada como el incremento de las absorbancias de fitoplancton in vivo a partir de  $t = 75$  h de las incubaciones de la Figura 5-12. Clo: clorofila, Car: carotenoides, Fce: ficoeritrina, Fca: ficocianina, Alo: Aloficocianina, Trb: turbidez. C: control; +P: tratamiento con fosfato; BA+N: preincubación con  $\text{NO}_3$  y un pulso bajo y alto de fosfato; AB+N: preincubación con  $\text{NO}_3$  y un pulso alto y bajo de fosfato.

Pigmento y Absorbancia (nm)	C ( $\cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ )	+P ( $\cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ )	BA+N ( $\cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ )	AB+N ( $\cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ )
Clo <sub>430</sub>	1.85	1.24	0.97	3.41
Car <sub>490</sub>	2.66	1.30	1.33	4.72
Fce <sub>565</sub>	2.39	1.84	1.52	4.88
Fca <sub>620</sub>	2.76	2.34	2.10	4.63
Alo <sub>650</sub>	3.29	2.29	3.48	6.04
Clo <sub>680</sub>	3.86	2.67	4.85	7.93
Trb <sub>750</sub>	4.56	1.84	6.13	9.11

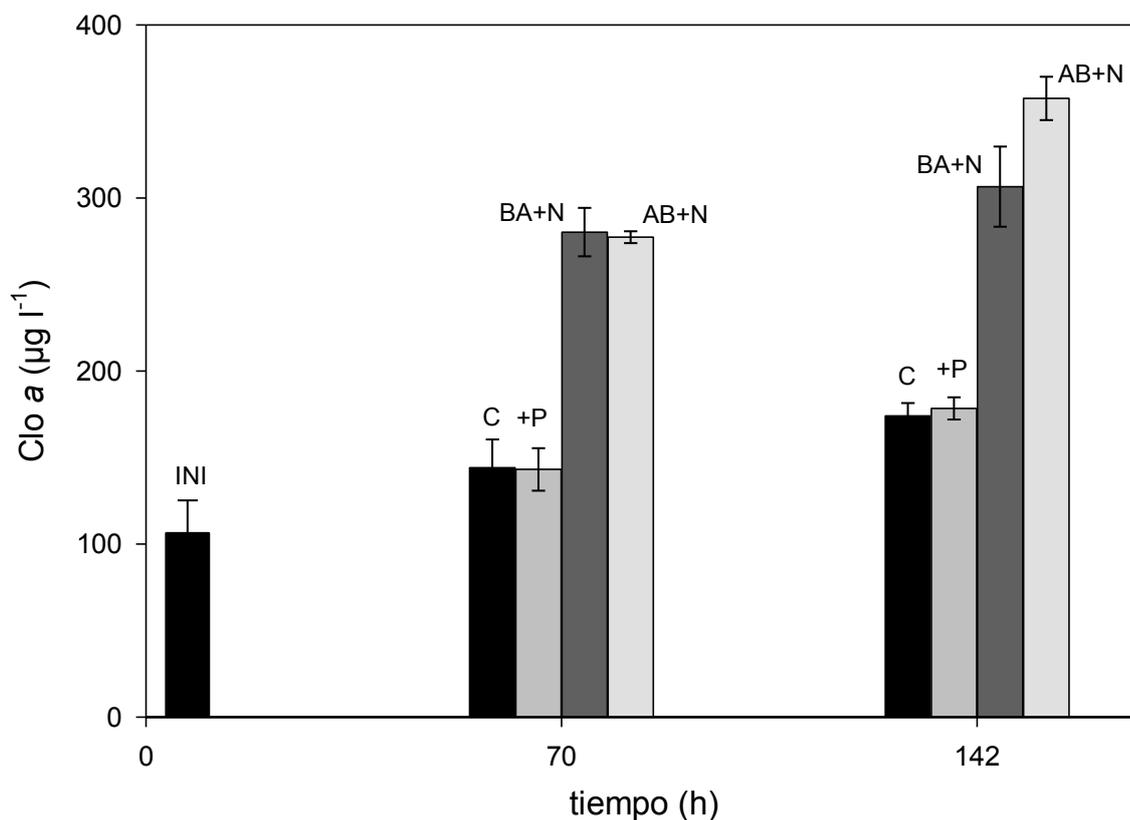


Figura 5-13. Comparación del transcurso del incremento de la concentración de clorofila *a* (Clo *a*) en las mismas incubaciones que se muestran en la Figura 5-12. INI: concentración inicial; C: control; +P: tratamiento con fosfato; BA+N: preincubación con  $\text{NO}_3$  y un pulso bajo y alto de fosfato; AB+N: preincubación con  $\text{NO}_3$  y un pulso alto y bajo de fosfato. Las tasas de crecimiento entre  $t = 70$  y  $142$  h fueron: C =  $0.51 \mu\text{g Clo } a \text{ h}^{-1}$ ; +P =  $0.48 \mu\text{g Clo } a \text{ h}^{-1}$ ; BA+N =  $0.37 \mu\text{g Clo } a \text{ h}^{-1}$ ; AB+N =  $1.11 \mu\text{g Clo } a \text{ h}^{-1}$ . Las barras verticales y las barras de error representan la media y el desvío estándar de tres incubaciones independientes, respectivamente.

En el experimento que se determinó una menor respuesta del fitoplancton a la secuencia de pulsos inversos, no se determinaron diferencias significativas en el crecimiento entre los tratamientos AB+N y BA+N. En el experimento de la Figura 5-1 se observaron diferencias no significativas entre las incubaciones +N al final del experimento ( $p > 0.05$ ) (t: 160 h). Estos valores medios de Clo *a* fueron levemente mayores en AB+N (Clo *a* =  $250.1 \pm 63.0$  y  $220.0 \pm 67.0$   $\mu\text{g l}^{-1}$ , AB+N y BA+N respectivamente). Cuando las concertaciones aplicadas y los intervalos de exposición al fosfato produjeron respuestas estables e iguales (Fig. 5-7A), el efecto en el crecimiento fue también equivalente. La concentración de Clo *a* a las 72 y 142 horas de iniciada la incubación fue levemente mayor en AB+N aunque no significativa (Clo *a* 142 h =  $931.4 \pm 108.9$   $\mu\text{g l}^{-1}$  y  $870.7 \pm 92.8$   $\mu\text{g l}^{-1}$ , en AB+N y BA+N respectivamente).

## Discusión

### Sensibilidad de la respuesta al orden de la sucesión de pulsos de fosfato

En el presente trabajo se mostró que el fitoplancton es capaz de adaptar sus propiedades cinéticas de incorporación de fosfato a la secuencia en que se suceden los incrementos previos de la concentración externa de fosfato. Esta respuesta de la cinética muestra la complejidad del comportamiento de incorporación, particularmente si se considera que los incrementos a los que el fitoplancton estuvo expuesto fueron idénticos. Entonces, la secuencia temporal de los pulsos originó la correspondiente diferencia en el comportamiento cinético subsiguiente. La única información disponible al respecto, es un estudio que demostró recientemente la respuesta adaptativa de la cianobacteria filamentosa *Anabaena variabilis* a una secuencia similar de incrementos de fosfato (Falkner et al. 2006). En este estudio, el fenómeno mostrado se debería a que el fitoplancton modificó sus propiedades de incorporación durante el transcurso de la remoción del primer pulso alto de fosfato externo, evidenciado en la disminución inicial de  $J_p$ . Estas nuevas propiedades constituyeron el estado inicial a partir del cual se produjo la adaptación cinética subsiguiente. Esta respuesta fue interpretada como un "reconocimiento" de pulsos (Falkner et al. 2006), el cual requeriría de algún tipo de almacenamiento y transferencia de esta información, para determinar el tipo de adaptación cinética a las alteraciones ambientales siguientes. Para que exista esta transferencia de información desde el ambiente al organismo, un cambio en el ambiente debe causar un cambio en la estructura y/o fisiología del organismo, según Bateson (2000). Esta propiedad transferible de los estados adaptados de la cinética, de un pulso de fosfato al siguiente, puede explicar la amplificación de la respuesta observada en este estudio y en los capítulos anteriores (ej. Capítulo 3, Fig. 3-8; Capítulo 4). Asimismo, estas nuevas propiedades cinéticas fueron mantenidas por el fitoplancton luego de 24 horas de ocurrida la fluctuación externa. Al igual que lo mostrado en el Capítulo 4 de la presente tesis, el estado adaptado de la cinética fue mantenido luego de iniciado el crecimiento celular. Por lo tanto, la combinación de resultados en cultivos de *A. variabilis* y las evidencias con fitoplancton natural presentadas en este trabajo, permite postular que la transferencia de las adaptaciones cinéticas del comportamiento de incorporación es una propiedad característica del fitoplancton dominado por cianobacterias. Entonces, las propiedades cinéticas de incorporación de fosfato por la comunidad de fitoplancton reflejan la historia reciente de las fluctuaciones del nutriente en el ambiente.

La principal respuesta de la cinética consistió en la disminución progresiva de  $J_p$  y del coeficiente de conductividad  $L_p$  en el fitoplancton que experimentó primero el pulso de mayor concentración. Esta respuesta se amplificó a medida que se aplicaron nuevos pulsos. Aunque se determinó un incremento significativo del valor umbral, éste fue menos considerable que en los experimentos con diferentes patrones de concentraciones externas (Capítulo 3 y 4). El fitoplancton que recibió la secuencia inversa de pulsos también modificó su cinética, pero en menor medida. En general, el modo de incorporación durante el primer pulso mantuvo una relación lineal entre  $J_p$  y el log  $[P_e]$ . En estos casos, los sistemas de incorporación funcionan con propiedades que les permiten adquirir el nutriente con eficiencia óptima a la concentración externa prevaleciente (Falkner et al. 1994). Como se describió en los capítulos anteriores de esta tesis, el modo eficiente de operación del sistema es caracterizado por la extensión del rango de validez de la proporcionalidad entre la tasa de incorporación y la fuerza impulsora de este proceso (Thellier 1970, Stucki 1980, Stucki et al. 1983, Falkner et al. 1993). Los resultados mostraron que la disminución de  $L_p$  fue acompañada de una disminución de la región lineal, a la vez que el fitoplancton que inició antes este proceso, mostró una pérdida más temprana de dicha extensión de la linealidad. A un mayor tiempo de exposición  $t_E$ , el modo de incorporación tendió a linealizarse (o a presentar una relación menos no lineal) en el último pulso (Fig. 5-2A y 5-4A). En los tratamientos paralelos en los que el  $t_E$  fue menor, se pudo observar el inicio del proceso de adaptación cinética (Fig. 5-5) con una pérdida de la linealidad al final de la aplicación de los pulsos. Una vez que se alcanzaron las nuevas propiedades lineales de incorporación, ésta persistió por más de 24 horas. Entonces, puede postularse que la relación no lineal observada es un estado transitorio o "estado adaptativo" de los sistemas de incorporación del fitoplancton, el cual es el resultado de una alteración del "estado adaptado" precedente y que deriva en un nuevo estado adaptado con nuevas propiedades cinéticas (Plaetzer et al. 2005, Falkner et al. 2006). Cabe destacar que este proceso es el resultado del comportamiento de incorporación de un ensamblaje de poblaciones microalgales, cuya complejidad en su composición e historia nutricional dista considerablemente de un cultivo monoespecífico bajo condiciones óptimas de crecimiento. Este comportamiento se refleja en las mediciones realizadas de la incorporación de fosfato por fitoplancton en el Lago Rodó, en condiciones experimentales que no alteraron significativamente su cinética original, resultaron invariablemente en un modo lineal (Aubriot et al. 2000, Capítulo 3 y 4). La mayoría de los casos presentados en este estudio mostraron una desviación de la linealidad como respuesta cinética a una fluctuación externa persistente. Por otro lado, los tiempos de exposición menores producidos por los pulsos iniciales resultaron en propiedades lineales de incorporación e incluso estables, una vez repetida la aplicación. Entonces, podemos especular que las concentraciones aplicadas en los pulsos fueron superiores (primer caso) o inferiores (segundo ejemplo) a las ocurridas previamente en el ambiente, dando lugar a las propiedades cinéticas prevalecientes. La profundización del estudio en dicha respuesta cinética lineal y no lineal permitirá conocer si es posible reflejar de forma directa las fluctuaciones ambientales a las que estuvo expuesto el fitoplancton en un lago y así monitorear las entradas difusas de fosfato, las que no pueden ser detectadas por otras aproximaciones experimentales.

#### Incidencia de la adaptación cinética en el crecimiento y la acumulación de polifosfato

En este trabajo se mostró que la adaptación cinética a la secuencia temporal de pulsos de fosfato externo se asoció con un mayor crecimiento fitoplanctónico. El fitoplancton que modificó su

cinética rápidamente, de acuerdo a la fluctuación externa, pudo producir una mayor biomasa final a expensas de una menor cantidad de fosfato almacenado (Capítulo 4 y Fig. 5-12). En contraste, el fitoplancton que mantuvo una mayor tasa de incorporación ( $J_p$ ) alcanzó primero el estado estacionario de crecimiento (Fig. 5-12). Este resultado muestra el grado de recoordiación que ocurre durante la transición del modo adaptativo de operación al estado adaptado, en el cual las propiedades cinéticas del sistema de incorporación dependiente de la energía es recoordinado con la conversión energética general de la célula (Falkner et al. 1996). Esta recoordiación metabólica incluye cambios en el flujo del carbono asimilado hacia compuestos de reserva rápidamente disponibles para sustentar un mayor crecimiento (Wagner et al. 2000). Como fue expuesto previamente (Capítulo 4), estos resultados muestran una relación más compleja entre la asimilación de fosfato y el crecimiento que la expresada por Droop (1973). En este sentido, especulamos que la capacidad de adaptar rápidamente la cinética de incorporación de fosfato a la fluctuación externa del nutriente, debe ser una propiedad de los organismos que explique la presencia de poblaciones de cianobacteria típicamente persistentes en ecosistemas acuáticos. Asimismo, las especies agrupadas en asociaciones funcionales características del fitoplancton (Reynolds 1997, Kruk et al. 2002) podrían compartir los rangos de sensibilidad de la respuesta cinética para un mismo estímulo, cuya elucidación podría aportar nueva información que permita profundizar en las propiedades fisiológicas que facilitan dichas agrupaciones.

