

Comportamiento de incorporación de fosfato de la cianobacteria *Anacystis nidulans* en cultivos y de comunidades fitoplanctónicas en lagos hipereutróficos

LUIS E. AUBRIOT BENIA

ORIENTADOR: DR. FERDINAND WAGNER
Institute of Limnology Mondsee, Austrian Academy of Sciences

CO-ORIENTADOR: DR. NÉSTOR MAZZEO
Sección Limnología, Facultad de Ciencias

APROBADA POR: DR. EUGENIO PRODANOV
*Unidad Enzimología, Facultad de Medicina
(Presidente del Tribunal de Tesis)*

DR. LUIS ACERENZA
Sección Biofísica, Facultad de Ciencias

DRA. ALICE ALTESOR
Sección Ecología Terrestre, Facultad de Ciencias

LUGAR Y FECHA DE DEFENSA DE LA TESIS:

Miércoles 22 de marzo de 2000
Facultad de Ciencias, Iguá 4225, 11400-Montevideo Uruguay

TESIS DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA - OPCIÓN ECOLOGÍA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE CIENCIAS BÁSICAS
(PEDECIBA)

a good traveller has no fixed plans and
is not intent on arriving

lao tzu
(570 - 490
bc)

AGRADECIMIENTOS

Los orígenes no formales de esta tesis se remontan a 1995 cuando tuve la oportunidad de realizar el Curso de Posgrado en Limnología en el Instituto de Limnología de Mondsee, Austria (Curso IPGL). En aquel entonces, los organizadores de dicho curso nos dieron la posibilidad de realizar una pasantía de tres meses. Gracias a ello comencé a conocer y a formarme, con muchas dificultades, en un área casi desconocida para mí, la que despertó inmediatamente una fuerte motivación que aún permanece. Es por esto que estoy profundamente agradecido a mi orientador Dr. Ferdinand Wagner, quien se dedicó generosamente a enseñarme cómo proceder en ciencia experimental, por su apoyo constante durante estos años y su sincera amistad. Le estoy agradecido también por otorgarme una beca de seis meses para realización de la primera etapa de la tesis en su laboratorio, financiada por el proyecto N° 5791 del Austrian National Bank.

Agradezco profundamente al Dr. Gernot Falkner, quien ha sido una fuente de constante inspiración, motivación y optimismo, alentándome con sus apasionantes charlas y discusiones "de pasillo". Por él tengo una sincera y profunda admiración. Ferdinand y Gernot, además de formarme en investigación, me enseñaron la forma sutil de "robar" algunos secretos a estos pequeños y sensibles organismos.

Varias personas del Instituto de Limnología de Mondsee, participaron directa o indirectamente en la realización de este trabajo de tesis. Agradezco a Annemarie Henning, secretaria del curso de posgrado, por su ayuda en todo momento, por su apoyo, por su entrañable amistad y comprensión. También por las repetidas y deliciosas cenas austríacas típicas junto a sus hijos y a su inseparable Nanna.

Agradezco a Lotte Eisl por su amigable asistencia técnica en el mantenimiento de los cultivos y su desinteresada ayuda. También agradezco a los amigos que hicieron que mi estadía en esas tierras alpinas fuera más cálida y disfrutable, y a quienes uno recurrió cuando el ánimo perdió fuerza. Ellos son: Meriç Albay, Sirma Çapar, Jayanthi, Kristjan Plätzer y Özlem İnçe.

Al director del curso IPGL, Gerold Winkler, quien puso a disposición generosamente su material informático e instalaciones durante mi estadía en marzo-abril de 1999.

En Uruguay, varias personas de la Sección Limnología han prestado desinteresadamente su colaboración para la realización de este trabajo y quiero hacerles llegar mi sincero agradecimiento. En primer lugar agradezco a los directores de la Sección, Daniel Conde y Rafael Arocena, por su confianza y apoyo. Especialmente a mis amigos Daniel, Sylvia Bonilla y Javier Gorga por sus interesantes comentarios, correcciones y aportes invaluable, quienes me alentaron en todo momento. Agradezco a Sylvia y Carla Kruk por aportar su ayuda para la identificación de los géneros encontrados y para el análisis cuantitativo de fitoplancton. Todos los compañeros de la Sección Limnología han participado de una u otra forma en la realización de esta tesis, a quienes agradezco también por su apoyo y amistad.

A otro amigo de la Sección, Ruben Sommaruga, por los aportes realizados, quien, a pesar de la distancia, se dispuso a leer y corregir el manuscrito rápidamente, haciéndolo de forma rigurosa y exhaustiva. También le agradezco las repetidas invitaciones y su hospitalidad en Innsbruck. Agradezco a mi co-orientador Néstor Mazzeo por hacer posible la realización de esta tesis en nuestro país.

A la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias y su director Dr. Ricardo Ehrlich, por permitir que este trabajo tuviera continuidad, posibilitando que se utilizaran las instalaciones de Tirstán Narvaja 1674 durante el traslado de esta Facultad al nuevo edificio en Malvin Norte. Agradezco la buena disposición y el apoyo de sus integrantes, en especial a Claudio Martínez, Atilio Deana y Beatriz Garat, quienes también me facilitaron la tarea de importar el material radiactivo.

Agradezco al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis y por otorgarme una beca de Maestría por un año.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el otorgamiento de una beca para realizar una pasantía en el Instituto de Limnología, Mondsee, Austria (marzo-abril de 1999), que posibilitó la discusión final de los resultados con mi orientador y la preparación de un manuscrito para su posterior publicación.

Los integrantes del tribunal de Maestría realizaron aportes y correcciones que mejoraron, sin duda, el resultado final. Agradezco especialmente el sincero interés y la buena disposición que mostró el Dr. Luis Acerenza.

Agradezco muy especialmente el apoyo incondicional de mi familia, quienes siempre estuvieron conmigo, y más aún durante mis repetidas ausencias. También a Maika.

Marila, imprescindible para que pudiera dar lo mejor de mí, fue más que paciencia, apoyo y comprensión. Además, aportó su visión crítica y sus amplios conocimientos. Esta tesis es uno de los tantos caminos que quisimos recorrer juntos.

RESUMEN

El fósforo es un elemento potencialmente limitante para el crecimiento de microalgas, por lo cual el conocimiento de la cinética de incorporación tiene un interés fundamental en estudios de ecología acuática. El crecimiento algal requiere que la concentración ambiental de fosfato se eleve sobre una determinada concentración umbral, por debajo de la cual la energía es insuficiente para sustentar la incorporación del fosfato externo.

En la presente tesis se investigó el comportamiento de incorporación neta de fosfato de la cianobacteria *Anacystis nidulans* [*Synechococcus leopoliensis* (Raciborski) Komarek], cultivada en condiciones de deficiencia por el nutriente, y de comunidades naturales de fitoplancton en dos lagos hipereutróficos, Lago Canteras y Lago Rodó (Montevideo, Uruguay). El estudio de la cinética de incorporación neta de fosfato en cultivos se realizó mediante el marcado de las algas con [³²P] fosfato durante el crecimiento. En el caso de comunidades naturales de fitoplancton, fue necesario premarcarlas con pulsos subsecuentes de fosfato radiactivo previo a los experimentos de incorporación. Este procedimiento posibilitó la medición de la incorporación neta de este trazador pudiendo determinar el valor umbral de una comunidad fitoplanctónica en un lago. Los resultados obtenidos con poblaciones de *A. nidulans* y comunidades naturales de fitoplancton fueron analizados utilizando una relación de flujo-fuerza proporcional que permite evaluar dos parámetros característicos: un coeficiente de conductividad (L_p) que refleja la actividad de los sistemas de incorporación, y una concentración umbral $[P_e]_A$ donde la incorporación neta de fosfato cesa por razones energéticas.

Los resultados muestran que *A. nidulans* responde a breves fluctuaciones de fosfato en el medio a través de cambios en las propiedades cinéticas y energéticas del sistema de absorción. Esta adaptación cinética fue independiente de la concentración inicial externa de fosfato y de la concentración de polifosfato celular, aunque se asociaron al tiempo en que el fosfato permaneció estable en el medio por encima del valor umbral de la población. *A. nidulans* mostró una capacidad de adoptar varios estados fisiológicos manifestado en los diferentes valores umbrales de fosfato alcanzados. Estas propiedades del sistema de incorporación fueron mantenidas durante varias horas luego de agregado el pulso de fosfato, e incluso se mantuvieron una vez iniciadas las divisiones celulares. Durante este período se observó una alteración en la composición de los principales pigmentos fotosintéticos, demostrándose que la división celular se inicia luego de la reorganización del sistema de recolección de energía lumínica. Las consecuencias del comportamiento adaptativo de *A. nidulans* se discuten en relación al crecimiento de poblaciones en ambientes con un suministro fluctuante de fosfato.

La remoción neta de fosfato de los experimentos con fitoplancton de los lagos estudiados se ajustaron destacablemente bien a la relación flujo-fuerza. Se obtuvieron cambios considerables en L_p del fitoplancton del Lago Canteras, mientras que los valores umbrales de la comunidad permanecieron incambiados. Estas alteraciones de la cinética de incorporación de fosfato fueron observadas posteriormente en un estudio más detallado con poblaciones fitoplanctónicas provenientes del Lago Rodó. La disponibilidad de fosfato en el Lago Rodó fue variable entre diciembre de 1997 y julio de 1998

resultando en diferentes estados de deficiencia por fosfato del fitoplancton. Demostramos que el fitoplancton respondió a las alteraciones en la concentración del nutriente en el lago, a través de cambios característicos en L_p y $[P_e]_A$. De este modo, el comportamiento de incorporación de la comunidad obedeció siempre esta relación lineal en un rango extenso de concentración, en contraste con las expectativas de la termodinámica lejana al equilibrio. Posteriormente, en base a estos resultados, se realizaron experimentos preliminares para determinar si el fitoplancton es potencialmente capaz de sobrellevar un evento adaptativo de forma similar al determinado en *A. nidulans*. Los resultados sugieren que la comunidad tendría la capacidad de alterar L_p y $[P_e]_A$ a corto plazo, como respuesta a concentraciones elevadas de fosfato externo sobre el valor umbral. Las características de incorporación exhibidas por los grupos multiespecíficos de fitoplancton, se discuten en relación a un posible comportamiento coherente de los componentes de estas comunidades.

ABSTRACT

Since phosphorus is an element that potentially limits algal growth, the kinetics of phosphate uptake is a fundamental issue in aquatic ecology. Algal growth requires that the environmental phosphate concentration fluctuates over a threshold value below which the available energy becomes insufficient to sustain the uptake.

In this thesis, the net phosphate uptake behaviour of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* [*Synechococcus leopoliensis* (Raciborski) Komarek] cultivated under phosphate-deficient conditions and of natural phytoplankton assemblages from two hypereutrophic lakes (Lago Canteras and Lago Rodó, Montevideo, Uruguay), was investigated. The study of the net phosphate uptake in cultures is achieved by labelling the algae with [^{32}P] phosphate during growth. For phytoplankton communities it was necessary to prelabel the algae with subsequent pulses of radioactive phosphate prior to the uptake experiments. This procedure allows to measure the net incorporation of the tracer and makes possible to determine the threshold value of phytoplankton communities in lakes. The data were analyzed using a proportional flow-force relationship which allows to evaluate two characteristic parameters: a conductivity coefficient (L_p) that reflects the overall activity of the uptake systems, and a threshold concentration ($[\text{P}_e]_A$) at which net incorporation of phosphate ceases due to energetic reasons.

The results corroborate that the adaptive response of *A. nidulans* to brief phosphate fluctuations is revealed by changes in the kinetic and energetic properties of the uptake system. These kinetic alterations were independent of the initial external phosphate concentration and the size of the polyphosphate pool, but they were associated to the time that phosphate concentration remains over the threshold value of the population. Furthermore, the cyanobacterium was able to adopt several physiological states, which were expressed in the attainment of different threshold values. These properties of the uptake system were maintained along several hours after the pulse addition, even after the cells started the division. During this period, an alteration of the main photosynthetic pigment pattern was observed and the subsequent divisions started once the cells have reorganized the light harvesting machinery. The consequences of the adaptive behaviour of *A. nidulans* on the growth of natural populations under a fluctuating phosphate supply condition are discussed.

The time-course of net phosphate removal of phytoplankton from the lakes studied usually followed remarkably well the flow-force relationship. A modification of L_p of phytoplankton from Lago Canteras between two samplings was observed, meanwhile $[\text{P}_e]_A$ remained unchanged. These alterations of the uptake kinetics were observed in a more detailed study with phytoplankton populations from Lago Rodó. Between December 1997 and July 1998 in Lago Rodó phosphate supply by inflowing groundwater was periodically interrupted resulting in distinct states of phosphate deficiency. We show that the phytoplankton responded to alterations in the phosphorus status of the lake by characteristic changes in L_p and $[\text{P}_e]_A$. Therefore, the uptake behaviour of the phytoplankton community obeyed the linear flow-force relationship over a wide concentration range, in contrast to expectations of non-equilibrium thermodynamics. Based on these results, preliminary experiments were performed to determine if a given phytoplankton community is able to undergo an adaptive event as it was shown for *A. nidulans* populations. These results suggest that the community exhibits the capacity to alter L_p and $[\text{P}_e]_A$ as a short term response to elevated phosphate concentrations over the threshold value. The observed uptake characteristics exhibited by multi-specific phytoplankton assemblages are discussed in relation to a possible coherent behaviour of the constituents of these communities.

ÍNDICE

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. | Incorporación de fosfato y crecimiento de algas en un ambiente limitado por nutrientes | 2 |
| 1.2. | Dificultades en la determinación de la incorporación neta de fosfato en comunidades naturales | 3 |
| 1.3. | Bases teóricas para el análisis del comportamiento de incorporación de fosfato | 4 |
| 1.4. | Alcances de la presente investigación | 11 |
| 1.4.1. | Objetivos | 12 |
| 1.4.1.1. | Objetivo general | 12 |
| 1.4.1.2. | Objetivos específicos | 13 |
| 2. | MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 2.1. | CULTIVO DE LA CIANOBACTERIA <i>ANACYSTIS NIDULANS</i> | 15 |
| 2.1.1. | Condiciones de crecimiento | 15 |
| 2.1.2. | Condiciones de deficiencia por fosfato y cultivo semicontinuo | 15 |
| 2.2. | ESTUDIOS DE CAMPO | 16 |
| 2.2.1. | Área de estudio | 16 |
| 2.2.2. | Obtención y procesamiento de las muestras | 18 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2.3. | Mediciones <i>In situ</i> | 18 |
| 2.3. | DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN NETA DE FOSFATO | 18 |
| 2.3.1. | Experimento de laboratorio con cultivos de <i>Anacystis nidulans</i> | 18 |
| 2.3.1.1. | Procedimiento de premarcado durante el crecimiento | 18 |
| 2.3.1.2. | Medición de la incorporación neta de fosfato | 19 |
| 2.3.2. | Estudios de la incorporación neta de fosfato con comunidades naturales de fitoplancton | 19 |
| 2.3.2.1. | Procedimiento de premarcado | 19 |
| 2.3.2.2. | Medición de la incorporación neta de fosfato | 20 |
| 2.4. | DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS | 21 |
| 2.4.1. | Análisis químico de muestras de agua | 21 |
| 2.4.2. | Determinación de clorofila <i>a</i> | 21 |
| 2.4.3. | Espectro de absorbancia celular | 21 |
| 2.5. | ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ORGANISMOS | 22 |
| 2.5.1. | Determinación de la concentración celular en cultivos | 22 |
| 2.5.2. | Análisis cuantitativo y cualitativo de fitoplancton | 22 |
| 2.6. | ANÁLISIS DE LOS DATOS | 23 |
| 3. | RESULTADOS | 24 |
| 3.1. | COMPORTAMIENTO DE INCORPORACIÓN EN <i>ANACYSTIS NIDULANS</i> BAJO CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEFICIENTE POR FOSFATO | 25 |
| 3.1.1. | Transcurso de la incorporación de fosfato a través del seguimiento de la remoción de este nutriente del medio externo | 25 |
| 3.1.2. | Alteraciones cinéticas y energéticas del sistema de incorporación | 27 |
| 3.1.3. | Incorporación de fosfato y alteraciones del patrón de pigmentos durante la fase de crecimiento | 35 |
| 3.2. | INCORPORACIÓN DE FOSFATO POR COMUNIDADES DE FITOPLANCTON EN LAGOS HIPEREUTRÓFICOS | 43 |
| 3.2.1. | Monitoreo de las condiciones físico-químicas en los lagos Canteras y Rodó | 43 |
| 3.2.2. | Incorporación de fosfato por comunidades de fitoplanctónicas en el Lago Canteras | 44 |
| 3.2.3. | Incorporación de fosfato por comunidades fitoplanctónicas en el Lago Rodó | 47 |
| 3.2.4. | Estudios preliminares sobre el comportamiento adaptativo de comunidades naturales expuestas a un suministro fluctuante de fosfato | 57 |
| 4. | DISCUSIÓN | 64 |
| 4.1. | LA RESPUESTA DE LA CIANOBACTERIA <i>ANACYSTIS NIDULANS</i> A LAS FLUCTUACIONES DE FOSFATO REVELA SU FLEXIBILIDAD ADAPTATIVA | 65 |
| 4.1.1. | Linealización del comportamiento de incorporación de fosfato de la población | 65 |
| 4.1.2. | Importancia biológica del comportamiento adaptativo | 71 |
| 4.2. | EL COMPORTAMIENTO DE INCORPORACIÓN DE FOSFATO DE COMUNIDADES FITOPLANCTÓNICAS EN LAGOS HIPEREUTRÓFICOS REFLEJA ALTERACIONES EN EL SUMINISTRO DE FOSFATO | 73 |
| 4.2.1. | Respuesta adaptativa del fitoplancton a un suministro fluctuante de fosfato | 73 |

| | | |
|------|--|----|
| 5. | CONCLUSIONES | 81 |
| 5.1. | Incorporación de fosfato por la cianobacteria <i>A. nidulans</i> | 82 |
| 5.2. | Incorporación de fosfato por comunidades de fitoplancton | 82 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA | 84 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Incorporación de fosfato y crecimiento de algas en un ambiente limitado por nutrientes*

El fosfato es generalmente el principal nutriente que limita el crecimiento algal en lagos (Schindler 1977). Cuando el crecimiento de estos organismos depende de un suministro limitado de este nutriente, los sistemas de incorporación se encuentran altamente activados y el fosfato disponible es rápidamente utilizado por el fitoplancton (Einsele 1941, Rigler 1956). La incorporación de este nutriente cesa cuando la energía disponible se torna insuficiente para mantener la absorción, una vez que el flujo unidireccional de fosfato se compensa por la pérdida desde el citoplasma hacia el medio, de forma que

la concentración de fosfato externo fluctuará alrededor de un nivel estacionario o valor umbral (Falkner et al. 1984a, Falkner et al. 1989). Es así que la incorporación y el crecimiento subsecuente son posibles sólo cuando la concentración de fosfato externo excede este valor umbral estacionario (Rigler 1956, Falkner et al. 1984b). En los períodos breves en los cuales la concentración externa se incrementa en forma de pulsos, el fosfato es incorporado rápidamente por las algas, convertido a ATP vía fotofosforilación (Simonis & Urbach 1973), y finalmente almacenado como gránulos de polifosfato que serán el recurso para el crecimiento subsecuente (Kuhl 1974, Kulaev & Vagabov 1983). En esta situación especial, la tasa de crecimiento se ajustará de acuerdo a la concentración de polifosfato almacenado (Rhee 1973).