El modelo de Droop postula que la tasa de crecimiento algal será mayor cuanto más polifosfato se haya acumulado previamente. Sin embargo, Istvánovics et al. (2000) mostraron una clara desviación del crecimiento de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* de la relación de Droop, cuando se cultivó bajo la adición de pulsos de fosfato. La adaptación de la cinética del fitoplancton en este estudio ocurrió dentro del mismo rango micromolar de concentración de fosfato en el que ocurre la adaptación de *A. variabilis*, lo que se asoció a su gran capacidad de almacenamiento de fosfato (Falkner & Falkner 2003). Sin embargo, la cantidad y el tamaño de los gránulos de polifosfato no deberían exceder ciertos límites, de lo contrario podrían distorsionar el funcionamiento y estructuras celulares. En este trabajo se observó la formación generalizada de pequeños gránulos de PP, o pocos de gran tamaño, en el fitoplancton que mantuvo una mayor actividad de incorporación de los pulsos externos (Fig. 5-10C, D, E y F). Sin embargo, fue prácticamente indetectable la presencia de gránulos de PP en el fitoplancton que experimentó una mayor adaptación cinética. La ausencia de gránulos de PP se ha observado en *C. raciborskii* bajo modalidades de crecimiento continuo (Istvánovics et al. 2000). Esta discrepancia podría explicarse por una posible diferencia en los grados de condensación del PP (Rhee 1973). Debido a esta aparente plasticidad en la formación de las reservas de fosfato, así como a las desventajas de la acumulación excesiva del nutriente y su efecto relativamente negativo en el crecimiento, la clasificación de especies de fitoplancton en estrategias por acumulación (sensu Sommer 1989) y su aparente ventaja ecológica (ej.: Ducobu et al. 1998, Istvánovics et al. 2000, Mateo et al. 2006), requiere de revisión en el contexto de la capacidad adaptable de la cinética de incorporación de fosfato por el fitoplancton presentada en esta tesis. Se postula que las ventajas para el crecimiento fitoplanctónico dependen de la capacidad de optimización energética de la incorporación del fosfato externo y la resultante regulación del volumen final de las reservas. La disminución del flujo de fosfato podría estar asociada a una posible menor condensación del PP resultante y por lo tanto, a una mejor disponibilidad de las reservas intracelulares del nutriente para el inicio del crecimiento. Cabe esperar que existan diferencias en los rangos de adaptabilidad entre algunos grupos

fitoplanctónicos y en la optimización del uso de las reservas que pueda explicar la persistencia y asociación de algunas especies. La elucidación de estas relaciones interespecíficas requiere de futuros estudios que contemplen un seguimiento del crecimiento específico y el transcurso de la formación, condensación y utilización de las reservas, una vez alcanzado el estado adaptado de la cinética de incorporación de fosfato.

#### Propagación y amplificación de la respuesta cinética

En este trabajo, la propiedad del nuevo estado adaptado de la cinética o "comportamiento lineal" (Falkner et al. 2006) del fitoplancton fue mantenida durante períodos en los cuales no se produjeron nuevos incrementos de la concentración externa. Estos períodos involucran procesos de reconstrucción celular, como la síntesis diferencial de pigmentos fotosintéticos previo al crecimiento para sustentar energéticamente a la división celular (Aubriot 2000). Por lo tanto, esta información (entendida en los términos de Bateson 2000) sobre las fluctuaciones previas sería transferida durante varias generaciones (Falkner & Falkner 2003, Falkner et al. 2006). Durante este transcurso, el comportamiento lineal refleja las condiciones de crecimiento precedentes. Como la adaptación cinética requiere de un cierto tiempo de exposición al fosfato externo ( $t_E$ ), se hipotetiza que el transcurso de la incorporación de fosfato determina la posibilidad de que se produzcan varios pasos de ajustes cinéticos durante la remoción del nutriente. Cada ajuste cinético constituirá la línea de base del siguiente, originándose así la propagación de la respuesta adaptativa en los sucesivos incrementos ambientales. Por esta razón, el transcurso de la remoción conjunta de fosfato por la comunidad sería decisivo para la transferencia de información de un pulso al siguiente (Falkner et al. 2006).

Este proceso de acumulación de los ajustes cinéticos podría explicar cómo es posible la discriminación entre patrones de pulsos de forma tal que resulten en respuestas fisiológicas disímiles. Para simular este proceso se utilizó el modelo Plaetzer et al. (2005), modificado para analizar el comportamiento adaptativo de la comunidad de fitoplancton (Capítulo 3). La modificación tuvo por objeto lograr la conexión de los metabolismos de tres especies fitoplanctónicas al mismo recurso externo, donde  $L_p$  refleja la tasa de remoción relativa a la biomasa y los valores umbrales son inversamente proporcionales al  $\Delta pH$  de la membrana tilacoide (ver Apéndice 1 por más detalles). Para simular el proceso de ajustes cinéticos a los incrementos de concentración externa se utilizaron las ramificaciones condicionales (Plaetzer et al. 2005) aplicadas al caso de tres especies coexistentes (Capítulo 3), con la siguiente precondition: si la concentración externa es mayor al ATP hidrolizado, cambia el gradiente de pH de la membrana tilacoide ( $\Delta pH$ ); si el  $[P_e]$  es menor, se mantienen las propiedades anteriores más activas (estado inicial). Se simuló la remoción de fosfato por una comunidad bajo dos modalidades de pulsos externos: alto-bajo (AB) y viceversa (BA). En este caso, los valores de  $\Delta pH$  resultantes del transcurso de la remoción de cada pulso fueron utilizados como los parámetros iniciales para el cálculo de la cinética de remoción del pulso siguiente (Fig. 5-14A). En la simulación del primer pulso, el fitoplancton que recibió la concentración baja mantuvo las propiedades originales de incorporación, mientras que durante la remoción del pulso mayor se produjo un cambio de propiedades en el punto de discontinuidad en la pendiente de la curva. El proceso de incorporación resultante fue destacablemente similar a las respuestas observadas en los experimentos con fitoplancton, debido a la progresiva reducción de la actividad de incorporación. La formación de PP muestra como en el caso BA, las tres especies adquieren una mayor proporción de reservas que en

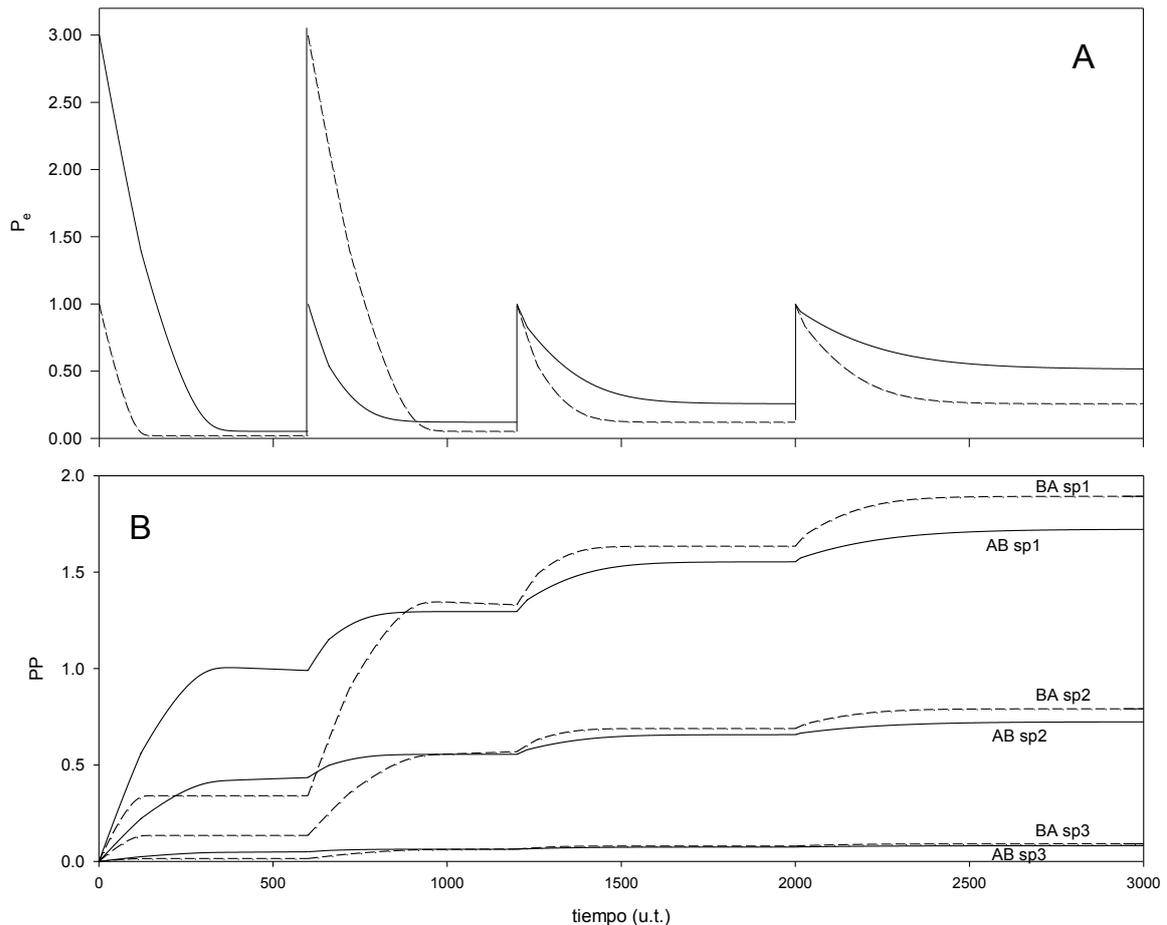


Figura 5-14. A: Simulación del transcurso de la remoción de fosfato del medio externo por una comunidad de fitoplancton compuesta de tres especies, de acuerdo al Apéndice 1: sp1, representada con una biomasa dominante (73%), sp2, con una biomasa intermedia (24.5%) y sp3, representada con la menor biomasa (2.5%). Esta comunidad hipotética fue expuesta a dos modalidades de pulsos externos: AB: un pulso de 3  $\mu\text{M}$  seguido por uno de 1  $\mu\text{M}$  (línea continua) y BA: viceversa (línea punteada). Los dos pulsos siguientes son idénticos a efectos comparativos. Los parámetros iniciales fueron iguales en ambos casos: sp1, 2 y 3:  $\Delta\text{pH} = 4.0$ , ramificación condicional es a  $t = 120$  u.t. (unidades de tiempo) luego de cada pulso, tal que: *es tiempo < 120 u.t.? → si: usar valores iniciales, no: es  $[P_e] > a$  los moles de ATP hidrolizado por moles de  $\text{PO}_4$  activamente transportado a través de la membrana celular? → si: usar nuevos  $\Delta\text{pH}$ , no: usar  $\Delta\text{pH}$  iniciales.* Parámetros nuevos:  $\Delta\text{pH}$ : sp1 = 3.55, sp2 = 3.65, sp3 = 3.70.  $[P_e]_A$  resultante = 26 nM y 10 nM, AB y BA respectivamente. Sigüientes parámetros para sp1, sp2 y sp3 en AB, segundo pulso:  $\Delta\text{pH}$  inicial = 3.59,  $\Delta\text{pH}$  resultante = 3.22,  $[P_e]_A$  resultante = 60 nM; tercer pulso:  $\Delta\text{pH}$  inicial = 3.22,  $\Delta\text{pH}$  resultante = 2.89,  $[P_e]_A$  resultante = 129 nM; cuarto pulso:  $\Delta\text{pH}$  inicial = 2.89,  $\Delta\text{pH}$  resultante = 2.59,  $[P_e]_A$  resultante = 257 nM. Sigüientes parámetros para sp1, sp2 y sp3 en BA, segundo pulso:  $\Delta\text{pH}$  inicial = 4,  $\Delta\text{pH}$  nuevos: sp1 = 3.55, sp2 = 3.65, sp3 = 3.70,  $[P_e]_A$  resultante = 26 nM; tercer pulso:  $\Delta\text{pH}$  inicial = 3.59,  $\Delta\text{pH}$  resultante = 3.22,  $[P_e]_A$  resultante = 60 nM; cuarto pulso:  $\Delta\text{pH}$  inicial = 3.22,  $\Delta\text{pH}$  resultante = 2.89,  $[P_e]_A$  resultante = 129 nM. B: Transcurso de la formación de polifosfato intracelular (PP) en cada especie durante la remoción de fosfato en A, para el caso AB (línea continua) y BA (línea punteada).

AB (Fig. 5-14B). De no ocurrir la transferencia de las propiedades cinéticas de un pulso al siguiente, debido a una alta velocidad de remoción del nutriente, se habrían alcanzado valores umbrales similares al del pulso inicial, como pudo determinarse experimentalmente (Fig. 5-7A). Entonces, las respuestas adaptativas de la cinética constituyen una "línea de base" desde donde se construyen las nuevas propiedades cinéticas, las cuales se generan de forma autorreferencial a partir de los cambios de la concentración externa causados por la actividad de la propia comunidad (Falkner et al. 1996, Aubriot. et al. 2000, Wagner et al. 2000).

Las dos manifestaciones del comportamiento cinético de incorporación de fosfato, "estado adaptado" y "modo adaptativo" (Plaetzer et al. 2005), podrían ser reminiscentes de un fenómeno primitivo de "memoria", el cual ha sido tradicionalmente estudiado en plantas superiores y

recientemente en cianobacterias (Thellier et al. 1982, 2000, 2004, Falkner & Falkner 2003, Falkner et al. 2006, Tafforeau et al. 2006). Tafforeau et al. (2006) demostraron que la información de un tratamiento asimétrico en plántulas de *Bidens pilosa* es "almacenada" (función *STO*) y puede ser posteriormente "llamada" (función *RCL*): las plántulas respondieron a una señal ambiental A (*STO*: pinchazos en un cotiledón) en combinación con un estímulo desencadenante B (*RCL*: corte del brote terminal), el que produce un efecto inhibitorio asimétrico en el crecimiento de los brotes. Cuando la señal A es desfasada temporalmente con el desencadenante B, también se produce la respuesta en el crecimiento asimétrico de las estructuras (Tafforeau et al. 2006). Análogamente, Falkner et al. (2006) plantearon que un pulso persistente provoca un estado adaptado con nuevas propiedades cinéticas (*STO*), las cuales son mantenidas por un período prolongado (>24 h, en nuestro estudio) y pueden ser medidas durante la remoción de un pulso de menor concentración (*RCL*) o amplificadas con un nuevo estímulo. Asimismo, esta información almacenada durante los pulsos aplicados se manifestó 90 horas después en las diferencias de crecimiento del fitoplancton. Aparentemente, este tipo de "memoria" es una capacidad extendida debido a que ocurre tanto en autótrofos superiores como en unicelulares o filamentosos, así como a nivel de especie o en ensamblajes de poblaciones fitoplanctónicas. Este fenómeno podría jugar un rol esencial en el desarrollo y coexistencia de poblaciones de fitoplancton, cuya interdependencia necesita ser esclarecida en estudios futuros.