Estudios recientes no han encontrado una relación simple entre la incorporación de fosfato y el crecimiento algal (Falkner et al. 1994, Wagner et al. 1999). En investigaciones previas con cultivos de laboratorio, fue demostrado que la cianobacteria *Anacystis nidulans* responde, a corto plazo, a los pulsos de fosfato mediante cambios en las propiedades cinéticas y energéticas de su sistema de incorporación (Falkner et al. 1989, Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995). Estas alteraciones cinéticas se manifiestan durante la transición desde el estado deficiente de no crecimiento neto, al inicio de la división celular y conllevan a una cascada de eventos de reorganización metabólica. Durante este proceso, Wagner et al. (1999) observaron una relación compleja entre la absorción de fosfato y la fijación fotosintética de CO₂, lo que potencialmente influirá en el crecimiento subsecuente. Estos eventos de reorganización involucran alteraciones en la composición de pigmentos del aparato de conversión de energía lumínica, evidenciados en las diferencias observadas entre los estados deficiente y suficiente por fosfato (Falkner et al. 1996).

Falkner et al. (1995) y Wagner et al. (1995) hipotizaron a partir de resultados obtenidos con la cianobacteria *A. nidulans*, que en ambientes naturales con un suministro de fosfato limitado y fluctuante, el sistema de incorporación de los organismos debería ser capaz de detectar cambios en la concentración externa y adaptarse a éstos para optimizar la eficiencia de la incorporación. Para poder estudiar estos cambios adaptativos es necesario seguir el transcurso de la remoción neta de fosfato hasta rangos bajos de concentración nanomolar. En cultivos de algas esto se logra a través del marcado de los organismos durante el crecimiento con [³²P] fosfato de la misma actividad específica que la usada en los experimentos de incorporación.

1.2. *Dificultades en la determinación de la incorporación neta de fosfato en comunidades naturales*

La incorporación neta de fosfato puede medirse espectrofotométricamente a través del método de molibdato. Sin embargo, el comportamiento de absorción no puede ser determinado en rangos de concentración cercanos al valor umbral de organismos deficientes por fosfato. Bajo condiciones de laboratorio, el valor umbral de los organismos limitados por fosfato se encuentra usualmente en el

rango de concentración nanomolar (Button et al 1973, Falkner et al. 1989, Olsen 1989, Olsen et al. 1989). Estos bajos rangos de concentración umbral se hallaron también en comunidades limitadas por fosfato (Rigler 1968, Pettersson 1979, Falkner & Falkner 1989, Istvánovics & Herodek 1995) y por lo tanto, debajo de los límites de detección de estos métodos de análisis químicos convencionales. Este problema analítico ha dificultado la medición de los valores umbrales de comunidades naturales bajo distintas condiciones ambientales, así como una apropiada caracterización del comportamiento de absorción en concentraciones externas cercanas al valor umbral. Por esta razón, existen escasas investigaciones acerca de la regulación de la incorporación de fosfato en lagos en general (Falkner et al. 1984b, Falkner & Falkner 1989, Istvánovics et al. 1994, Istvánovics & Herodek 1995), y sobre el valor umbral en particular, aunque la relevancia de este parámetro energético ya fue establecida por Rigler en 1956. Para eludir el problema analítico del método de molibdato, Rigler empleó fosfato radiactivo para marcar uniformemente el fitoplancton de todo un lago. Utilizando muestras de este ambiente, demostró que el mismo valor umbral fue rápidamente alcanzado luego de repetidas adiciones del trazador. En su estudio, el fosfato [^{32}P] usado en el experimento y el fosfato endógeno de la comunidad de fitoplancton tuvieron la misma actividad específica, requisito esencial para poder medir la incorporación neta.

El agregado directo de fosfato [^{32}P] a poblaciones de fitoplancton *no marcadas* para la determinación de las tasas netas de incorporación, es problemático por la siguiente razón: a concentraciones cercanas al valor umbral, el proceso de incorporación neta se superpone con las reacciones de intercambio isotópico concomitante, por medio del cual el fosfato [^{31}P] endógeno es reemplazado por el trazador, lo que aparenta un proceso adicional de incorporación (Lean & Nalewajko 1976).

En la actualidad, marcar un lago entero con [^{32}P] es impensable y difícilmente posible, por lo que se hace necesario evitar el problema del intercambio isotópico a través de otra estrategia experimental. Este problema puede ser solucionado con fitoplancton deficiente por fosfato, tomando ventaja de dos hechos: primero, las poblaciones deficientes por fosfato son capaces de almacenar grandes cantidades del nutriente en forma de polifosfatos ("*surplus phenomenon*" Liss & Langen 1962); segundo, bajo condiciones experimentales adecuadas, la aplicación de varios pulsos subsecuentes de fosfato radiactivo, no altera significativamente las propiedades del sistema de absorción de alta afinidad (Wagner et al. 1995, Falkner et al. 1995). En consecuencia, cuando se expone una población a varios pulsos sucesivos de fosfato [^{32}P], el trazador es tomado rápidamente y asimilado al *pool* de compuestos de polifosfato no radiactivo, antes de pasar a formar parte de los gránulos de polifosfato. Durante estos pulsos, los *pool*s de fosfato interno de intercambio rápido pueden ser marcados uniformemente con el trazador, lo que posibilita la medición de la incorporación neta.

1.3. *Bases teóricas para el análisis del comportamiento de incorporación de fosfato*

Varios modelos empíricos han sido propuestos para describir la incorporación de nutrientes y el crecimiento de microorganismos. El modelo irreversible de Michaelis-Menten relaciona la tasa de incorporación con la concentración externa de nutriente, la que será igual a cero cuando todo el sustrato sea convertido a producto. Por esta razón, el graficado de la tasa versus la concentración de sustrato pasará por el origen, de modo que las concentraciones umbrales no deberían existir (Falkner et al. 1995). 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. Combinaciones de las constantes cinéticas de estos modelos se han utilizado para caracterizar la incorporación de diferentes nutrientes y conocer distintas estrategias de crecimiento de microorganismos (ej.: Tilman 1982, Sommer 1989, Spijkerman 1998, Ducobu 1998a). Debido a la existencia del valor umbral, se han observado desviaciones de estos modelos empíricos, especialmente en rangos bajos de concentración presente en los medios de cultivo (Olsen 1989). Droop (1974) demostró previamente que el crecimiento algal no es una mera función de la tasa de incorporación sino que sería dependiente de la eficiencia con que el nutriente limitante es utilizado.

El modelo de flujo-fuerza elaborado por Falkner et al. (1989) fue desarrollado con la cianobacteria *Anacystis nidulans* y se basa en la observación de que el estado transitorio de absorción de fosfato, refleja en términos cinéticos y energéticos la conversión de fosfato externo en polifosfato (Healey 1982). Cuando el crecimiento de algas es limitado por el suministro de fosfato, un incremento de la concentración externa es seguido de una absorción intensa por los organismos, de modo tal que la cantidad de fosfato almacenado excede varias veces la concentración inicial. Por lo tanto, la biosíntesis de polifosfato a partir de ortofosfato es sólo posible si una fuente de energía es suministrada. La energía consumida para el proceso de absorción aumenta si la concentración de fosfato externo es baja, y la absorción cesa cuando la energía disponible es insuficiente para sustentar la incorporación. Este proceso de formación de polifosfato comprende tres etapas en presencia de luz:

- a) translocación del fosfato externo hacia el interior celular;
- b) la formación de ATP a partir de ADP y fosfato interno;
- c) la condensación del grupo terminal fosfato de ATP al los polifosfatos (Fig. 1)

La energía de entrada es suministrada en presencia de luz por la fotofosforilación (Simonis & Urbach 1973) y en consecuencia por el flujo de un cierto número (n_p) de protones de la membrana tilacoide al espacio citoplasmático, que es producido por el gradiente de pH a través de la membrana (Falkner et al. 1989).