# Capítulo 6

---

## Discusión general y conclusiones

---

### Cambios en la deficiencia por fosfato del fitoplancton

La primera pregunta que abordó esta tesis fue conocer la relación de la deficiencia por fosfato de la comunidad de fitoplancton con la variación de la concentración de nutrientes en el Lago Rodó (Capítulo 2). La variación de la deficiencia por fosfato del fitoplancton, reflejada en la magnitud de  $[P_e]_A$  y  $L_p$ , mostró una asociación relativamente baja con la relación elemental NID:PO<sub>4</sub> en el referido sistema (objetivo específico 1). Sin embargo, la relación elemental NID:PO<sub>4</sub> reflejó en términos generales el estado nutricional del fitoplancton en los rangos extremos, aunque se observó una importante dispersión de los valores intermedios próximos a la relación de Redfield, óptima para el crecimiento fitoplanctónico (16N:1P) (Fig. 2-6). La inconsistencia de los valores intermedios para estimar la deficiencia por fosfato se puede explicar por dos hechos: primero, la alta velocidad a la cual ocurre el proceso de remoción del fosfato del agua determina que, bajo condiciones de deficiencia del nutriente, una concentración equivalente a dos veces el contenido de  $P_T$  sea incorporada en menos de una hora, para valores de clorofila promedio en el Lago Rodó (ej.:  $5.5 \mu\text{M h}^{-1}$ ). Esta alta dinámica imposibilita relacionar la concentración de fosfato en el agua con la estimación de la disponibilidad del nutriente para el fitoplancton. En segundo lugar, las concentraciones ambientales de fosfato en sistemas limitados por el nutriente pueden alcanzar valores pico-nanomolares (Falkner & Falkner 1989, Cotner et al. 1997, Aubriot et al. 2000, Hudson et al. 2000). Dada la actividad de incorporación mantenida por la alta biomasa de fitoplancton presente en el Lago Rodó, es esperable que la concentración externa de PO<sub>4</sub> sea la misma que la de los umbrales fisiológicos de la comunidad. En esas condiciones, el método colorimétrico sobrestima al menos entre 64–70% la concentración externa de fosfato determinada por el método radioquímico (Fig. 2-7). Otros estudios postulan, mediante estimaciones matemáticas, que las concentraciones de fosfato en sistemas oligotróficos continentales y oceánicos pueden llegar a ser picomolares (Hudson et al. 2000, Hudson & Taylor 2005). En el presente estudio, la menor concentración de PO<sub>4</sub> determinada en el Lago Rodó fue significativamente inferior a las reportadas por Cotner et al. (1997) en el mar de Sargazos. Estas bajas concentraciones de fosfato externo revelan una gran eficiencia de las comunidades de fitoplancton para obtener el recurso limitante

del crecimiento, particularmente si se considera el estado hipereutrófico del lago estudiado. Se puede concluir que la inconsistencia de la relación de Redfield en los valores intermedios, como estimador de las condiciones nutricionales del ambiente, se debe a las cortas escalas temporales del proceso de incorporación y al rango de concentración nanomolar a la que normalmente ocurren los cambios del valor umbral. Las grandes desviaciones de la relación de Redfield no permiten usarla como indicador de la historia nutricional del fitoplancton. Para ello se requiere de una aproximación experimental basada en la simulación de incrementos externos de fosfato y su relación directa con las respuestas fisiológicas a corto plazo de la comunidad de fitoplancton (Falkner & Falkner 2000).

#### Flexibilidad de las propiedades cinéticas de incorporación de fosfato

La siguiente pregunta planteada en esta tesis fue conocer si la comunidad de fitoplancton posee la propiedad de alterar la cinética de incorporación de fosfato de acuerdo a los pulsos externos del nutriente, cómo ocurre, bajo qué condiciones y cuáles pueden ser sus implicancias ecológicas (Objetivo específico 2, Capítulo 3). Los resultados presentados en esta tesis muestran la primera evidencia directa de la capacidad de la comunidad de fitoplancton de alterar la cinética de incorporación de fosfato mediante el aumento del valor umbral, no dependiendo este incremento de forma directa de la cantidad de fosfato almacenado. Este comportamiento cinético adaptativo fue demostrado previamente en cultivos de la cianobacteria unicelular *Anacystis nidulans* (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995, Wagner et al. 2000) y de la filamentosa *Anabaena variabilis* (Falkner & Falkner 2003, Falkner et al. 2006). En lagos, este tipo de respuesta cinética fue utilizada para interpretar las variaciones temporales de los parámetros cinéticos y energéticos del fitoplancton de acuerdo a los aportes de fosfato (Aubriot et al. 2000). Los resultados de la presente tesis apoyan la segunda hipótesis que surge de Aubriot (2000), a saber: "los cambios cinéticos y energéticos reflejan una propiedad fisiológica de la comunidad, mediante la cual los organismos se adaptan de forma energéticamente favorable a los incrementos de la concentración de fosfato, de forma tal que cada organismo modifica su actividad de incorporación de modo coherente, mediante la obtención de un valor umbral común y estable" (Aubriot et al. 2000) (ver Introducción, Capítulo 3). Estos eventos adaptativos fueron catalogados en *A. nidulans* y *A. variabilis* como "estados adaptados" o lineales y "modos de operación adaptable" o no lineales (Falkner et al. 2000, 2006, Plaetzer et al. 2005). Los primeros surgen de un proceso adaptable previo y resultan en un estado estable intermediario, el cual puede ser descrito con parámetros objetivos a partir de estudios con condiciones experimentales definidas (Falkner et al. 2006), como por ejemplo en lagos (Istvánovics & Herodek 1995, Aubriot et al. 2000, Capítulo 2). En el presente trabajo, el comportamiento adaptativo de la cinética de incorporación de fosfato ocurrió generalmente en dos etapas: primero, se produjo una reducción del coeficiente de conductividad ( $L_p$ ) durante la transición hacia el estado adaptado, mientras que el valor umbral permaneció relativamente constante. En una segunda etapa, el fitoplancton aumentó el valor umbral de fosfato concomitantemente con un nuevo ajuste de  $L_p$ , frente a un nuevo estímulo externo. En la mayoría de los casos estudiados, este nuevo valor de  $L_p$  resultó mayor al precedente, aunque de menor magnitud que el resultante de la condición inicial. A pesar del aumento de  $L_p$ , la tasa de incorporación ( $J_p$ ) fue sucesivamente menor o igual al flujo del pulso precedente, a medida que se produjeron nuevos incrementos de  $[P_e]$ , frecuentemente debido al concomitante aumento de  $[P_e]_A$ . En este trabajo se obtuvieron respuestas cinéticas diferentes entre experimentos utilizando la misma concentración de fosfato,

por lo que ésta no sería el factor desencadenante de la alteración. El tiempo de exposición de los organismos a una concentración elevada de fosfato sobre el valor umbral ( $t_E$ ) fue el principal factor que se asoció con el incremento del valor umbral. Si la incorporación ocurre rápido, por ejemplo en un  $t_E$  menor a 50 min (ver Fig. 3-1, 3-3, 3-6, 3-8 y 3-12), el proceso adaptativo no se producirá. A su vez, la magnitud de  $t_E$  dependerá de la tasa de remoción del incremento de fosfato externo

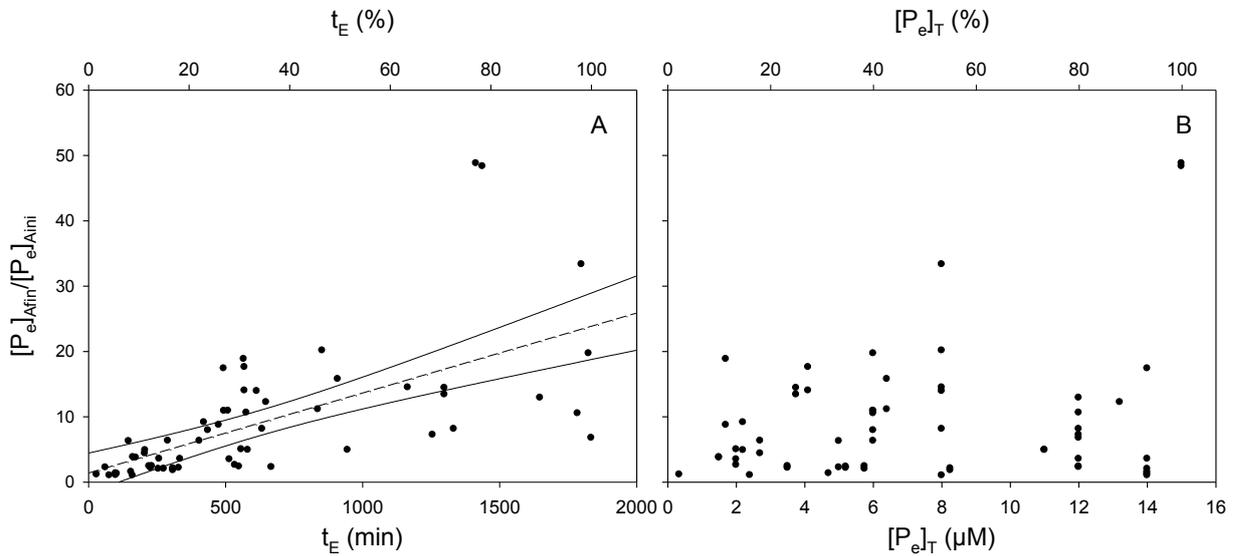


Figura 6-1. A: Relación entre el incremento relativo del valor umbral ( $[P_e]_{Afin}/[P_e]_{Aini}$ , valor umbral final e inicial, respectivamente) en función del tiempo de exposición de los organismos a una concentración elevada de fosfato sobre el valor umbral ( $t_E$ ) determinado en todos los experimentos (la línea punteada corresponde a la regresión lineal de todos los datos:  $r^2 = 0.40$ ,  $n = 61$  y la línea continua al intervalo de confianza de 95%) ( $r_s = 0.78$ ,  $p < 0.0001$ , RS). B: Relación entre  $[P_e]_{Afin}/[P_e]_{Aini}$  en función de la concentración total de los pulsos de fosfato aplicados en cada experimento ( $[P_e]_T$ ) ( $r_s = 0.08$ ,  $p = 0.55$ ,  $n = 61$ ).

(Falkner et al. 1996). Debido a este factor, se obtuvieron respuestas opuestas bajo similares condiciones experimentales (ver Fig. 3-6 y 3-8). En el Capítulo 3 se propuso la hipótesis que asocia a la respuesta adaptativa con el tiempo de exposición del fitoplancton a la concentración de fosfato externo sobre el valor umbral.

Para validar esta hipótesis se analizaron los incrementos relativos del valor umbral, expresado como la relación entre el  $[P_e]_A$  final y el inicial, contra los  $t_E$  acumulados de todos los experimentos realizados en la presente tesis (Fig. 6-1). El incremento relativo del valor umbral mostró una correlación altamente significativa con  $t_E$  para el total de los experimentos ( $r_s = 0.78$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 6-1A) y no significativa con el  $[P_e]$  total aplicado ( $[P_e]_T$ ) ( $r_s = 0.04$ ,  $p = 0.74$ ) (Fig. 6-1B). En general, la distribución de los datos muestra que el valor umbral puede permanecer incambiado o aumentar hasta más de seis veces con un  $t_E$  aproximadamente igual o menor a 150 min. A partir de  $t_E$  ca. 150 min, se observa únicamente un aumento de los valores umbrales, desde 2.4 a 48 veces el valor inicial (Fig. 6-1A). La dispersión de los datos se podría explicar, al menos en parte, por variaciones en la sensibilidad de respuesta del fitoplancton a los pulsos aplicados debido a la condición nutricional prevaleciente previo a los muestreos, asociada a su vez con la historia reciente de incrementos naturales del nutriente en el lago (Aubriot et al. 2000). Un tiempo de exposición  $t_E$  necesario será suficiente para permitir una disminución en el grado de acoplamiento entre el proceso de incorporación y la fuente de energía requerida para esa reacción (Wagner et al.

1995, Falkner et al. 1996). Estudios de laboratorio apoyan esta interpretación, demostrando que una cepa mutante de *A. nidulans* (*Synechococcus* sp. PCC 7942) carente de una proteína del sistema de alta afinidad de incorporación de fosfato, no posee la capacidad de adaptarse a los incrementos en la concentración del nutriente (Falkner et al. 1998). En un ambiente en el cual ocurren incrementos intermitentes y por períodos cortos en la concentración externa de fosfato sobre el valor umbral, parecería útil para los organismos poder incorporar el nutriente a una alta tasa. Sin embargo, si la concentración externa excede el valor umbral por un tiempo prolongado, debido a un aumento significativo de la concentración o a una sucesión de incrementos, los sistemas de incorporación pueden ajustar transitoriamente su actividad de forma energéticamente más eficiente en relación con la nueva condición de crecimiento, de forma tal que la asimilación del fosfato satisface los requerimientos del crecimiento (Wagner et al. 2000, Plaetzer et al. 2005).

En un estudio previo se mostró que las curvas de remoción de fosfato por las comunidades de fitoplancton se ajustan destacablemente bien a la relación lineal de flujo-fuerza (Aubriot et al. 2000). En el presente estudio, cuando se incrementó la concentración externa a rangos micromolares, de forma tal que provocó un cambio adaptativo, generalmente se observó una desviación normalmente pequeña de la linealidad (ej.: Fig. 3-11). De acuerdo a la intensidad del estímulo, esta relación no lineal fue más pronunciada durante el transcurso de la adaptación y tendió a linealizarse a medida que se consolidaron las nuevas propiedades de incorporación. Contrariamente, el fitoplancton que mantuvo sus propiedades relativamente constantes frente al primer estímulo mostró una mayor aproximación inicial a la linealidad y tendió a alejarse de ésta en los pulsos sucesivos. La relación flujo-fuerza se ajustó destacablemente bien a las curvas de remoción de fosfato, tanto en su formulación lineal en los estados adaptados, como no lineal en los estados adaptables, mostrando que en la amplia mayoría de los casos es posible describir el fenómeno mediante el mismo tipo de formulación cuantitativa (objetivo específico 3). Sin embargo, hubo un número reducido de excepciones que serán discutidos más adelante. El tiempo de exposición  $t_E$  fue el principal factor desencadenante de la respuesta cinética, el cual resumió un conjunto de eventos que involucraron la magnitud de los cambios de la concentración externa de fosfato y la persistencia de estos incrementos en el medio acuático, esta última influida por la actividad de incorporación de la propia comunidad de fitoplancton.

#### Importancia ecológica de la respuesta cinética a las fluctuaciones de fosfato

Los resultados del presente estudio (Capítulo 3) contradicen el concepto de exclusión competitiva por el agotamiento del recurso por dos aspectos empíricos: primero, por la existencia de valores umbrales variables en el ambiente, y segundo, porque la adaptación cinética implica que un ensamblaje de poblaciones deficientes por fosfato pueden alcanzar un estado en el cual incorporan menos nutriente limitante del que potencialmente pueden acumular. Asimismo, los valores umbrales altos y persistentes alcanzados en este estudio muestran que la alteración energética comprendió a toda la comunidad de fitoplancton (Aubriot et al. 2000, Wagner et al. 2000). Aubriot et al. (2000) y Wagner et al. (2000) proponen dos evidencias empíricas que apoyan esta hipótesis: primero, si una comunidad está constituida por organismos con diferentes valores umbrales, las células deberían evitar el reflujo del fosfato almacenado cuando la concentración externa del nutriente disminuye por debajo de su valor umbral. De no ser así, se producirá una transferencia de fosfato hacia los organismos con el valor umbral más bajo (Wagner et al. 2000) y por lo tanto la cinética resultante debería ser más compleja y no podría ajustarse a la ecuación semilogarítmica

simple empleada (Aubriot et al. 2000). Segundo, si una porción de la comunidad no adapta su cinética de acuerdo al incremento externo del nutriente mediante el aumento del valor umbral, la concentración retornará finalmente hasta el valor inicial previo al estímulo. Por esta razón, el valor umbral siempre representaría el mínimo valor alcanzable por un conjunto de organismos y no un promedio estadístico de los umbrales de las especies presentes (Wagner et al. 2000).