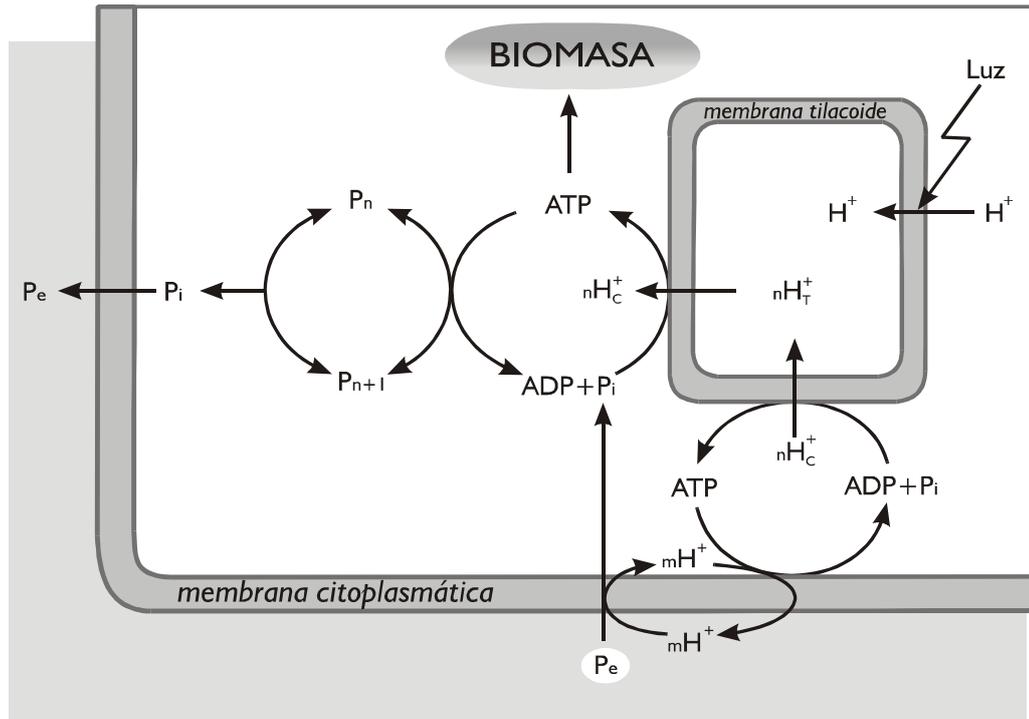
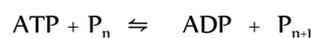


Fig. 1. Conversión de fosfato externo en polifosfatos en *A. nidulans* (fuente: G. Falkner & F. Wagner).

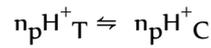
Si se asume que la interacción entre el fosfato externo y el polifosfato interno es determinada por las reacciones consecutivas arriba descritas, puede ser postulada una proporcionalidad entre la concentración de fosfato externo y las actividades citoplasmáticas involucradas en la formación de polifosfato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



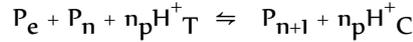
donde P_e y P_c son el fosfato externo y el citoplasmático, y P_n y P_{n+1} son los polifosfatos. La suma de estas reacciones se corresponde con el proceso general de incorporación del fosfato externo hacia el *pool* de polifosfato citoplasmático



y su constante de equilibrio será entonces 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 $-\Delta G = RT \ln(KS/P)$ 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 $2.3 RT \log([P_e]K')$ es aquella que debe ser consumida para convertir fosfato externo en polifosfatos. $2.3 RT n_p \Delta pH_T$ es la fuerza conductora de la reacción, donde ΔpH_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 $[P_e]_A$. En la concentración umbral, la energía consumida para la formación de polifosfato y la fuerza conductora 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 ΔpH_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. Este seguirá la función de Falkner et al. (1989):

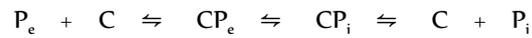
$$J_p = L_p (\log(K' [P_e]) + n_p \Delta pH_T) \quad (2)$$

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 mas 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 , 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 $d[CP]/dt = 0$, 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, que permite la acumulación de fosfato en contra de un gradiente de concentración, 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 fotofosforilación 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 fuera 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 de $[P_e]_A=0$ esta función resulta en la ecuación de Michaelis-Menten.

La figura 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 $[P_e] < K_e$, 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 .

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).

* En la presente tesis nos referiremos a *adaptación* como: "Changes in the form or behaviour of an organism during its life as a response to environmental stimuli" (Begon et al. 1990).

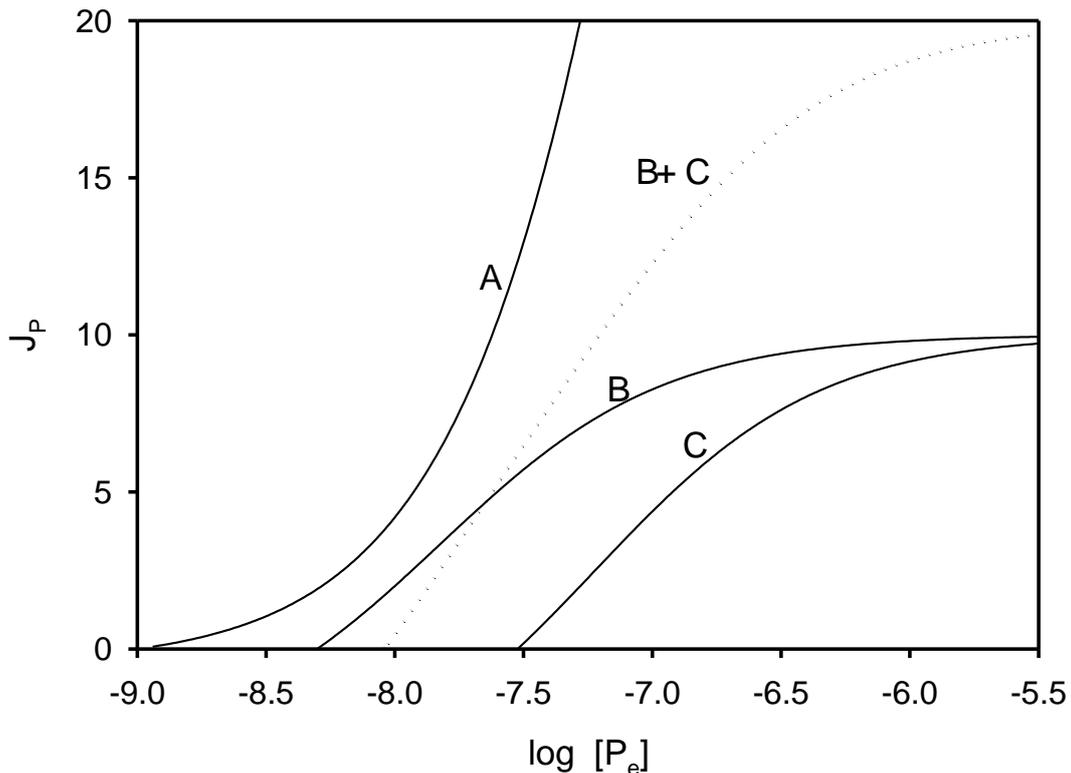


Fig. 2. Modelos de sistemas de incorporación de fosfato de *Anacystis nidulans*. Gráfica Thellier de las tasas de incorporación en función del logaritmo de la concentración externa de fosfato. Los cálculos fueron realizados con la ecuación (6) utilizando los siguientes valores: A: $[P_e]_A = 1$ nM, $V_e = 100$, $K_e = 200$ 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).

1.4. Alcances de la presente investigación

En la presente tesis se investigaron las alteraciones a corto plazo de las propiedades cinéticas y energéticas del sistema de incorporación de fosfato de alta afinidad de la cianobacteria *A. nidulans*, bajo condiciones de una concentración externa fluctuante del nutriente. Se estudiaron las características del comportamiento de incorporación durante la transición entre el estado de limitación del crecimiento y la fase correspondiente al inicio de la proliferación celular. Se realizaron experimentos preliminares donde se investigó la relación compleja entre los cambios adaptativos y la reorganización del metabolismo celular, a través de alteraciones en el sistema de recolección de energía lumínica durante el crecimiento.

Utilizando las propiedades del sistema de incorporación de alta afinidad, fue posible obtener información acerca del procesamiento de fosfato y el estado nutricional de comunidades fitoplanctónicas en ecosistemas acuáticos, a pesar de que la concentración externa fuese considerablemente baja para ser determinada adecuadamente por métodos analíticos convencionales. Mediante el método de premarcado, se siguió la incorporación neta de diferentes poblaciones naturales

durante cambios en el suministro externo de fosfato en lagos hipereutróficos. Los resultados fueron analizados usando una relación flujo-fuerza originalmente propuesta por Thellier (1970) y posteriormente elaborada por Falkner et al. (1989) para interpretar el comportamiento adaptativo complejo de incorporación de fosfato en cianobacterias y algas eucariotas (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995). Este modelo también fue aplicado para la caracterización del estado nutricional en lagos (Falkner & Falkner 1989, Istvánovics et al. 1994, Istvánovics & Herodek 1995). En la presente tesis se muestra cómo esta relación puede ser aplicada para analizar el comportamiento de incorporación neta por comunidades de fitoplancton, durante adaptaciones a largo plazo asociadas a cambios en la aporte alóctono de fosfato en lagos hipertróficos.