El análisis de la incorporación de fósforo mediante la modificación del modelo uniespecífico de Plaetzer et al. (2005) mostró ser una herramienta adecuada para simular algunos escenarios posibles sobre el modo de incorporación de al menos tres especies coexistentes, y para evaluar la persistencia del valor umbral posterior a la adaptación (objetivo específico 3). Este modelo fue modificado en la presente tesis a través de la programación en el lenguaje de PSpice (OrCAD) para representar una comunidad hipotética a través de la conexión de los metabolismos de tres especies al mismo recurso externo (ver Capítulo 1: Consideraciones teóricas y Apéndice 1, por más detalles) (Fig. 3-12). En un primer caso, se simuló la capacidad de cada especie de alcanzar valores umbrales diferentes (sp1: alto, sp2: medio, sp3: bajo), resultando en una cinética de incorporación compleja en la cual se alcanzó finalmente un valor umbral mínimo correspondiente a sp3 (Fig. 3-12A). Sp3 excluyó a corto plazo a las especies coexistentes debido a la constante pérdida y transferencia de P intracelular desde las dominantes en biomasa. En un segundo caso, se les incluyó la capacidad de alcanzar el mismo valor umbral. La curva de remoción resultante fue uniforme y estable con respecto al valor umbral (Fig. 3-12C), lo que permitió que las tres especies obtuvieran polifósforo de forma equivalente a su biomasa y sin la ocurrencia de extinción a corto plazo. Este tipo de curvas de remoción neta de fósforo son las usualmente obtenidas en comunidades de fitoplancton cuando las condiciones experimentales permiten reflejar la situación previa de crecimiento en el lago a través del estado adaptado (Aubriot et al. 2000, Capítulo 2). Por lo tanto, en el escenario planteado del modelo, puede concluirse que de no existir adaptación de las propiedades cinéticas, las especies de fitoplancton coexistentes deben necesariamente compartir el mismo valor umbral para evitar su rápida exclusión del ecosistema acuático. En un tercer caso, se utilizaron propiedades de incorporación de fósforo inicialmente diferentes para cada especie, pero con la posibilidad de que a un tiempo dado de exposición las tres especies pudiesen "monitorear" la concentración externa de fósforo y compararla con la concentración de ATP intracelular. La disminución del acoplamiento indirecto entre la traslocación de fósforo hacia el interior celular y la hidrólisis de ATP es considerada el factor determinante de los cambios del valor umbral (Wagner & Falkner 1992, Plaetzer et al. 2005). Si a un tiempo predeterminado la concentración externa es mayor al ATP hidrolizado, disminuye el gradiente de pH de la membrana tilacoide ( $\Delta\text{pH}$ ) (ramificación 1); si el  $[\text{P}_e]$  es menor, se mantienen las propiedades anteriores más activas (estado inicial, ramificación 2). Como resultado de este proceso, las tres especies alteran su cinética de incorporación de acuerdo a la permanencia de una alta concentración externa durante un tiempo dado, mediante la disminución de la velocidad de remoción (Fig. 3-13A). Esto permite a los organismos alcanzar un valor umbral mayor o igual al de la especie con el valor más alto (estado final adaptado). De no ocurrir este monitoreo de la concentración exterior por parte de las especies, la remoción resultante tiende a alcanzar el valor umbral mínimo (Fig. 3-13A, línea punteada) y a la consiguiente extinción de las dos especies con mayor umbral, y en este caso, con mayor biomasa (Fig. 3-13B).

De acuerdo al escenario planteado de la cinética adaptativa del nuestro, el tiempo de exposición del fitoplancton a la concentración externa sobre el valor umbral depende de la actividad de

incorporación de la comunidad de fitoplancton, siendo la permanencia de la concentración elevada la referencia externa que tienen los organismos para modificar sus propiedades cinéticas. Considerando que el monitoreo de la concentración exterior por los organismos se realiza probablemente en varios intervalos de tiempo durante el curso de la remoción del fosfato, el proceso observado aquí resulta en un mutuo ajuste cinético y energético basado en los cambios que cada población produce en su medio. En este proceso, el sistema de incorporación puede responder a las mismas alteraciones que provoca. En este caso, los resultados de dichas alteraciones son la nueva referencia para los subsiguientes cambios del propio sistema. Este fenómeno ha sido definido como un "sistema autorreferencial" de incorporación de fosfato en cianobacterias (Falkner et al. 1996). Este comportamiento adaptativo refleja una gran interdependencia entre los microorganismos, la comunidad y el ambiente. Consecuentemente, puede concluirse que la comunidad de fitoplancton se adapta de forma coherente a los incrementos de fosfato externo debido a que el aumento del valor umbral se produce previo a colmar su capacidad de incorporación, y a que este alto valor puede ser mantenido por el fitoplancton por un período prolongado (Fig. 3-8 y 3-10). Por lo tanto, la utilización de fosfato durante la adaptación no está caracterizada por la necesidad de acumular la mayor proporción posible del recurso, sino que estaría relacionada con la utilización del nutriente disponible de la forma energéticamente más eficiente.

La siguiente pregunta procuró conocer si los ajustes de la actividad de incorporación de fosfato varían con la estructura de la comunidad de fitoplancton (objetivo específico 4). En el presente estudio, los cambios cinéticos no se asociaron con la composición de la comunidad de fitoplancton, observándose el incremento del valor umbral tanto en una comunidad diversa, formada por organismos eucariotas de varios grupos y cianobacterias (Fig. 3-1), como en comunidades dominadas por una o dos especies de cianobacterias. En este último caso, se pudieron observar comportamientos adaptativos en fitoplancton dominado por *Planktothrix agardhii* ( $B_T = 93-99\%$ ), así como en casos de co-dominancia con *Raphidiopsis mediterranea* (Fig. 3-3). La misma capacidad de respuesta se observó en experimentos con predominio de *R. mediterranea* sobre *P. agardhii* (Fig. 3-10). Por lo tanto, se hipotetiza que el comportamiento adaptativo de incorporación de fosfato puede ser una propiedad extendida en el fitoplancton y que el grado de flexibilidad de respuesta frente a los incrementos externos es un factor relevante para la permanencia y sobrevivencia en el medio acuático.

#### Propagación a largo plazo de las nuevas propiedades cinéticas de incorporación

Las siguientes preguntas planteadas fueron conocer cuán persistentes en el tiempo son las nuevas propiedades de incorporación de la comunidad y si afectan el crecimiento fitoplanctónico (Objetivo específico 5, Capítulo 4). En este estudio, el valor umbral del fitoplancton permaneció constante por períodos mayores a 20 horas luego de la adaptación a los pulsos de fosfato. La persistencia a largo plazo del valor umbral alto encontrado en nuestro estudio es la tercera evidencia empírica que cuestiona la noción de organismos competidores por el recurso limitante como fuerza estructuradora de las comunidades de fitoplancton en lagos, particularmente si se considera que esta respuesta se produjo lejos de colmar la capacidad del fitoplancton de almacenar el nutriente. En algunos casos se observó una respuesta bifásica evidenciada en puntos de aparente discontinuidad en la derivada primera del transcurso de la remoción de un pulso de fosfato, lo que implicó una reactivación de la incorporación (Fig. 4-8 y 4-10). Este tipo de respuesta se caracterizó

por dos cinéticas de incorporación con propiedades diferentes, la cual ocurrió durante el transcurso de la remoción de fosfato o luego de varias horas de haber alcanzado el valor estacionario intermedio. Este comportamiento, mostrado en las Figuras 4-8 y 4-10, podría explicarse con dos hipótesis: la primera, sostiene que la cinética compleja resultante se debe al comportamiento de incorporación independiente entre las dos especies dominantes en el ambiente, *Planktothrix agardhii* y *Raphidiopsis mediterranea* (comportamiento competitivo, similar al simulado en la Figura 3-12A, Capítulo 3). En este caso, el tramo inicial de la curva de remoción correspondería a la actividad de remoción de ambas especies y el sector final sólo a la especie que mantuvo un umbral más bajo (ver Apéndice 2). Sin embargo, no se cumple lo esperado por el modelo competitivo debido a que: a) en este caso se hubiese observado una cinética escalonada también en el transcurso del primer pulso (10  $\mu\text{M}$ ); b) en el siguiente pulso se observa una tendencia a alcanzar un umbral más alto que no se produjo previamente; y c) la incorporación se detiene a un umbral correspondiente al doble del anterior (Fig. 4-8, curva A', B' y C'). En el caso paralelo  $S_2$ , los mismos organismos muestran una tendencia a detener la incorporación a una concentración más alta (1.137  $\mu\text{M}$  fosfato), pero la incorporación continúa hasta un valor intermedio (0.503  $\mu\text{M}$  fosfato). De haber existido competencia pura, la remoción del fosfato en  $S_2$  continuaría hasta alcanzar el valor umbral del pulso previo. Asimismo, si los puntos previos y posteriores a la discontinuidad de la derivada correspondiesen a las propiedades de incorporación de al menos una de las especies dominantes, debería haberse producido al mismo nivel de concentración e intervalo de tiempo en ambas curvas de remoción ( $S_1$  y  $S_2$ ).

La segunda hipótesis propone que este transcurso bifásico de remoción de fosfato externo se debe a un desfase entre el estado "adaptable" y el "adaptado" de las dos poblaciones dominantes de fitoplancton (*P. agardhii* y *R. mediterranea*). Esta hipótesis se apoya en que los puntos de discontinuidad ocurrieron a diferentes concentraciones y tiempos, debido a la tendencia de alcanzar un valor umbral alto por una o ambas poblaciones. Este fenómeno reflejaría las propiedades adaptativas de cada población, las que posiblemente puedan diferir en su rango de sensibilidad de respuesta frente al estímulo externo (Apéndice 2). Esta segunda hipótesis podría ser analizada mediante al menos dos vías en futuros estudios: la aplicación de un nuevo pulso de fosfato posterior al comportamiento escalonado de incorporación que resulte en una cinética uniforme de remoción del nutriente, y/o a través de la obtención de cepas aisladas de cada población con valores umbrales diferentes, tal que mezcladas en un mismo medio muestren un comportamiento uniforme de incorporación posterior a la cinética escalonada. Esta respuesta escalonada de incorporación también fue observada en monocultivos de *Anabaena variabilis*, sugiriendo que dicho comportamiento puede deberse al transcurso de la adaptación cinética de la incorporación de fosfato dentro de la misma población (G. Falkner, comunicación personal).

En general, el resultado del transcurso de la adaptación cinética en este estudio (Capítulo 3 y 4) fue un nuevo estado uniforme de incorporación, reflejado en la relación lineal entre  $J_p$  y  $\log [P_e]$ . De acuerdo a lo previsto por el modelo adaptativo (Capítulo 3, Fig. 3-13), el tiempo de exposición  $t_E$  a la concentración externa elevada es la referencia externa que tienen las poblaciones para modificar sus propiedades cinéticas. Por lo tanto, el proceso observado aquí consistiría en un mutuo ajuste cinético basado en los cambios que cada población produjo en el medio. Puede postularse entonces que la cinética bifásica de remoción de fosfato externo podría deberse a un desfase en la respuesta cinética adaptativa entre los componentes de la comunidad.

### Implicancias de las nuevas propiedades cinéticas en el crecimiento

Si las nuevas propiedades cinéticas posteriores a la fluctuación implican que el fosfato externo sea incorporado con mayor eficiencia, esto debería reflejarse en la tasa de crecimiento. Entonces, en el Capítulo 4 se analizó si las nuevas propiedades cinéticas afectaban la tasa de crecimiento fitoplanctónico y qué ventajas conferiría esta capacidad a las poblaciones de fitoplancton. Wagner et al. (2000) demostraron que se produce un cambio en el flujo del carbono asimilado hacia compuestos de bajo peso molecular, rápidamente disponibles para el proceso de crecimiento, como respuesta a las adiciones de fosfato en *A. nidulans*. En este trabajo se mostró por primera vez que la capacidad de adaptar la incorporación de fosfato a los incrementos ambientales de fosfato previos se asoció con un aumento del crecimiento fitoplanctónico. Este resultado se determinó tanto en la absorbancia de los principales pigmentos fotosintéticos, así como en la mayor biomasa fitoplanctónica. Usualmente se considera que la tasa de crecimiento algal es mayor cuanto más polifosfato se haya acumulado previamente (Droop 1973). Por lo tanto, la relación de crecimiento de Droop, originalmente propuesta para cultivos de crecimiento continuo, no sería extrapolable al crecimiento de fitoplancton debido a que las condiciones naturales de suministro de fosfato en lagos se asemejan a condiciones de crecimiento discontinuas (Wagner et al. 2000, Istvánovics et al. 2000). En este último caso, existe un desfase temporal entre el proceso de incorporación y el crecimiento. A dicha condición nutricional fluctuante se le suma la capacidad de los organismos de adaptarse a los incrementos de fosfato, lo que resulta en una mayor formación de biomasa a expensas de una menor concentración de polifosfato intracelular. Esta aparente contradicción podría explicarse por la desventaja para el crecimiento que puede implicar el almacenamiento excesivo del nutriente en gránulos de polifosfato: el volumen de los gránulos puede alterar las estructuras celulares (Falkner et al. 2006) o provocar la precipitación de las células a zonas menos iluminadas de la columna de agua debido a la mayor densidad (Reynolds 1988).

Un mayor crecimiento a expensas de menos recursos podría explicarse por un incremento significativo de la eficiencia de la conversión de energía durante el estado adaptado (Falkner et al. 1989, Falkner et al. 1994). Según Falkner et al. (2006) existen teóricamente dos estados estables de mayor eficiencia de conversión de la energía: uno es en el valor umbral, donde la fuerza impulsora del flujo desaparece, y el otro, cuando aumenta el grado de acoplamiento entre el flujo de fosfato hacia el interior celular y la reacción de la ATPasa. En este trabajo se determinó que la región lineal entre flujo y fuerza reflejó el estado adaptativo del fitoplancton. En general, la relación lineal fue característica de las condiciones originales de incorporación de fosfato en el lago (Aubriot et al. 2000, Capítulo 3). Frente a un incremento de fosfato externo, esta relación lineal es alterada en regiones lejanas al valor umbral y, de acuerdo a la intensidad de la respuesta, esta relación tendió a linealizarse a medida que se alcanzaron las nuevas propiedades cinéticas. Por lo tanto, la capacidad de adaptarse rápidamente a los incrementos de fosfato podría ser un factor decisivo para el crecimiento fitoplanctónico en general (Falkner et al. 1996), ya que facilitaría la permanencia de poblaciones típicamente persistentes bajo condiciones ambientales de estrés nutricional.

El estado adaptado reflejó los incrementos en la concentración de fosfato externo ocurridos 24 horas antes y, concomitantemente, estas nuevas propiedades fueron mantenidas durante la división celular y hasta 45 horas luego de iniciado el proceso (Fig. 4-12A). Nuevamente, la intensidad y duración del estímulo (pulsos) fue el desencadenador de la respuesta del fitoplancton.

Esta secuencia de eventos adaptativos sugiere que debe existir un tipo de "monitoreo" del ambiente, mediante el cual los microorganismos puedan responder de forma energéticamente favorable (Falkner et al. 1996, Falkner et al 2006). Los resultados del presente trabajo muestran una gran sensibilidad del fitoplancton a las fluctuaciones de fosfato. A partir de estos resultados, surge necesario profundizar en la respuesta y conocer si la secuencia en que ocurren las fluctuaciones de la concentración de fosfato externo puede ser traducida por los microorganismos como una sucesión de señales ambientales capaces de provocar modificaciones metabólicas. Esta sensibilidad de respuesta fue determinada recientemente con la cianobacteria *Anabaena variabilis*, la cual posee la capacidad de adaptarse de forma diferencial cuando un mismo conjunto de pulsos se suceden en diferente secuencia (Falkner et al. 2006).

#### Sensibilidad de las propiedades cinéticas a la sucesión de pulsos de fosfato

En el Capítulo 5 se procuró responder si el comportamiento de incorporación de fosfato del fitoplancton es sensible a un cambio en la secuencia de pulsos externos del nutriente (Objetivo específico 6). En este trabajo se demostró que el fitoplancton del Lago Rodó es capaz de modificar sus propiedades cinéticas y energéticas de incorporación de fosfato de diferentes formas, dependiendo de la secuencia en que se suceden los incrementos previos en la concentración externa de fosfato. Esta respuesta muestra la complejidad del comportamiento de incorporación, particularmente si se considera que los incrementos a los que el fitoplancton estuvo expuesto fueron de idéntica concentración. Entonces, se asume que la secuencia temporal de los pulsos originó la correspondiente diferencia en el comportamiento subsiguiente. La única información disponible al respecto es un estudio que demostró recientemente la respuesta adaptativa de la cianobacteria filamentosa *Anabaena variabilis* a una secuencia similar de incrementos de fosfato (Falkner et al. 2006). El fenómeno mostrado en este estudio se debería a que el fitoplancton modificó sus propiedades de incorporación durante el transcurso de la remoción del primer pulso alto de fosfato externo y que estas nuevas propiedades constituyeron el estado inicial a partir del cual se produjo la adaptación subsiguiente. Esta respuesta fue interpretada por Falkner et al. (2006) como un "reconocimiento" de los pulsos, el cual se produce por la transferencia de un cierto tipo de información acerca de alteraciones ambientales previas. En este sentido, según Bateson (2000), una unidad de información es definida como una diferencia en el ambiente que provoca un cambio en la constitución del sistema biológico (Falkner et al. 2006). Esta propiedad transferible de los estados adaptados de un pulso de fosfato al siguiente explicaría por qué la respuesta adaptativa del fitoplancton es mayor cuando el fitoplancton es sometido a una secuencia de pulsos que resulta en una sucesión ascendente de incrementos, todos ellos de magnitud suficientemente alta para desencadenar de por sí la modificación de las propiedades cinéticas (ej.: Capítulo 3, Fig. 3-8; Capítulo 4). Asimismo, estas nuevas propiedades cinéticas y energéticas fueron mantenidas por el fitoplancton luego de 24 horas de ocurrida la fluctuación externa, mientras que en otros casos de la presente tesis el estado adaptado fue mantenido luego de iniciado el crecimiento celular (Capítulo 4). La combinación de las evidencias con fitoplancton natural presentadas en este trabajo y las de cultivos de *A. variabilis*, permite postular que la transferencia de las adaptaciones del comportamiento de incorporación es una propiedad característica del fitoplancton dominado por cianobacterias deficientes por el nutriente. Entonces, las propiedades cinéticas de incorporación de fosfato por la comunidad de fitoplancton reflejarían la historia reciente de las fluctuaciones del nutriente en el ambiente.

Parte de este trabajo consistió en conocer cómo se modifica la relación entre flujos y fuerzas de la incorporación de fosfato durante la adaptación al orden de los pulsos (objetivo específico 6). La principal respuesta fue la disminución progresiva de  $J_p$  y del coeficiente de conductividad  $L_p$  en el fitoplancton que experimentó primero el pulso de mayor concentración. Esta respuesta se amplificó a medida que se aplicaron nuevos pulsos. Aunque se determinó un incremento significativo del valor umbral, éste fue menos considerable que cuando se experimentó con diferentes concentraciones externas (Capítulo 3 y 4). El fitoplancton que recibió la secuencia inversa de pulsos también modificó su cinética, pero en menor medida. Nuestros resultados mostraron que la disminución de  $J_p$  fue acompañada de una desviación de la linealidad y que el fitoplancton que inició antes este proceso adaptativo mostró una pérdida más temprana de dicha relación. A un mayor tiempo de exposición  $t_E$ , el modo de incorporación tendió a linealizarse en el último pulso (Fig. 5-2A y 5-4A). En los tratamientos paralelos en los que el  $t_E$  fue menor, se pudo observar el inicio del proceso de adaptación cinética con una pérdida de la linealidad al final de la aplicación de los pulsos (Fig. 5-5). Una vez que se alcanzaron las nuevas propiedades lineales de incorporación, éstas persistieron por más de 24 horas. Si asumimos que los modelos interpretativos son apropiados, entonces se podría concluir que la relación no lineal observada es un estado transitorio o "estado adaptativo" de los sistemas de incorporación del fitoplancton, el cual es el resultado de una alteración del "estado adaptado" precedente y que deriva en un nuevo estado adaptado con nuevas propiedades cinéticas (Plaetzer et al. 2005, Falkner et al. 2006). Cabe destacar que este proceso es el resultado del comportamiento coherente de incorporación de un ensamblaje de poblaciones microalgales, cuya complejidad en su composición biológica e historia nutricional dista considerablemente de un cultivo monoespecífico bajo condiciones óptimas de crecimiento. Las mediciones realizadas de la incorporación de fosfato por fitoplancton en condiciones naturales en el Lago Rodó resultan invariablemente en un modo lineal (Aubriot et al. 2000, Capítulo 3 y 4). La mayoría de los casos presentados en este estudio mostraron una desviación de la linealidad como respuesta cinética a una fluctuación externa persistente y, por otro lado, los tiempos de exposición menores producidos por los pulsos iniciales resultaron en propiedades lineales de incorporación, e incluso estables una vez repetida la aplicación. Podemos especular que la concentración aplicada en los pulsos fueron superiores (respuesta no lineal) o inferiores (respuesta lineal) a las ocurridas previamente en el ambiente, dando lugar a las propiedades cinéticas prevalecientes. La profundización en futuros estudios en dicha respuesta cinética lineal y no lineal permitirá conocer si es posible reflejar de forma directa las fluctuaciones ambientales a las que estuvo expuesto el fitoplancton en un lago y así monitorear, por ejemplo, las entradas difusas de fosfato, las que no pueden ser detectadas por otras aproximaciones experimentales.

Las subsiguientes preguntas que surgen del objetivo específico 6 fueron conocer cómo se acumula el fosfato intracelular durante el proceso de incorporación y qué implicancias tiene esta respuesta cinética en el crecimiento de la comunidad. En este trabajo se observó la formación generalizada de pequeños gránulos de polifosfato (PP) o pocos de gran tamaño en el fitoplancton que mantuvo una mayor actividad de incorporación ( $J_p$ ) de los pulsos externos. Sin embargo, fue prácticamente indetectable la presencia de gránulos de PP en el fitoplancton que experimentó una mayor adaptación cinética. La ausencia de gránulos de PP se observó en *Cylindrospermopsis raciborskii* bajo modalidades de crecimiento continuos (Istvánovics et al. 2000). Esta discrepancia podría explicarse por una posible diferencia en los grados de condensación del PP (Rhee 1973).

Debido a esta aparente plasticidad en la formación de las reservas de fosfato, así como las desventajas de la acumulación excesiva del nutriente y su efecto relativamente negativo en el crecimiento, la clasificación de especies de fitoplancton en estrategias por acumulación (*storage strategists* sensu Sommer 1989) y su aparente ventaja ecológica (ej.: Ducobu et al. 1998, Istvánovics et al. 2000, Mateo et al. 2006) requiere de revisión en el contexto de la capacidad adaptativa del fitoplancton. Sobre la base de los modelos interpretativos usados en esta tesis, se postula que las ventajas para el crecimiento fitoplanctónico dependen de la capacidad de optimización de la relación entre flujo y fuerza durante la remoción del fosfato externo y la resultante regulación del volumen final de las reservas, asociado a una posible menor condensación del PP y, por lo tanto, a una mejor disponibilidad de las reservas intracelulares del nutriente para el inicio del crecimiento. Cabe esperar que existan diferencias en los rangos de adaptabilidad entre algunos grupos fitoplanctónicos y en la optimización en el uso de las reservas que pueda explicar la persistencia y asociación de algunas especies. La elucidación de estas relaciones interespecíficas requiere de futuros estudios que contemplen un seguimiento del crecimiento específico y el transcurso de la formación, condensación y utilización de las reservas, una vez alcanzado el estado adaptado de incorporación de fosfato.

Como fue mostrado en los experimentos en que se aplicaron pulsos de diferente concentración en cada tratamiento (Capítulo 4), las diferencias en la secuencia temporal de pulsos de fosfato externo también resultaron en un mayor crecimiento fitoplanctónico. El fitoplancton que se adaptó primero a la fluctuación externa pudo producir una mayor biomasa final a expensas de una menor cantidad de fosfato almacenado (Capítulo 5, Fig. 5-12 y 5-13). Este resultado refleja el grado de reconstrucción que ocurre durante el modo adaptable de operación, en el cual las propiedades del sistema de incorporación dependiente de la energía es recoordinado con la conversión energética general de la célula (Falkner et al. 1996). Esta re coordinación incluye cambios en el flujo del carbono asimilado hacia compuestos de reserva rápidamente disponibles para sustentar un mayor crecimiento (Wagner et al. 2000). Como fue expuesto previamente (Capítulo 4), estos resultados muestran una relación más compleja entre la asimilación de fosfato y el crecimiento, que la expresada por Droop (1973). En este sentido, se especula que la capacidad de adaptarse rápidamente a la fluctuación externa del nutriente puede ser una propiedad que permita explicar la presencia de poblaciones de cianobacteria típicamente persistentes en ecosistemas acuáticos. Asimismo, las especies agrupadas en asociaciones funcionales características del fitoplancton (Reynolds 1997, Kruk et al. 2002) podrían compartir los rangos de sensibilidad de la respuesta cinética para un mismo estímulo, cuyo esclarecimiento aportaría nueva información para profundizar en las propiedades fisiológicas que favorecen la presencia de dichas agrupaciones.

#### Posible almacenamiento y transferencia de información en la adaptación cinética del fitoplancton

La propiedad del nuevo estado adaptado (comportamiento lineal según Falkner et al. 2006) del fitoplancton fue mantenida durante períodos en los cuales no se produjeron nuevos incrementos de la concentración externa de fosfato. Estos períodos involucran procesos de reconstrucción celular, como la síntesis diferencial de pigmentos fotosintéticos previo al crecimiento para sustentar energéticamente a la división celular (Aubriot 2000). Por lo tanto, esta información (entendida en los términos de Bateson 2000) sobre las fluctuaciones previas es transferida durante varias generaciones (Falkner & Falkner 2003, Falkner et al. 2006). Durante este transcurso, el comportamiento lineal refleja las condiciones de crecimiento precedentes. Dado que la adaptación

de la cinética requiere de un cierto tiempo de exposición al fosfato externo ( $t_E$ ), se hipotetiza que el transcurso de la incorporación de fosfato determina la posibilidad de que se produzcan pasos adaptativos durante la remoción del nutriente. Cada paso adaptativo constituirá la línea de base del siguiente, originándose así la propagación del proceso adaptativo en los sucesivos incrementos ambientales. Por esta razón, el transcurso de la remoción conjunta de fosfato por la comunidad sería decisivo para la transferencia de información de un pulso al siguiente (Falkner et al. 2006). Este proceso de acumulación de pasos adaptativos podría explicar cómo es posible la discriminación de patrones de pulsos de forma tal que resulten en respuestas fisiológicas disímiles. Para simular este proceso se utilizó el modelo modificado de Plaetzer et al. (2005) con el objetivo de interpretar el comportamiento adaptativo de la comunidad de fitoplancton (Capítulo 3). Para simular el proceso adaptativo de tres especies coexistentes, se expusieron a dos modalidades de pulsos externos: alto-bajo (AB) y viceversa (BA). En este caso, los valores de  $\Delta pH$  resultantes del transcurso de la remoción de cada pulso fueron utilizados como los parámetros iniciales para el cálculo de la cinética de remoción del pulso siguiente (Fig. 5-14A). El proceso de incorporación resultante de la simulación fue destacablemente similar a las respuestas observadas en los experimentos con fitoplancton de esta tesis, debido a la progresiva reducción de la actividad de incorporación. De no ocurrir la transferencia de las propiedades cinéticas de un pulso al siguiente, debido a una alta velocidad de remoción del nutriente, se habrían alcanzado valores umbrales similares al del pulso inicial, como pudo determinarse experimentalmente (Fig. 5-7A). Entonces, las respuestas adaptativas constituirían una "línea de base" desde donde se construye el siguiente evento adaptativo, las cuales se producen a partir del tiempo de exposición a la concentración externa, influido a su vez por la actividad de la misma comunidad (Falkner et al. 1996, Aubriot. et al. 2000, Wagner et al. 2000).