Se realizaron investigaciones preliminares sobre el comportamiento adaptativo de incorporación a corto plazo de comunidades naturales bajo condiciones de un suministro fluctuante de fosfato. Para este estudio se utilizó una aproximación experimental alternativa, mediante la resuspensión de la comunidad de fitoplancton en un medio de composición conocida. De esta forma fue posible obtener información preliminar acerca de la capacidad adaptativa de una comunidad fitoplanctónica deficiente por fosfato, frente a modificaciones inmediatas en el suministro del nutriente.

1.4.1. Objetivos

1.4.1.1. Objetivo general

Estudiar la influencia de las fluctuaciones de fosfato externo en la regulación de la absorción de este nutriente por algas en cultivos y fitoplancton de lagos hipereutróficos.

1.4.1.2. Objetivos específicos

- ▶ Investigar el comportamiento de incorporación de fosfato por la cianobacteria *Anacystis nidulans* en condiciones de limitación del crecimiento por este nutriente.
- ▶ Evaluar qué factores determinan las adaptaciones cinéticas y energéticas del sistema de incorporación de *A. nidulans*.
- ▶ Determinar las características del comportamiento de incorporación de fosfato, una vez alcanzado el modo lineal de incorporación o estado adaptado a las fluctuaciones de fosfato externo.
- ▶ Determinar las características del comportamiento de incorporación durante la fase inicial del crecimiento algal.
- ▶ Conocer si ocurren modificaciones en la composición de pigmentos fotosintéticos durante la fase de crecimiento.
- ▶ Caracterizar el comportamiento de absorción de fosfato por comunidades naturales en lagos deficientes por este nutriente.

- ▶ Evaluar la metodología del premarcado con [^{32}P] fosfato para la medición de la incorporación neta por comunidades de fitoplancton.
- ▶ Evaluar si el modelo de flujo-fuerza de Falkner et al. (1989) se ajusta al comportamiento de incorporación neta de fosfato de comunidades fitoplanctónicas naturales.
- ▶ Evaluar con dicho modelo la deficiencia por fosfato de las comunidades fitoplanctónicas a largo plazo.
- ▶ Utilizando el modelo de flujo-fuerza y el gráfico Thellier, conocer si las poblaciones naturales de algas estuvieron sujetas a fluctuaciones previas en las concentraciones de fosfato en el ambiente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CULTIVO DE LA CIANOBACTERIA *ANACYSTIS NIDULANS*

2.1.1. *Condiciones de crecimiento*

Anacystis nidulans [*Synechococcus leopoliensis* (Raciborski) Komarek; cepa 1402-1; Colección de Cultivos de Algas Göttingen, Alemania] es una cianobacteria no colonial de 1-2 μm de diámetro, presenta reproducción asexual por gemación, así como una cinética de alta afinidad por la absorción de nutrientes y alta eficiencia fotosintética (Gibson & Smith 1982). Esta cianobacteria se cultivó en el medio D de Kratz & Myers (1955) modificado por la adición de 5 mM NaHCO_3 y 1.24 μM Fe-EDTA (tabla 1). La suspensión de células se burbujeó con aire filtrado a través de membranas de 0.2 μm de diámetro de poro y con un contenido de 5 % de CO_2 . La cianobacteria fue cultivada a una temperatura de 37 °C y a una densidad de flujo fotónico de 125 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3).

Tabla 1. Descripción del medio de cultivo D de Kratz & Myers (1955).

| Compuesto | mg l ⁻¹ |
|---|--------------------|
| NaNO_3 | 600 |
| KNO_3 | 40.4 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 30.0 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 14.4 |
| EDTA | 16.0 |

2.1.2. Condiciones de deficiencia por fosfato y cultivo semicontinuo

La deficiencia por fosfato se obtuvo mediante la restricción del contenido de fósforo total en el medio de cultivo a 2.5 μM K_2HPO_4 . Luego de tres días se cultivaron 200 ml de suspensión de algas en modo discontinuo que fueron posteriormente diluidas cada 24 horas. Cien ml de cultivo se reemplazó por 100 ml de medio fresco conteniendo 2.5 μM K_2HPO_4 . Los experimentos de incorporación se realizaron al día siguiente de realizada la dilución.

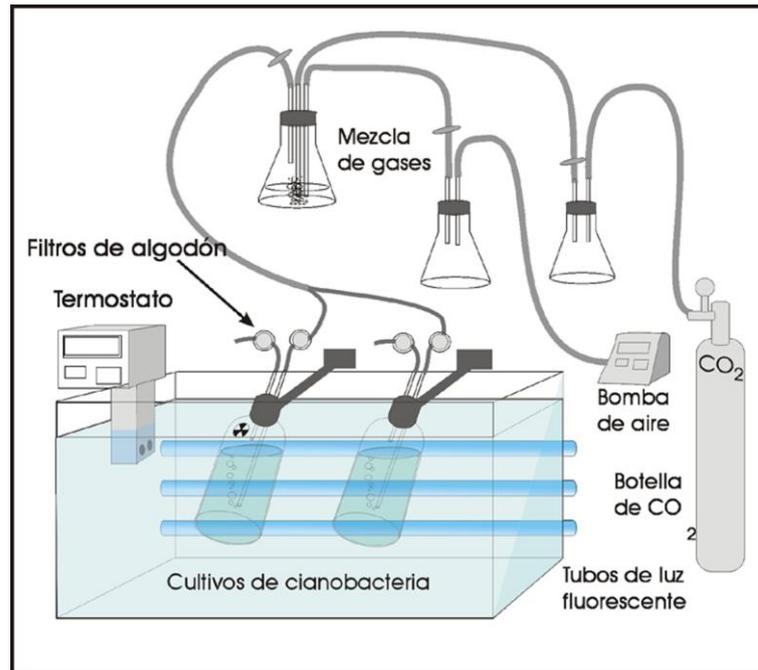


Fig. 3. Diagrama del sistema semicontinuo de cultivo de *Anacystis nidulans*.

2.2. ESTUDIOS DE CAMPO

2.2.1. Área de estudio

Las investigaciones sobre la incorporación de fosfato por comunidades naturales fueron realizadas entre diciembre de 1997 y julio de 1998, con muestras obtenidas de 2 lagos situados en la ciudad de Montevideo, Uruguay: Lago Canteras y Lago Rodó.

El Lago Canteras es un ambiente hipereutrófico y somero, con una profundidad media de 1 m y una máxima de 1.5 m. El principal suministro de agua durante el período de estudio fue pluvial (Fig. 4).

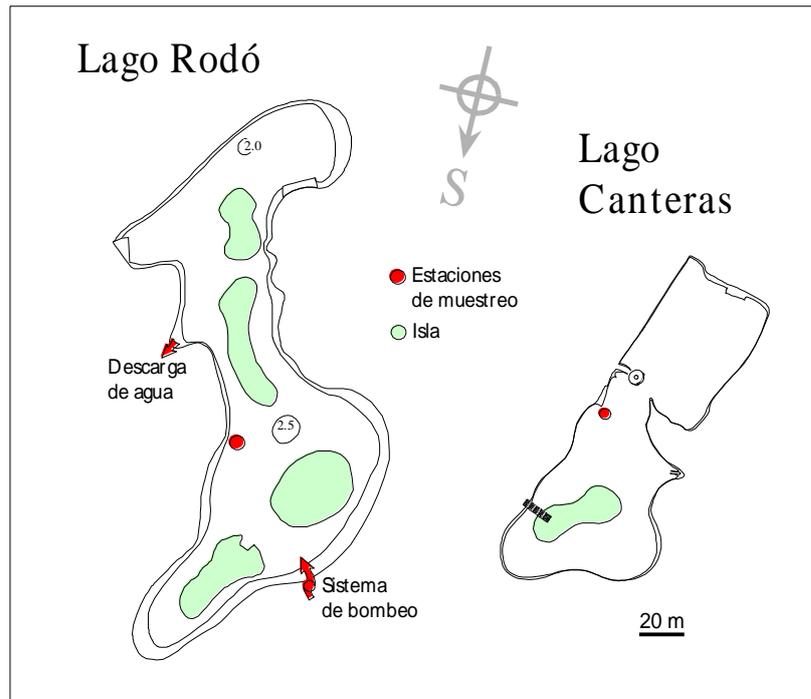


Fig. 4. Esquema del Lago Rodó y Lago Canteras, mostrando la ubicación de las estaciones de muestreo. En el Lago Rodó se indica la ubicación del sistema de bombeo de agua subterránea. Mapa del L. Rodó tomado del proyecto: "Mantenimiento de una fase de agua clara en el Lago Rodó" Facultad de Ciencias - I.M.M.

El Lago Rodó es también hipereutrófico y somero, con una profundidad media de 1.5 m (máx. 2 m, área: 1.3 ha; Fig. 4). El principal aporte de agua al lago durante el período de estudio fue a través de un sistema artificial de bombeo de agua subterránea, el cual funcionó hasta enero de 1998. Posteriormente el sistema de bombeo fue reanudado y detenido periódicamente como se indica en la figura 17.

El fósforo total en el agua aportada a través del sistema de bombeo fue de $3.54 \text{ g P día}^{-1}$. La fracción de fósforo total disuelto en el agua subterránea fue ca. 90%, mientras que la fracción de ortofosfato representó el 50% del contenido de fósforo total aportado. Fueron determinados a su vez valores extremos para el nitrógeno total en el agua vertida, verificándose un suministro al lago de 710 g N día^{-1} , principalmente en forma disuelta (90%). El cociente medio entre el nitrógeno total disuelto y el fósforo total disuelto fue extremadamente alto, correspondiendo a 450. Existen otras entradas difusas de nutrientes al lago aportados por las napas freáticas y la descomposición hojas de los árboles caducos (N. Mazzeo com. pers.). Los valores altos de nutrientes en el agua subterránea resultaron en grandes cantidades de biomasa fitoplanctónica en el lago (datos tomados de: Scasso et al. (en prensa)).

2.2.2. Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras de fitoplancton fueron obtenidas con una botella oscura, a una profundidad entre 10 y 30 cm. Durante el transporte de las muestras al laboratorio (ca. 30 min) éstas se protegieron de cambios

bruscos de temperatura y luz. Para la determinación de nutrientes totales y disueltos, submuestras de 100 ml se filtraron a través de filtros Whatman GF/F (47 mm diámetro). La submuestra filtrada se almacenó inmediatamente a 4 °C para su posterior análisis, mientras que 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*.

2.2.3. 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 temperatura se midió con termocupla o alternativamente con un termómetro de mercurio (0.1 °C). El oxígeno disuelto y la conductividad se midieron con sensores Horiba[®] OM-14 y Horiba[®] ES-12 respectivamente. La radiación fotosintéticamente activa (photosynthetically active radiation, PAR) se midió con un sensor 2TLicor[®] LI-250.

2.3. DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN NETA DE FOSFATO

2.3.1. Experimentos de laboratorio con cultivos de *A. nidulans*

2.3.1.1. Procedimiento de premarcado durante el crecimiento

Para evitar los efectos del intercambio isotópico en los experimentos, las algas fueron marcadas con [³²P]fosfato (NEN[™], USA) cada 24 h, cuando 100 ml de cultivo se reemplazaron por 100 ml de medio fresco conteniendo 2.5 μM K₂H³²PO₄. Bajo condiciones de deficiencia por fosfato, el nuevo [³²P]fosfato fue absorbido por las algas en menos de 30 minutos, y la concentración externa disminuyó a niveles nanomolares. El fosfato almacenado por las células es suficiente para una división, que en general comienza luego de 6-7 h desde la adición del fosfato marcado (Falkner et al. 1995). Los experimentos de absorción fueron realizados el día siguiente. Un cultivo no marcado fue mantenido en paralelo bajo condiciones idénticas para la determinación de clorofila *a* y número de células.

La actividad específica de la solución stock de 100 μM [³²P]fosfato fue utilizada para el cálculo de la concentración del fosfato externo al respectivo intervalo de tiempo.

2.3.1.2. Medición de la incorporación neta de fosfato

La intensidad de la luz y la temperatura fueron las mismas que las utilizadas durante el cultivo. El medio Kratz & Myers (1955) que se usó en los experimentos fue preparado sin elementos traza y Fe-EDTA, debido a la corta duración de los mismos. El medio fue tamponado con 5 mM Hepes-KOH a pH 8.1. Previo a los experimentos, una muestra del cultivo se centrifugó (Hettich, Alemania) a 4000 r.p.m. por 5 min, para remover posibles compuestos complejos de fósforo. Luego del centrifugado las células fueron resuspendidas en el medio anteriormente descrito. La reacción se inició por la adición de una

concentración apropiada de [^{32}P]fosfato, y fue detenida mediante la filtración de una submuestra de 0.8 - 1.5 ml a través de una membrana de polycarbonato (Nucleopore, 0.6 μm de diámetro de poro) colocado sobre un filtro de microfibras de vidrio GF/F Whatman. La radioactividad de la alícuota del volumen filtrado se midió en un analizador de centelleo líquido Packard (Packard Instruments, Meriden, USA).

2.3.2. *Estudios de incorporación de fosfato con comunidades naturales de fitoplancton*

2.3.2.1. Procedimiento de premarcado

Las muestras fueron filtradas a través de una red de 50 μm de malla para remover el zooplancton de gran tamaño, no observándose la retención de fitoplancton por este procedimiento. Posteriormente, las muestras fueron iluminadas (200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Licor[®] LI-250) y agitadas suavemente con un agitador magnético, 30 min antes de iniciar la premarcación y durante los experimentos de incorporación. Las muestras fueron mantenidas a temperatura (19 - 26 $^{\circ}\text{C}$) e intensidad de luz similar a las condiciones del sitio de muestreo.

El premarcado fue realizado mediante la exposición de la comunidad de fitoplancton a varios pulsos subsecuentes de 50 a 100 nM fosfato [^{32}P]. Durante los pulsos de premarcado, varias alícuotas fueron tomadas y analizadas para monitorear la remoción del trazador por el fitoplancton. La evaluación de las velocidades iniciales del flujo hacia el interior celular confirmó que estos pulsos no resultaron en una desactivación de la capacidad de incorporación de la comunidad, cuando fuera aplicado a una biomasa de fitoplancton conteniendo aproximadamente 2.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de fósforo particulado. En las altas concentraciones externas presentes inmediatamente después de la adición de pulsos de fosfato, la tasa del flujo de [^{32}P] hacia el interior celular es varios órdenes de magnitud mayor que la tasa de reflujos del fosfato endógeno. Por lo tanto, las velocidades iniciales observadas representaron prácticamente incorporación neta y pudieron ser comparadas, descartándose los efectos del intercambio isotópico.

Estos pulsos fueron generalmente suficientes para marcar uniformemente el *pool* de fosfato de intercambio rápido de los organismos, indicado por el hecho de que el umbral aparente obtenido luego de los pulsos sucesivos permaneció constante.

2.3.2.2. Medición de la incorporación neta de fosfato

Usando el tratamiento anteriormente descrito, fue posible caracterizar el comportamiento neto de incorporación. La reacción de incorporación se inició por la adición de una concentración arbitraria de fosfato [^{32}P]. Posteriormente se tomaron alícuotas de 0.8 - 1.5 ml, a intervalos de tiempo indicados por las figuras, y fueron filtradas a través de un filtro Millipore HA (0.45 μm de diámetro de poro) dispuesto sobre un filtro de microfibras de vidrio Whatman GF/F. La radiactividad del filtrado fue determinada en agua vía Cerenkov, usando un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000, USA).

2.4. DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

2.4.1. *Análisis químico de muestras de agua*

El análisis químico de las muestras de agua se realizó con un espectrofotómetro Beckman DU6, USA. El ortofosfato fue determinado según Strickland & Parsons (1972), utilizándose un trayecto óptico de 5 cm para aumentar el límite de detección a $10 \mu\text{g l}^{-1}$. La concentración de fósforo y nitrógeno total, así como su forma total disuelta, fueron determinadas de acuerdo a Valderrama (1981).

La separación del fósforo inorgánico del orgánico en los cultivos se realizó de acuerdo con Nielsen & Lehninger (1955). Se tomaron 1.6 ml de reactivo conteniendo 0.011 M de molibdato de amonio y 0.7 M de H_2SO_4 fue adicionado a 0.4 ml de muestra. Luego de 3 minutos, fueron agregados 7 ml de una mezcla de isobutanol y benceno (1:1). La muestra se agitó vigorosamente durante 20 segundos y el complejo molibdato-ortofosfato fue removido en la fase orgánica. Esta extracción se repitió tres veces.

2.4.2. *Determinación de clorofila a*

La medición de clorofila *a* (Clo *a*) en los cultivos de la cianobacteria se realizó mediante la centrifugación de una submuestra durante 10 minutos a 4000 r.p.m. Posteriormente se realizó la extracción de clorofila *a* durante 15 h a 4 °C en condiciones de oscuridad con acetona al 80% (MacKinney 1941).

Para la determinación de Clo *a* de comunidades fitoplanctónicas, se tomaron tres alícuotas de cada muestra de los lagos, que fueron filtradas a través de un filtro de microfibras de vidrio GF/F Whatman. La clorofila *a* fue extraída con etanol caliente y medida de acuerdo con Nusch (1980).

2.4.3. *Espectro de absorbancia celular*

Para la medición del espectro de absorbancia *in vivo* de los pigmentos, las muestras fueron concentradas cinco veces por centrifugación durante 10 minutos a 4000 r.p.m. Posteriormente se realizó un registro del espectro de absorbancia entre 800 y 400 nm, utilizándose como referencia una muestra de la misma cianobacteria previamente despigmentada. En los espectros realizados durante el crecimiento, el número de células fue cercano a 1.3×10^8 células ml^{-1} . La despigmentación fue realizada

con un shock de metales pesados y posterior enfriamiento a 4 °C en condiciones de oscuridad, durante una semana. La ausencia completa de pigmentos fue chequeada con espectrofotómetro.

2.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ORGANISMOS

2.5.1. *Determinación de la concentración celular en cultivos*

Se tomaron muestras previo y durante la fase de crecimiento a los intervalos de tiempo especificados por las figuras. La densidad celular se midió con un contador de partículas Coulter Counter Multisizer[®] II equipado con un capilar de 10 µm de diámetro. Los conteos se realizaron con 1 ml de cultivo de la cianobacteria disuelto en 10 ml de una solución isotónica. Los análisis se hicieron por duplicado y con una eficiencia de conteo de aproximadamente 300 células s⁻¹.