Las dos manifestaciones del comportamiento de incorporación de fosfato, el estado adaptado y el modo adaptativo (Plaetzer et al. 2005), podrían ser reminiscentes de un fenómeno primitivo de "memoria", el cual ha sido tradicionalmente estudiado en plantas superiores y recientemente en cianobacterias (Thellier et al. 1982, 2000, 2004, Falkner & Falkner 2003, Falkner et al. 2006, Tafforeau et al. 2006). En este sentido, Falkner et al. (2006) plantean que un pulso persistente provoca un estado adaptado con nuevas propiedades cinéticas (almacenamiento), las cuales son mantenidas por un período prolongado (>24 h, en este estudio) y pueden ser medidas durante la remoción de un pulso de menor concentración (llamado) o amplificadas con un nuevo estímulo (nuevo almacenamiento). En los experimentos con fitoplancton, la información almacenada durante los pulsos aplicados se manifestó 90 horas después en las diferencias de crecimiento. Aparentemente, este tipo de "memoria" sería una capacidad extendida debido a que ocurre tanto en autótrofos superiores como en unicelulares o filamentosos, así como a nivel de especie o en ensamblajes de poblaciones fitoplanctónicas. La existencia de este tipo memoria plantea la consecuente posibilidad teórica de una forma de procesamiento de información acerca de perturbaciones ambientales relativamente recientes (Falkner et al. 2006). Aparentemente, la relación lineal de flujo-fuerza tiene la misma estructura de la ley de Weber-Fechner cuando la tasa de incorporación  $J_p$  es considerada como la respuesta sensitiva al estímulo [ $P_e$ ] y el valor umbral como el nivel de estímulo por debajo del cual no se percibe sensación (Gustav Theodor Fechner 1801-1887, Falkner et al. 2006). De esta forma, y de acuerdo con Falkner et al. (2006), se postula que una alteración ambiental es "percibida" por el organismo como pulsos de fosfato, su información es almacenada como nuevas propiedades lineales y procesada en el contexto histórico

de las fluctuaciones, las que fueron el resultado de los eventos ambientales recientes. Entonces, el modo lineal de incorporación resultante podría reflejar la información requerida para estimular el crecimiento inmediato. Este aparente procesamiento de información por el fitoplancton sobre las perturbaciones ambientales, ejemplificado en la adaptación a la sucesión de pulsos de fosfato y su efecto en el crecimiento, podría jugar un rol esencial en la estructura y desarrollo de las comunidades de fitoplancton, cuya interdependencia necesita ser esclarecida en futuros estudios.

## Perspectivas de investigación

---

### 1. Evaluación de las fluctuaciones ambientales de fosfato a través de las propiedades cinéticas de incorporación del nutriente por fitoplancton en lagos

La cinética de incorporación del fitoplancton del Lago Rodó mostró propiedades típicamente lineales entre flujo y fuerza en los pulsos iniciales (Aubriot et al. 2000, Capítulo 2 de la presente tesis). En las sucesivas aplicaciones de fosfato se produjo una desviación de la linealidad como respuesta cinética a la fluctuación externa persistente. Posteriormente, se observó una tendencia a recuperar la linealidad con nuevas propiedades cinéticas. En el caso en que estas adiciones fueron de baja concentración o el fitoplancton mostró una alta actividad de incorporación original (tiempos de exposición bajos al fosfato), las propiedades de incorporación fueron típicamente lineales e incluso estables una vez repetida la aplicación. Por lo tanto, se puede hipotetizar que dada una respuesta no lineal, las concentraciones aplicadas en el experimento resultaron en tiempos de exposición superiores a los ocurridos previamente en el lago. De mantenerse las mismas propiedades lineales y estables, la concentración que fue aplicada sería inferior o igual a las prevalecientes en el medio acuático. Para profundizar en dicha respuesta, sería necesario diseñar un procedimiento para obtener fitoplancton natural con una historia nutricional conocida. Para ello se puede incubar un importante volumen de lago (50 – 100 l) en condiciones naturales de luz y temperatura (mesocosmos), en los cuales la influencia previa de la historia de las fluctuaciones de fosfato pueda ser disminuida o eliminada (período de deficiencia por fosfato) y ésta pueda ser construida durante el período de experimentación. Posteriormente, se realizarían determinaciones de la cinética de incorporación de [ $^{32}\text{P}$ ] fosfato en las muestras del mesocosmos, mediante la aplicación de varios pulsos de fosfato dentro de un gradiente de concentración amplio. El análisis de la cinética de incorporación de dichos pulsos permitirá conocer a partir de qué concentración comienza la pérdida de la linealidad entre flujo y fuerza y su relación con las concentraciones previamente aplicadas.

## 2. Implicancias de las respuestas cinéticas uniformes y bifásicas de la incorporación de fosfato a las fluctuaciones del nutriente en dos cianobacterias dominantes en lagos eutróficos

Para profundizar en los resultados obtenidos en el Capítulo 5, sería interesante conocer cómo se producen las respuestas uniformes de la cinética de incorporación de fosfato, así como evaluar qué condiciones son necesarias para obtener una respuesta bifásica como la observada en el Capítulo 4. Para obtener dicha información, sería necesario cultivar a las dos especies de cianobacteria dominantes en el Lago Rodó, *Planktothrix agardhii* y *Raphidiopsis mediterranea*, las que serían aisladas del mismo lago. Posteriormente se realizaría la caracterización de la cinética de incorporación y del rango de concentración de fosfato que produce la adaptación cinética en cada especie separadamente. Una vez conocido dicho rango de concentración, se podrían realizar experimentos de incorporación de fosfato con ambas especies combinadas equitativamente en un mismo medio y se determinaría el tipo de respuesta cinética resultante. En otro tipo de experimento, se puede inducir la respuesta adaptativa en una cepa (ej.: con un valor umbral alto en *P. agardhii*), la que sería posteriormente mezclada en el mismo medio con la otra especie con un valor umbral bajo. Seguidamente se determinaría si la cinética resultante de ambas especies mezcladas es bifásica o lineal, luego de una sucesión de pulsos. La cinética será analizada con la relación flujo–fuerza y con los modelos cinéticos mostrados en el Apéndice 1 y 2. También se podría determinar la tasa de crecimiento de cada especie bajo condiciones uniformes de incorporación y bifásicas. Estos experimentos permitirán conocer la capacidad de ambas especies de modificar su cinética y las condiciones que favorecen el comportamiento lineal y uniforme de incorporación de fosfato típicamente encontrado en el fitoplancton del Lago Rodó. Esta información podrá ser discutida en el contexto de la teoría de exclusión competitiva y la paradoja del plancton. Asimismo, se podría obtener información sobre las propiedades cinéticas adaptativas de *P. agardhii* que faciliten su dominancia y persistencia en ambientes eutróficos.

## 3. Transcurso de la formación de polifosfato por fitoplancton durante la adaptación de la cinética de incorporación del nutriente

En esta tesis se hipotetizó que las ventajas para el crecimiento fitoplanctónico pueden depender de la capacidad de optimización energética durante la remoción del fosfato externo y la regulación del volumen final de las reservas, asociado a una posible menor condensación de polifosfato y por lo tanto, a una mejor disponibilidad de las reservas intracelulares del nutriente para el inicio del crecimiento. Una evaluación primaria de la formación de polifosfato por fitoplancton con pulsos del nutriente se encuentra actualmente en desarrollo (Viera, com. pers.). Futuros estudios requerirán de la microscopía electrónica de transmisión para determinar variaciones en la densidad de los gránulos de polifosfato como consecuencia de las respuestas cinéticas a los pulsos del nutriente. Se realizarán tinciones de polifosfato en varios intervalos de tiempo durante el proceso de adaptación cinética a los pulsos de fosfato. Se utilizarán las muestras de fitoplancton incubadas en los experimentos de la propuesta de investigación 1 y de los cultivos de cianobacterias en 2.

#### 4. Rangos de sensibilidad de la respuesta cinética de cianobacterias típicamente dominantes en lagos someros de Uruguay

En la presente tesis se propuso que la capacidad de modificar rápidamente la cinética de incorporación de fosfato a la fluctuación externa del nutriente debe ser una propiedad de los organismos que les facilite la persistencia y dominancia en ecosistemas acuáticos. Se propone estudiar la capacidad de alteración de la cinética de incorporación de fosfato de dos cianobacterias potencialmente tóxicas y típicamente dominantes en lagos eutróficos de Uruguay: *Planktothrix agardhii* y *Cylindrospermopsis raciborskii*. Recientemente, *C. raciborskii* ha ganado la atención científica internacional debido a su aparente capacidad invasiva y por su alta toxicidad. Esta cianobacteria se fue identificada recientemente en varios ecosistemas acuáticos de nuestro país, algunos utilizados como recursos de agua potable. Sin embargo, se desconoce cuáles son los factores que explican su reciente dominancia en lagos someros de la región. Para conocer el rango de respuesta de la cinética de incorporación de fosfato de ambas especies, se realizarían experimentos con patrones de pulsos del nutriente en las cepas aisladas y en cultivos mixtos. La cinética de incorporación se analizará con la relación flujo–fuerza y con los modelos propuestos en los apéndices 1 y 2. Asimismo se podrá determinar la tasa de crecimiento resultante. Adicionalmente, se procurará monitorear la actividad de incorporación de fosfato y su acumulación por fitoplancton dominado por *C. raciborskii* en un lago eutrófico (ej.: lagos del Parque Miramar, Canelones). Los resultados del estudio propuesto permitirán conocer el rol de la flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato, y la capacidad y forma de acumulación del recurso, en la dominancia y persistencia de *C. raciborskii*. El estudio de los requerimientos nutricionales que gobiernan el crecimiento de cianobacterias en ambientes naturales contempla aspectos relevantes de investigación básica y aplicada.

# Capítulo 8

---

## Bibliografía

- 
- Albay M, Akcaalan R, Tufekci H, Metcalf JS, Beattie KA, Codd GA (2003). Depth profiles of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in three Turkish freshwater lakes. *Hydrobiologia*. 505: 89–95.
- Arrigo KR (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*. 437: 349–355.
- Aubriot L (2000). Comportamiento de incorporación de fosfato de la cianobacteria *Anacystis nidulans* en cultivos y de comunidades fitoplanctónicas en lagos hipereutróficos. Tesis de Maestría en Biología. PEDECIBA, Facultad de Ciencias, UdelaR.
- Aubriot L, Wagner F, Falkner G (2000). The phosphate uptake behaviour of phytoplankton communities in eutrophic lakes reflects alterations in the phosphate supply. *Eur J Phycol*. 376: 307–312.
- Bateson G (2000). *Steps to an Ecology of Mind*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR (1990). *Ecology. Individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific Publications, Boston, Oxford, London.
- Button DK (1985). Kinetics of nutrient-limited transport and microbial growth. *Microbiol Rev*. 49: 270–297.
- Christian JR (2005). Biogeochemical cycling in the oligotrophic ocean: Redfield and non-Redfield models. *Limnol Oceanogr*. 50: 646–657.
- Cotner JB, Ammerman JW, Peele ER, Bentzen E (1997). Phosphorus-limited bacterioplankton growth in the Sargasso Sea. *Aquat Microb Ecol*. 13: 141–149.
- De León L, Yunes JS (2001). First report of a Microcystin-Containing Bloom of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environm Toxicol*. 16: 110–112.
- Dokulil MT, Teubner K (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*. 438: 1–12.

- Dokulil MT, Teubner K (2003). Eutrophication and restoration of shallow lakes – the concept of stable equilibria revisited. *Hydrobiologia*. 506: 29–35.
- Droop MR (1973). Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J Phycol*. 9: 264–272.
- Droop MR (1974). Nutrient status of algal cells in continuous culture. *J Mar Biol Assoc UK*. 54:825–855.
- Ducobu H, Huisman J, Jonker RR, Mur LR (1998). Competition between a prochlorophyte and a cyanobacterium under various phosphorus regimes: comparison with the Droop model. *J Phycol*. 34: 467–476.
- Einsele W (1941). Die Umsetzung von zugeführtem, anorganischen Phosphat im eutrophen See und ihre Rückwirkungen auf seinen Gesamthaushalt. *Zeit Fisch Hilfsw*. 39: 407–488.
- Falkner G, Strasser P, Graffius D (1984). Phosphate uptake by blue-green algae during an algal bloom. *Verh Int Verein Limnol*. 22: 195–199.
- Falkner G, Falkner R, Schwab A (1989). Bioenergetic characterization of transient state phosphate uptake by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Arch Microbiol*. 152: 353–361.
- Falkner G, Falkner R, Wagner F (1993). Adaptive phosphate uptake behaviour of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*: analysis by a proportional flow-force relation. *C R Acad Sci Paris, Science de la vie/Life Sciences*. 316: 784–787.
- Falkner G, Wagner F, Falkner R (1994). On the relation between phosphate uptake and growth of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *C R Acad Sci Paris, Science de la vie/Life Sciences*. 317: 535–541.
- Falkner G, Wagner F, Small JV, Falkner R (1995). Influence of fluctuating phosphate supply on the regulation of phosphate uptake by the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *J Phycol*. 31:745–753.
- Falkner G, Wagner F, Falkner R (1996). The bioenergetic coordination of a complex biological system is revealed by its adaptation to changing environmental conditions. *Acta Biotheor*. 44: 283–99.
- Falkner G, Falkner R (2000). Objectivistic views in biology: an obstacle to our understanding of self organisation process in aquatic ecosystems. *Fresh Biol*. 44: 553–559.
- Falkner R, Falkner G (1989). Phosphate uptake by eukaryotic algae in cultures and by mixed phytoplankton population in a lake: Analysis by a force-flow relationship. *Botanica Acta*. 102: 283–286.
- Falkner R, Wagner F, Falkner G (1998). Phosphate-uptake behaviour of a mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7942 lacking one protein of the high-affinity phosphate-uptake system. *Planta*. 206: 461–465.
- Falkner R, Falkner G (2003). Distinct adaptivity during phosphate uptake by the cyanobacterium *Anabaena variabilis* reflects information processing about preceding phosphate supply. *J Trace Microprobe Techn*. 21: 363–75.

- Falkner R, Priewasser M, Falkner G (2006). Information processing by Cyanobacteria during adaptation to environmental phosphate fluctuations. *Plant Sign Behav.* 1: 212–220.
- Falkowski PG (2000). Rationalizing elemental ratios in unicellular algae. *J Phycol.* 16: 3–6.
- Fu F, Zhang Y, Bell P, Hutchins DA (2005). Phosphate uptake and growth kinetics of *Trichodesmium* (cyanobacteria) isolates from the North Atlantic Ocean and the Great Barrier Reef, Australia. *J Phycol.* 41: 62–73.
- Fuhs GW (1973). Cytochemical examination of blue-green algae. En: Carr NG, Whitton BA (eds). *The biology of blue-green algae*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 117–143.
- Geider RJ, La Roche J (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur J Phycol.* 37: 1–17.
- Gimmler H (1976). Photophosphorylation in vivo. En: Trebst A, Avron M (eds). *Photosynthetic Transport and photophosphorylation*, Encyclopedia of Plant Physiology 5. Springer-Verlag, Berlin. pp 448–472.
- Guillard RRL (1978). Counting Slides. En: Sournia A (ed). *Phytoplankton manual*, Unesco, Paris. pp 182–190.
- Hardin G (1960). The competitive exclusion principle. *Science.* 131: 1292–1297.
- Healey FP (1982). Phosphate. En: Carr NG, Whitton BA (eds). *The biology of cyanobacteria*, Monographs. 19. Blackwell Oxford Botanical. pp 105–124.
- Hillebrand H, Durselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohry T (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J Phycol.* 35: 403–424.
- Hudson JJ, Taylor WD, Schindler DW (2000). Phosphate concentrations in lakes. *Nature.* 406:54–56.
- Hudson JJ, Taylor WD (2005). Rapid estimation of phosphate at picomolar concentrations in freshwater lakes with potential application to P-limited marine systems. *Aquat Sci.* 67: 316–325.
- Huisman J, Weissing FJ (1999). Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature.* 402: 407–410.
- Huisman J, Weissing FJ (2000). Coexistence and resource competition. *Nature.* 407: 694.
- Huisman J, Johansson AM, Folmer EO, Weissing JF (2001). Towards a solution of the plankton paradox: the importance of physiology and the life history. *Ecol Letters.* 4: 408–411.
- Huisman J, Weissing FJ (2001). Biological conditions for oscillations and chaos generated by multispecies competition. *Ecology.* 82: 2682–2695.
- Hutchinson GE (1961). The paradox of the plankton. *American Nat.* 95: 137–147.
- Hutchinson GE (1975). A Treatise on Limnology. En: Wiley J, Sons Inc (eds). *Introduction to lake biology and the limnoplankton*. New York. pp 460.