2.5.2. *Análisis cualitativo y cuantitativo de fitoplancton*

La determinación de los principales taxa se realizó con microscopio óptico Olympus y bibliografía especializada. Las muestras de fitoplancton fueron fijadas con una solución de lugol ácido para el análisis cuantitativo. El conteo fue realizado usando cámaras Sedwick-Rafter de 1 ml mediante la selección de campos aleatorios de acuerdo con Guillard (1978). El biovolumen de cada taxa se calculó en base a figuras geométricas aproximadas, como fuera descrito en Rott (1981). La biomasa fitoplanctónica se estimó multiplicando el biovolumen por el número de organismos cuantificados para los principales géneros.

2.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS

La dependencia de la incorporación neta en el tiempo fue evaluada usando el programa de computación MLAB (Mathematical Modelling System, Civilized Software, Inc.). El regráficoado de los datos fue realizado de acuerdo con Thellier (1970). La tasa de incorporación fue calculada (correspondiendo a las pendientes de los ajustes computados en función del tiempo) a los intervalos de tiempo donde la medición de incorporación fuera realizada. Estas tasas fueron regráficasadas en función del logaritmo de la concentración externa de fosfato, medido experimentalmente a los intervalos de tiempo respectivos. Los coeficientes de conductividad L_p y los valores umbrales $[P_e]_A$ de los transcurros de tiempo ajustados, se muestran en las leyendas de las figuras. En los regráficosados semilogarítmicos la tasa de incorporación

fue expresada en relación al tiempo (horas) y al contenido de clorofila *a* de la comunidad de fitoplancton.

La confianza del método, aplicado a comunidades naturales, fue confirmada usando dos muestras independientes que fueron premarcadas separadamente, originadas de la misma comunidad de fitoplancton, siguiendo el transcurso de la remoción de fosfato en ambas muestras. Cuando los datos de ambos transcurros de tiempo se incluyeron en la misma gráfica, se computó el mejor ajuste de esos datos y el valor del coeficiente de determinación ($r^2 > 0.993$, $n = 16$) fue el mismo que el obtenido de los transcurros de remoción individuales de las muestras independientes.

3. RESULTADOS

3.1. COMPORTAMIENTO DE INCORPORACIÓN DE FOSFATO EN *ANACYSTIS NIDULANS* BAJO CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEFICIENTE POR FOSFATO

3.1.1. *Transcurso de la incorporación de fosfato a través del seguimiento de la remoción de este nutriente del medio externo*

Se investigó el comportamiento de incorporación neta de fosfato de *A. nidulans* deficiente por el nutriente, en rangos bajos de concentración externa. Se utilizaron concentraciones iniciales que permitieran obtener una remoción rápida de fosfato externo y a su vez medir el transcurso con precisión para su posterior análisis. Las curvas de remoción de fosfato que se muestran en la figura 5 se obtuvieron con algas que fueron previamente marcadas con [³²P] fosfato durante el crecimiento. Cuando una concentración externa de fosfato de 80 nM fue agregada a la suspensión de células, éstas incorporaron rápidamente el nutriente y luego de 10 minutos la concentración externa fue reducida aproximadamente a 1 nM fosfato, permaneciendo constante a ese nivel. Se agregaron dos pulsos adicionales de 50 nM fosfato a la población y el proceso de incorporación se repitió con las mismas características, resultando esencialmente en el mismo valor umbral.

La dependencia de la disminución de fosfato en el tiempo se ajustó a la función de cinética de primer orden para la remoción del sustrato, dentro del rango de concentración testado (< 100 nM fosfato), y por lo tanto obedeció la relación:

$$d[P_e]/dt = -k([P_e] - [P_e]_{\lambda})$$

donde k representa la constante de velocidad, $[P_e]$ denota la concentración de fosfato y $[P_e]_{\lambda}$ el valor umbral. Las curvas representan el mejor ajuste computado usando dicha función.

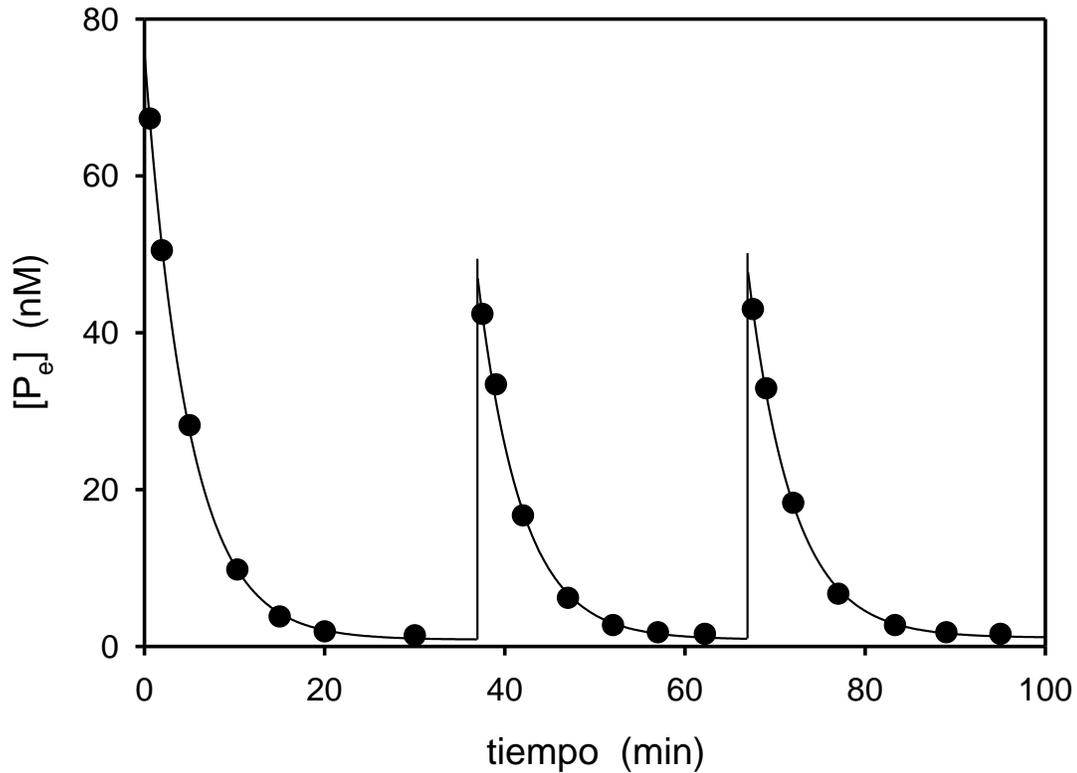


Fig. 5. Transcurso de la incorporación neta de fosfato por *Anacystis nidulans*. La población fue expuesta a pulsos subsiguientes de fosfato aplicados en el tiempo cero (80 nM de concentración inicial), 37 min (50 nM) y 67 min (50 nM). Los círculos negros representan la concentración externa determinada experimentalmente. El contenido de Clo *a* en el experimento fue 4 $\mu\text{g l}^{-1}$. Las curvas representan el mejor ajuste computado usando la función de cinética de primer orden, con los siguientes parámetros cinéticos correspondientes al primer pulso: $k = 0.21 \text{ min}^{-1}$, $[P_e]_A = 0.85 \text{ nM}$ fosfato; segundo pulso: $k = 0.21 \text{ min}^{-1}$, $[P_e]_A = 0.87 \text{ nM}$ fosfato; tercer pulso: $k = 0.20 \text{ min}^{-1}$, $[P_e]_A = 1.1 \text{ nM}$ fosfato.

La cantidad de fosfato incorporado por las algas correspondió a 3.6 veces el contenido inicial presente en las células. Este valor se encuentra por debajo de la capacidad máxima de almacenamiento, siendo que *Anacystis nidulans* en un estado deficiente por fosfato puede almacenar 20 a 30 veces su concentración de fosfato intracelular (G. Falkner y F. Wagner, com. pers.).

El transcurso de la remoción de fosfato externo, así como las concentraciones umbrales medidas directamente, fueron aproximadamente iguales en los tres casos (Fig. 5). Bajo estas condiciones experimentales, donde se agregaron pulsos de baja concentración, el valor umbral alcanzado por la población fue independiente de la concentración inicial de fosfato y del tamaño del *pool* de polifosfato intracelular.

3.1.2. *Alteraciones cinéticas y energéticas del sistema de incorporación*

Para estudiar la respuesta del sistema de incorporación a incrementos en la concentración externa de fosfato, se expuso una población deficiente por fosfato a elevadas concentraciones externas sobre el valor umbral, suficientes para el desarrollo de varias generaciones subsecuentes. Una población algal premarcada, conteniendo $20 \mu\text{g ClO a l}^{-1}$, fue expuesta a $2.5 \mu\text{M}$, concentración fácilmente detectable por métodos espectrofotométricos. Luego de 3 h de agregado el pulso, la incorporación de fosfato cesó a un valor de equilibrio cercano a 6.0 nM y como consecuencia, la población experimentó un incremento en el contenido celular de fosfato correspondiente a diez veces su concentración inicial. La figura 6 (círculos blancos) muestra un experimento de incorporación de fosfato luego de 30 minutos de haberse alcanzado dicho valor umbral. Paralelamente se realizó un experimento control (Fig. 6, círculos negros) con algas que no fueron expuestas a altas concentraciones de fosfato, provenientes del mismo cultivo original. Se observó una clara diferencia entre los comportamientos de absorción de las poblaciones y los valores umbrales alcanzados en ambos casos. La cinética de remoción de fosfato de la población control se caracterizó por una alta tasa y valores umbrales extremadamente bajos ($\approx 1 \text{ nM}$ fosfato). Por el contrario, la suspensión de algas que experimentó altas concentraciones de fosfato, mostró un comportamiento de absorción marcadamente distinto, presentando una mayor concentración umbral ($7.5 \pm 0.2 \text{ nM}$ fosfato). El modelo de flujo-fuerza de Falkner et al. (1989) fue empleado para analizar esta adaptación de las algas a un suministro fluctuante de fosfato. Únicamente la curva de remoción de fosfato posterior a la preincubación (Fig. 6, círculos blancos) pudo ser ajustada a la función semilogarítmica (Eq. 3). La Eq. 3 no fue válida para la curva de remoción perteneciente a la población no preincubada en el rango de concentración ensayado, mientras que el mejor ajuste obtenido para estos datos se logró con la función de cinética de primer orden.