- Istvánovics V, Pettersson K, Pierson D, Bell R (1992). Evaluation of phosphorus deficiency for summer phytoplankton in Lake Erken. *Limnol Oceanogr.* 37:890–900.
- Istvánovics V, Padisák P, Pettersson K, Pierson DC (1994). Growth and phosphorus uptake of summer phytoplankton in Lake Erken (Sweden). *J Plankton Res.* 16:1167–1196.
- Istvánovics V, Herodek S (1995). Estimation of net uptake and leakage rates of orthophosphate from  $^{32}\text{P}$ -uptake kinetics by a linear force-flow model. *Limnol Oceanogr.* 40: 17–32.
- Istvánovics V, Shafik HM, Présing M, Juhos S (2000). Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Fresh Biol.* 43: 257–275.
- Jackson LJ (2003). Macrophyte-dominated and turbid states of shallow lakes: evidence from Alberta lakes. *Ecosystems.* 6: 213–223.
- Klausmeier CA, Litchman E, Levin SA (2004). Phytoplankton growth and stoichiometry under multiple nutrient limitation. *Limnol Oceanogr.* 49: 1463–1470.
- Kruk C, Mazzeo N, Lacerot G, Reynolds CS (2002). Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *J Plankton Res.* 24: 1191–1216.
- Kulaev I, Vagabov V (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv Microb Physiol.* 24: 83–171.
- Lagerspetz KYH (2006). What is thermal acclimation? *J Therm Biol.* 31: 332–336.
- Liss E, Langen P (1962). Versuche zur Polyphosphatüberkompensation in Hefezellen nach Phosphatverarmung. *Archiv Mikrobiol.* 41: 383–392.
- Margalef R (1978). Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceano Acta* 1: 493–509.
- Mateo P, Douterelo I, Berrendero E, Perona E (2006). Physiological differences between two species of cyanobacteria in relation to phosphorus limitation. *J Phycol.* 42: 61–66.
- Monod J (1950). La technique de la culture continue: Theorie et applications. *Ann Inst Pasteur.* 79: 390–410.
- Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, Kuenen JG (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol.* 16: 177–184.
- Nusch EA (1980). Comparison of different methods for chlorophyll and haemopigments determination. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol.* 14: 14–36.
- Olsen Y (1989). Evaluation of competitive ability of *Staurastrum luetkemullerii* (Chlorophyceae) and *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) under P limitation. *J Phycol.* 25: 486–499.
- Plaetzer K, Thomas SR, Falkner R, Falkner G (2005). The microbial experience of environmental phosphate fluctuations: An essay on the possibility of putting intentions into cell biochemistry. *J Theor Biol.* 235: 540–554.

- Prosser CL (1955). Physiological variation in animals. *Biol Rev.* 30: 229–262.
- Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA (1963). The influence of organisms on the composition of sea-water. En: Hill MN (ed). *The sea*. Wiley. pp 26–77.
- Reynolds CS (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reynolds CS (1988). Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. En: Sandgren CD (ed). *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press, New York. pp 388–433.
- Reynolds CS (1997). Vegetation process in the pelagic: a model for ecosystem theory. En: Kinne O (ed). *Excellence in Ecology*. ECI, Oldendorf.
- Reynolds CS (1998). The state of freshwater ecology. *Fresh Biol.* 39: 741–753.
- Reynolds CS (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rhee GY (1973). A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate, and polyphosphate in *Scenedesmus sp.* *J Phycol.* 9: 459–506.
- Rhee GY, Gotham IJ (1981). The Effect of Environmental Factors on Phytoplankton Growth: Light and the Interactions of Light with Nitrate Limitation. *Limnol Oceanogr.* 26: 649–659.
- Richards FA (1965). Chemical Oceanography. En: Ripley JP, Skirrow G (eds). *Academic*, London. pp 611–645.
- Riegman R, Mur LR (1984). Regulation of phosphate uptake kinetics in *Oscillatoria agardhii*. *Arch Microbiol.* 139: 28–32.
- Rigler FH (1956). A tracer study of the phosphorus cycle in lake water. *Ecology.* 37: 550–562.
- Rodríguez-Gallego L, Mazzeo N, Gorga J, Meerhoff M, Clemente J, Kruk C, Scasso F, Lacerot G, García J, Quintans F (2004). The effects of an artificial wetland dominated by free-floating plants on the restoration of a subtropical, hypertrophic lake. *Lakes Reserv Res Manag.* 9: 203–215.
- Rosenberg H (1987). Phosphate transport in prokaryotes. En: Rosen BP, Silver S (eds). *Ion Transport in prokaryotes*. Academic Press, New York. pp 205–248.
- Roy S, Chattopadhyay J (2007). Towards a resolution of 'the paradox of the plankton': A brief overview of the proposed mechanisms. *Ecol Complex.* 4: 26–33.
- Scasso F, Mazzeo N, Gorga J, Kruk C, Lacerot G, Clemente J, Fabian D, Bonilla S (2001). Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its restoration: two years of a whole-lake experiment. *Aquat Cons Mar Freshwater Ecosyst.* 11: 31–44.
- Scheffer M, Rinaldi S, Gragnani A, Mur LR, van Nes EH (1997). On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology.* 78: 272–282.

- Scheffer M, van Nes EH (2007). Shallow lakes theory revisited: various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth and lake size. *Hydrobiologia*. 584: 455–466.
- Schindler D (1977). The evolution of phosphorous limitation in lakes. *Science*. 195: 260–262.
- Segel I (1975). Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley, New York.
- Sommer U (1989). The role of competition for resources in phytoplankton succession. En: Sommer U (ed). *Plankton ecology: succession in plankton communities*. Springer-Verlag, New York. pp 57–107.
- Sommer U (1995). An experimental test of the intermediate disturbance hypothesis using cultures of marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr*. 40: 1271–1277.
- Sommer U (1999). Competition and coexistence. *Nature*. 402: 366–367.
- Spijkerman E, Coesel PFM (1997). Growth kinetic parameters of two planktonic desmid species under fluctuating phosphorus conditions in continuous-flow culture. *J Plankton Res*. 19: 1899–1912.
- Smith SL, Yamanaka Y (2007). Optimization-based model of multnutrient uptake kinetics. *Limnol Oceanogr*. 52: 1545–1558.
- Strickland JDH, Parsons TR (1972). *A practical handbook of seawater analysis*. Fish Res Board, Ottawa, Canada.
- Stucki J (1980). The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation. *Eur J Biochem*. 109: 269–283.
- Stucki J, Compiani M, Caplan S (1983). Efficiency of energy conversion in model biological pumps: optimization by linear nonequilibrium thermodynamic relations. *Biophysic Chem*. 18: 101–109.
- Tafforeau M, Verdus MC, Norris V, Ripoll C, Thellier M (2006). Memory processes in the response of plants to environmental signals. *Plant Sign Behav*. 1: 9–14.
- Thellier M (1970). An electrokinetic interpretation of the functioning of biological systems and its application to the study of mineral salt absorption. *Ann Bot*. 34: 983–1009.
- Thellier M, Desbiez MO, Champagnat P, Kergosien Y (1982). Do memory processes also occur in plants? *Physiol Plant*. 56: 281–284.
- Thellier M, Le Sceller L, Norris V, Verdus MC, Ripoll C (2000). Long-distance transport, storage and recall of morphogenic information in plants. The existence of a sort of primitive plant 'memory'. *CR Acad Sci Paris, Science de la vie/Life Sciences*. 323: 81–91.
- Thellier M, Demongeot J, Norris V, Guespin J, Ripoll C, Thomas R (2004). A logical (discrete) formulation for the storage and recall of environmental signals in plants. *Plant Biol*. 6: 590–597.
- Tilman D (1982). *Resource competition and community structure*. Princeton University Press, Princeton.

- Valderrama JC (1981). The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. *Mar Chem.* 10: 109–122.
- Wagner F, Falkner G (1992). Concomitant changes in phosphate uptake and photophosphorylation in the blue-green algae *Anacystis nidulans* during adaptation to phosphate deficiency. *J Plant Physiol.* 140: 163–167.
- Wagner F, Gimona M, Ahorn H, Peschek GA, Falkner G (1994). Isolation and functional reconstruction of a phosphate binding protein of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* induced during phosphate-limited growth. *J Biol Chem.* 269: 5509–5511.
- Wagner F, Falkner R, Falkner G (1995). Information about previous phosphate fluctuations is stored via an adaptive response of the high-affinity phosphate uptake system of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Planta.* 197: 147–155.
- Wagner F, Sahan E, Falkner G (2000). The establishment of a coherent phosphate uptake behaviour by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Eur J Phycol.* 35: 243–253.
- Wehr JD, Sheath RG (2003). *Freshwater algae of North America.* Academic Press, Amsterdam.
- Westerhoff HV, Van Dam K (1979). Irreversible thermodynamic description of energy transduction in biomembranes. *Curr Top Bioenerg.* 9: 1–62.
- Wetzel RG (2001). *Limnology. Lake and river ecosystems.* Academic Press Elsevier Science. San Diego, California.

# Apéndices

## Apéndice 1

Para la simulación el proceso adaptativo de una comunidad de fitoplancton a los incrementos de concentración externa se utilizó el modelo fenomenológico de Plaetzer et al. (2005) basado en ecuaciones fundamentales de termodinámica lineal irreversible de la transducción de energía en membranas de cianobacteria (Westerhoff & Van Dam 1979). Se empleó el programa OrCAD PSpice en el cual "la dependencia de las fuentes de corriente en el voltaje" reflejan las propiedades de enzimas. En este modelo se utilizan dos relaciones lineales de flujo–fuerza: uno es acoplado a una ATPasa y el otro opera de forma reversible con un canal de H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Esto permite ajustar los grados de acoplamiento por medio de cocientes de los coeficientes de conductividad para el proceso flujo activo y pasivo a través de la membrana celular ( $J_p^{act}$  y  $J_p^{pas}$ , respectivamente). Las siguientes relaciones de flujo–fuerza fueron empleadas (ver Glosario de símbolos, página viii):

$$J_p^{act} = L_1 \log \left( K_1 \frac{[P_e]}{[P_i]} \right) + \alpha L_1 \log \left( K_{ATP} \frac{[ATP]}{[P_i][ADP]} \right)$$

$$J_p^{pas} = L_{pas} \log \left( K_1 \frac{[P_e]}{[P_i]} \right)$$

La formación de ATP está impulsada por el gradiente de pH a través de la membrana tilacoide  $\Delta pH$  (Wagner & Falkner 1992) y es modelado por la ecuación:

$$J_{ATP} = L_2 \log \left( K_{ATP}^{-1} \frac{[P_i][ADP]}{[ATP]} \right) + L_2 \Delta pH$$

La formación de polifosfato se realiza mediante la conversión de  $P_n$  a  $P_{n+1}$ , en los cuales  $P_n$  y  $P_{n+1}$  se asumen con la misma actividad química, y se modelan con la ecuación:

$$J_{pp} = L_3 \log \left( \frac{[ATP]}{[ADP]} \right)$$

Código del programa PSpice, modificado en la presente tesis para tres especies y utilizando una ramificación condicional (comando *if*):

Incorporación de fosfato

```
.param np=3 deltaph=3 K=1e-8
cpa 1 0 10 ic=1e-3
rinf1 1 0 1e30
vsens 1 1a 0

*especie 1
.param L1s1=3e-6 L2s1=1e-5 L3s1=5.5e-4 as1=5.02e-6
cpis1 2s1 0 1e-4 ic=1e-1
rinf2s1 2s1 0 1e30
catps1 3s1 0 1e-4 ic=2
rinf3s1 3s1 0 1e30
cpps1 4s1 0 100 ic=1e-9
rinf4s1 4s1 0 1e30
* es el voltage de PP mayor que 0?
* si -> es el tiempo <3000?
```

```

*      si -> usar deltaph anteriores (2.6)
*      no -> es el voltage mayor a la concentración de ATP?
*      si -> usar nuevo deltaph (2.55)
*      no -> usar deltaph anterior (2.6)
* no -> 0
g1s1 1a 2s1 value={if(v(4s1)>0,if(time<3000,L1s1*(log10(v(1)/v(2s1))+2.6),if(v(1)>as1*5,
+L1s1*(log10(v(1)/v(2s1))+2.55),L1s1*(log10(v(1)/v(2s1))+2.6))),0)}
g2s1 2s1 3s1 value={L2s1*(log10(K*(v(2s1)/v(3s1))*(4-v(3s1))))+np*deltaph)}
g3s1 3s1 4s1 value={L3s1*log10(v(3s1)/(4-v(3s1)))}

* especie 2
.param L1s2=1e-6 L2s2=1e-5 L3s2=5.5e-4 as2=5.02e-6
cpis2 2s2 0 1e-4 ic=1e-1
rinf2s2 2s2 0 1e30
catps2 3s2 0 1e-4 ic=2
rinf3s2 3s2 0 1e30
cpps2 4s2 0 100 ic=1e-9
rinf4s2 4s2 0 1e30
g1s2 1a 2s2 value={if(v(4s2)>0,if(time<3000,L1s2*(log10(v(1)/v(2s2))+2.8),if(v(1)>as2*5,
+ L1s2*(log10(v(1)/v(2s2))+2.55),L1s2*(log10(v(1)/v(2s2))+2.8))),0)}
*g1s2 1a 2s2 value={if(v(4s2)>0,L1s2*(log10(v(1)/v(2s2))+3.8),0)}
g2s2 2s2 3s2 value={L2s2*(log10(K*(v(2s2)/v(3s2))*(4-v(3s2))))+np*deltaph)}
g3s2 3s2 4s2 value={L3s2*log10(v(3s2)/(4-v(3s2)))}

* especie 3
.param L1s3=0.1e-6 L2s3=1e-5 L3s3=5.5e-4 as3=5.02e-6
cpis3 2s3 0 1e-4 ic=1e-1
rinf2s3 2s3 0 1e30
catps3 3s3 0 1e-4 ic=2
rinf3s3 3s3 0 1e30
cpps3 4s3 0 100 ic=1e-9
rinf4s3 4s3 0 1e30
g1s3 1a 2s3 value={if(v(4s3)>0,if(time<3000,L1s3*(log10(v(1)/v(2s3))+4.0),if(v(1)>as3*5,
+ L1s3*(log10(v(1)/v(2s3))+2.55),L1s3*(log10(v(1)/v(2s3))+4.0))),0)}
g2s3 2s3 3s3 value={L2s3*(log10(K*(v(2s3)/v(3s3))*(4-v(3s3))))+np*deltaph)}
g3s3 3s3 4s3 value={L3s3*log10(v(3s3)/(4-v(3s3)))}
.tran .1 100000 uic
.options reltol=0.001m
.probe
.end

```

## Apéndice 2

En el Capítulo 3, se simuló la incorporación de fosfato por tres especies con parámetros cinéticos predefinidos, para mostrar modos de incorporación independientes (competitivos) y coordinados (homogéneos). Las curvas de remoción simuladas fueron comparadas con los resultados experimentales. En el presente análisis, se partió de un resultado experimental concreto, con el fin de calcular los parámetros cinéticos ( $L_p$  y  $[P_e]_A$ ) correspondientes a cada una de las dos especies dominantes (*Planktothrix agardhii* y *Raphidiopsis mediterranea*). Se analizó el experimento de la Figura 4-8, del cual se reproduce una parte en el gráfico adjunto (intervalo de tiempo: 17 – 30 h). Dicho experimento consistió en la aplicación de un pretratamiento con diez pulsos de 1  $\mu\text{M}$  a la submuestra  $S_1$  (círculos negros) y un pulso de 10  $\mu\text{M}$  fosfato a  $S_2$  (círculos blancos). La gráfica muestra las curvas de remoción de un pulso de 2  $\mu\text{M}$  fosfato a cada submuestra de fitoplancton, luego de 17 horas de iniciado el pretratamiento. Se partió de la primera hipótesis presentada en la Discusión del Capítulo 4: la cinética compleja resultante se debe al comportamiento de incorporación independiente entre las dos especies dominantes en el ambiente, *P. agardhii* y *R. mediterranea* (similar al simulado en la Figura 3-12A, Capítulo 3). Para el análisis se consideró el siguiente supuesto: el tramo inicial de

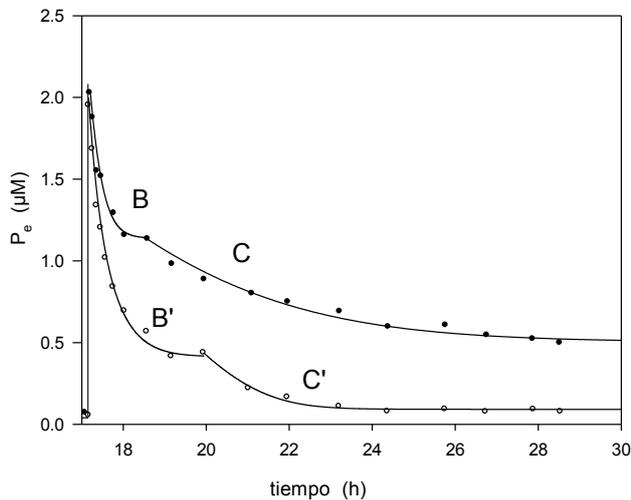


Figura 4-14. Intervalo del transcurso de la incorporación neta de  $[^{32}\text{P}]$  fosfato en dos submuestras de fitoplancton ( $S_1$ , círculos negros y  $S_2$ , círculos blancos) obtenido del la Figura 4-8. El pretratamiento consistió en 10 pulsos de 1  $\mu\text{M}$  agregados a la submuestra  $S_1$  y 1 pulso de 10  $\mu\text{M}$  a  $S_2$ . Luego de 17 horas, se agregó un pulso de 2  $\mu\text{M}$  a cada submuestra de fitoplancton. Las curvas continuas representan el mejor ajuste computado con la relación no lineal de flujo-fuerza (B y B') y lineal en C y C'. Los parámetros de los ajustes se muestran en la tabla 4-1.

la curva de remoción correspondería a la actividad de remoción de ambas especies (curvas B y B') y el sector final solo a la especie que tiene un umbral más bajo (curvas C y C'). Por lo tanto, se calcularon solo los parámetros correspondientes a la especie 1, debido a que los correspondientes a la especie 2 fueron obtenidos del ajuste de las curvas C y C'.

El flujo de fosfato  $J_p$  de cada especie estudiada separadamente, para una unidad de biomasa, se representó como  $J_{p1}$  y  $J_{p2}$ , especie 1 y 2, respectivamente:

$$J_{p1} = L_1 (\log[P_e] - \log[P_e]_{A1}) \quad J_{p2} = L_2 (\log[P_e] - \log[P_e]_{A2})$$

Los coeficientes de conductividad  $L_1$  y  $L_2$ , y los valores umbrales  $[P_e]_{A1}$  y  $[P_e]_{A2}$  corresponden a la especie 1 y 2, respectivamente. En el sistema formado por las dos especies,  $L_1$  y  $L_2$  deben multiplicarse por la fracción de la biomasa total ( $b_T = b_1 + b_2$ ) que corresponde a cada especie, las que se denominaron  $\alpha$  y  $\beta$ , especie 1 y 2 respectivamente.

$$\alpha = \frac{b_1}{b_1 + b_2} \quad \beta = \frac{b_2}{b_1 + b_2} = (1 - \alpha)$$

Entonces, el flujo total  $J_p^T$  puede ser expresado como:

$$J_p^I = \alpha J_{p1} + (1-\alpha)J_{p2}$$

Operando sobre esta ecuación se tiene:

$$J_p^I = \alpha L_1 (\log[P_e] - \log[P_e]_{A1}) + (1-\alpha)L_2 (\log[P_e] - \log[P_e]_{A2})$$

$$J_p^I = (\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2) \log[P_e] - (\alpha L_1 \log[P_e]_{A1} + (1-\alpha)L_2 \log[P_e]_{A2})$$

$$J_p^I = (\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2) \left[ \log[P_e] - \left( \frac{\alpha L_1 \log[P_e]_{A1} + (1-\alpha)L_2 \log[P_e]_{A2}}{\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2} \right) \right]$$

Si  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $[P_e]_{A1}$  y  $[P_e]_{A2}$  no cambian en el curso del experimento, entonces esta ecuación representa también una relación de tipo flujo fuerza donde el coeficiente de conductividad total  $L_p^I$  queda expresado como:

$$L_p^I = \alpha L_1 + (1-\alpha)L_2$$

y el logaritmo del valor umbral  $[P_e]_A^I$  es:

$$\log[P_e]_A^I = \frac{\alpha L_1 \log[P_e]_{A1} + (1-\alpha)L_2 \log[P_e]_{A2}}{(\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2)}$$

En suma, el sistema formado por las dos especies, cada una regida por una ecuación de tipo flujo fuerza, con parámetros  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $[P_e]_{A1}$  y  $[P_e]_{A2}$  que no cambian, se comporta también de acuerdo a una ecuación de tipo flujo fuerza, siendo los valores de  $L_p^I$  y  $\log[P_e]_A^I$  calculables a partir de  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $[P_e]_{A1}$  y  $[P_e]_{A2}$  como se indica más arriba.

Transformaremos ahora la última ecuación para  $[P_e]_A^I$  en función de  $[P_e]_{A1}$  y  $[P_e]_{A2}$  de forma de obtener una expresión más simple:

$$\log[P_e]_A^I = \frac{\alpha L_1}{\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2} \log[P_e]_{A1} + \frac{(1-\alpha)L_2}{\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2} \log[P_e]_{A2}$$

$$f1 \equiv \frac{\alpha L_1}{\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2} \quad f2 \equiv \frac{(1-\alpha)L_2}{\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2}$$

$$\log[P_e]_A^I = f1 \log[P_e]_{A1} + f2 \log[P_e]_{A2} = \log([P_e]_{A1})^{f1} + \log([P_e]_{A2})^{f2}$$

$$\log[P_e]_A^I = \log\left(\left([P_e]_{A1}\right)^{f1} \cdot \left([P_e]_{A2}\right)^{f2}\right)$$

Entonces:

$$[P_e]_A^I = \left([P_e]_{A1}\right)^{f1} \cdot \left([P_e]_{A2}\right)^{f2}$$

En resumen,  $J_p^I$  se puede expresar como:

$$J_p^I = (\alpha L_1 + (1-\alpha)L_2) \left[ \log[P_e] - \log\left(\left([P_e]_{A1}\right)^{f1} \cdot \left([P_e]_{A2}\right)^{f2}\right) \right]$$

con el coeficiente de conductividad total  $L_p^I$  expresado como

$$L_p^I = \alpha L_1 + (1-\alpha)L_2$$

y el valor umbral de las dos especies  $[P_e]_A^I$ :

$$[P_e]_A^I = \left([P_e]_{A1}\right)^{f1} \cdot \left([P_e]_{A2}\right)^{f2}$$

Recordemos que esta ecuación flujo fuerza sería válida para la primera fase de las curvas donde están actuando las dos especies, mientras que en la segunda fase suponemos que estaría actuando solamente la especie 2. Por lo tanto, se puede calcular el valor umbral de la especie 1 como:

$$[P_e]_{A1} = f1 \sqrt{\frac{[P_e]_{A1}^T}{([P_e]_{A2})^2}}$$

y el correspondiente  $L_1$  como:

$$L_1 = \frac{L_p^T - (1-\alpha)L_2}{\alpha}$$

Para el cálculo del  $[P_e]_{A1}$  y  $L_1$  se utilizó la fracción de biomasa correspondiente a cada especie, la cual se determinó con el porcentaje del biovolumen total de la submuestra (especie 1,  $B_T$  *P. agardhii* = 65.9% y especie 2,  $B_T$  *R. mediterranea* = 33.6%). Entonces  $\alpha = 0.66$ , de la especie 1 y  $(1-\alpha) = 0.34$ , de la especie 2. Sin embargo, cabe resaltar que con la información disponible no es posible identificar a qué especie corresponde el segundo tramo de la curva de remoción.

Se partió de los siguientes valores conocidos tomados de las curvas de remoción de fosfato de la submuestra  $S_1$  de la Tabla 4-1, ajustados con la relación lineal de flujo-fuerza, para el cálculo de  $L_1$  y  $[P_e]_{A1}$  (especie 1):

Valores conocidos totales en $S_1$	Valores conocidos (especie 2)	Valores hallados (especie 1)
$L_p^T = 80.0 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$	$L_2 = (1-\alpha)3.5 \cdot 10^{-3} = 10.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$	<b><math>L_1 = 126.5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}</math></b>
$[P_e]_{A1}^T = 1.137 \mu\text{M}$	$[P_e]_{A2} = 0.503 \mu\text{M}$	<b><math>[P_e]_{A1} = 1.180 \mu\text{M}</math></b>

Los valores tomados de las curvas de remoción de fosfato de la submuestra  $S_2$  (Tabla 4-1), ajustados con la relación lineal de flujo-fuerza, para el cálculo de  $L_1$  y  $[P_e]_{A1}$  (especie 1) fueron:

Valores conocidos totales en $S_2$	Valores conocidos (especie 2)	Valores hallados (especie 1)
$L_p^T = 36.4 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$	$L_2 = (1-\alpha)2.5 \cdot 10^{-3} = 7.35 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$	<b><math>L_1 = 51.4 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}</math></b>
$[P_e]_{A1}^T = 0.497 \mu\text{M}$	$[P_e]_{A2} = 0.092 \mu\text{M}$	<b><math>[P_e]_{A1} = 0.563 \mu\text{M}</math></b>

La cinética de incorporación de la especie 1 en ambas submuestras mostró valores de  $L_1$  un orden de magnitud mayor a los de la especie 2. El  $[P_e]_{A1}$  fue de 2 a 6 veces superior al de la especie 2. Cuando se realiza la comparación de cada especie entre la submuestra  $S_1$  y  $S_2$  se observa que la especie 1 incrementó en un factor de dos el  $[P_e]_{A1}$ , mientras que la especie 2 lo hizo en un factor de 5.5. Asimismo, el  $L_{p2}$  disminuyó 1.4 veces y el  $L_{p1}$  2.5 veces. Estos resultados muestran que ambas especies manifestaron una importante plasticidad de respuesta, aunque ésta fue mayor en la modificación del  $[P_e]_A$  de la especie 2.

Si se invierten las proporciones de biomasa entre las dos especies, tal que la especie 1 tenga un  $\alpha = 0.34$ , y la especie 2  $(1-\alpha) = 0.66$ , y se mantienen los valores conocidos totales para las submuestras  $S_1$  y  $S_2$ , el  $[P_e]_{A2}$  la especie 2 pasa a tener los mismos valores a los de la especie 1 del caso anterior. Los valores de  $L_2$  fueron los que sufrieron modificación:

Valores conocidos totales en $S_1$	Valores conocidos (especie 1)	Valores hallados (especie 2)
$L_p^T = 80.0 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$	$L_1 = (1-\alpha)3.5 \cdot 10^{-3} = 5.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$	<b><math>L_2 = 225.0 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}</math></b>
$[P_e]_{A1}^T = 1.137 \mu\text{M}$	$[P_e]_{A1} = 0.503 \mu\text{M}$	<b><math>[P_e]_{A2} = 1.180 \mu\text{M}</math></b>

Valores conocidos totales en $S_2$	Valores conocidos (especie 1)	Valores hallados (especie 2)
$L_p^T = 36.4 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$	$L_1 = (1-\alpha) 2.5 \cdot 10^{-3} = 3.79 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$	<b><math>L_2 = 99.9 \cdot 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}</math></b>
$[P_e]_{A1}^T = 0.497 \mu\text{M}$	$[P_e]_{A1} = 0.092 \mu\text{M}$	<b><math>[P_e]_{A2} = 0.563 \mu\text{M}</math></b>

En este caso, los valores de  $L_2$  fueron casi dos órdenes de magnitud mayores que los de la especie 1. La disminución de  $L_1$  entre submuestras fue la misma que la de  $L_2$  del caso anterior (1.4 veces). El  $L_2$  disminuyó en un factor de 2.2 entre las submuestras. La mayor diferencia en los parámetros de este segundo ejemplo, consistió en la duplicación del valor de  $L$  cuando se invierte la relación de biomasa asignada a cada especie.

Partiendo del supuesto de la independencia de comportamiento de incorporación de fosfato, puede concluirse que se produjo una respuesta de la cinética diferente en cada especie (no homogénea), asociada a los pulsos aplicados en el pretratamiento. Esta respuesta puede deberse a diferencias en la plasticidad fisiológica de cada taxón, observándose que la especie que incorporó el fosfato a concentraciones más bajas, fue la que modificó mayormente su valor umbral (especie 2, en nuestro ejemplo).