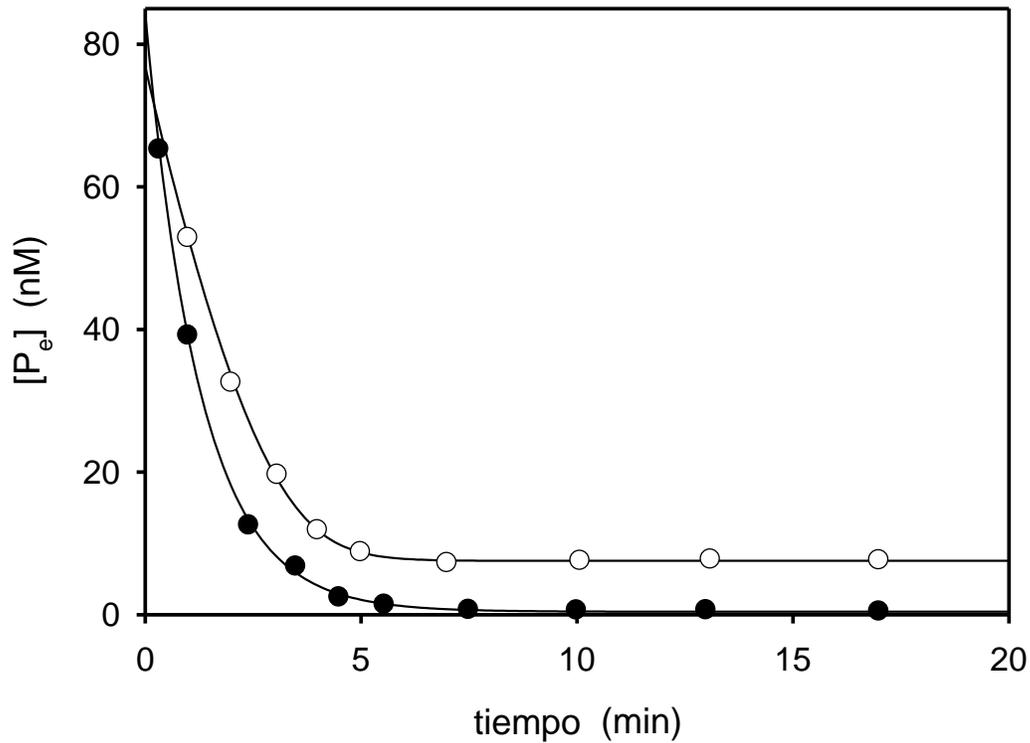


Fig. 6. Transcurso de la remoción de fosfato luego de un pulso de $2.5 \mu\text{M}$ a una suspensión de células conteniendo $20 \mu\text{g Clo}_2 \text{ l}^{-1}$. La concentración umbral fue alcanzada luego de 3 h. Se realizó un experimento con la población preincubada luego de otros 30 min (círculos blancos). Círculos negros: suspensión celular control, sin preincubar. Las curvas representan el mejor ajuste computado usando la función de cinética de primer orden para la población control, con los siguientes parámetros cinéticos: $k = 0.78 \text{ min}^{-1}$; $[P_e]_A = 0.4 \text{ nM}$ fosfato; y la Eq. 3 para la población preincubada: $L_p = 11.3 \text{ nM min}^{-1}$; $[P_e]_A = 7.5 \text{ nM}$ fosfato.

El experimento de preincubación con fosfato afectó la dependencia de la tasa de incorporación en la concentración de una forma característica. Este fenómeno de adaptación cinética y energética pudo ser evaluado cuando las curvas de remoción de fosfato externo en función del tiempo, anterior y posterior a la preincubación, fueron analizadas con la gráfica semilogarítmica Thellier (Thellier 1970; Fig. 7). Se graficaron las tasas de incorporación correspondientes a las distintas concentraciones externas calculadas por el modelo, en función del logaritmo de las concentraciones externas medidas en los experimentos de remoción de la figura 6.

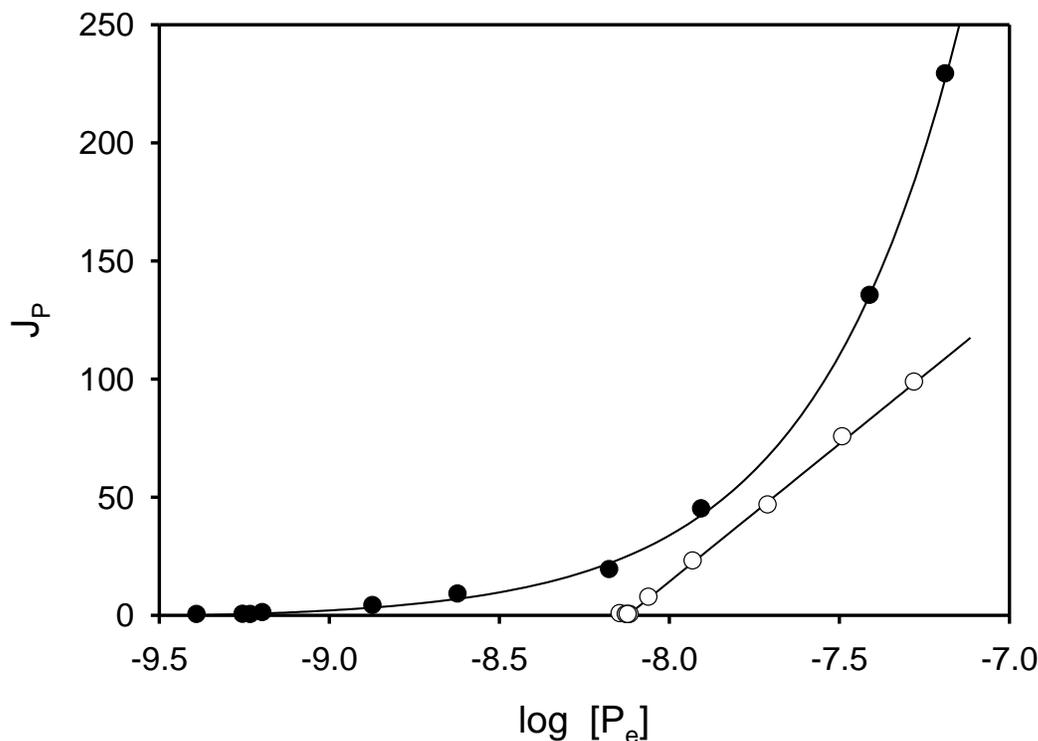


Fig. 7. Gráfico Thellier de la dependencia de la tasa de incorporación de fosfato en la concentración externa, obtenido de los transcurros de tiempo de la Fig. 6. Círculos negros: suspensión celular control; círculos blancos: población preincubada. El flujo neto (J_p) está dado en $\mu\text{mol Pi (mg Clo } a \text{ h)}^{-1}$. El logaritmo de la concentración externa de fosfato $[P_e]$ es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

Este procedimiento reveló que el transcurso de la remoción de fosfato por la población no adaptada siguió una función curvilínea ascendente, mientras que el proceso de incorporación por la población preincubada, obedeció una relación lineal desde el valor inicial cercano a 80 nM hasta su valor umbral de aproximadamente 7 nM. De tal modo, la línea recta resultante interceptó el eje $\log[P_e]$ en el valor umbral logarítmico $[P_e]_{A'}$, el que a su vez coincidió con el valor determinado en el experimento.

Para investigar el comportamiento de incorporación luego de alcanzado el nuevo estado adaptado, se realizó un tipo de experimento similar al de la figura 6. Una población de igual densidad ($20 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$) fue preincubada con la misma concentración de fosfato ($2.5 \mu\text{M}$). En el experimento que se muestra en la figura 8 fueron agregados pulsos de 60 y 120 nM fosfato, luego de 40 y 80 min de alcanzado el valor umbral correspondiente a la preincubación, respectivamente. Es posible ver que el transcurso de la remoción de fosfato de la población preincubada fue marcadamente diferente entre ambos pulsos (Fig. 8), y que a su vez se diferenció de la población control no adaptada. Consecuentemente, el estado fisiológico alcanzado luego de la transición persistió por más de 100 min, una vez que el comportamiento lineal de incorporación fuera

alcanzado, y a su vez fue altamente adaptable a las nuevas fluctuaciones dentro de rangos bajos de concentración.

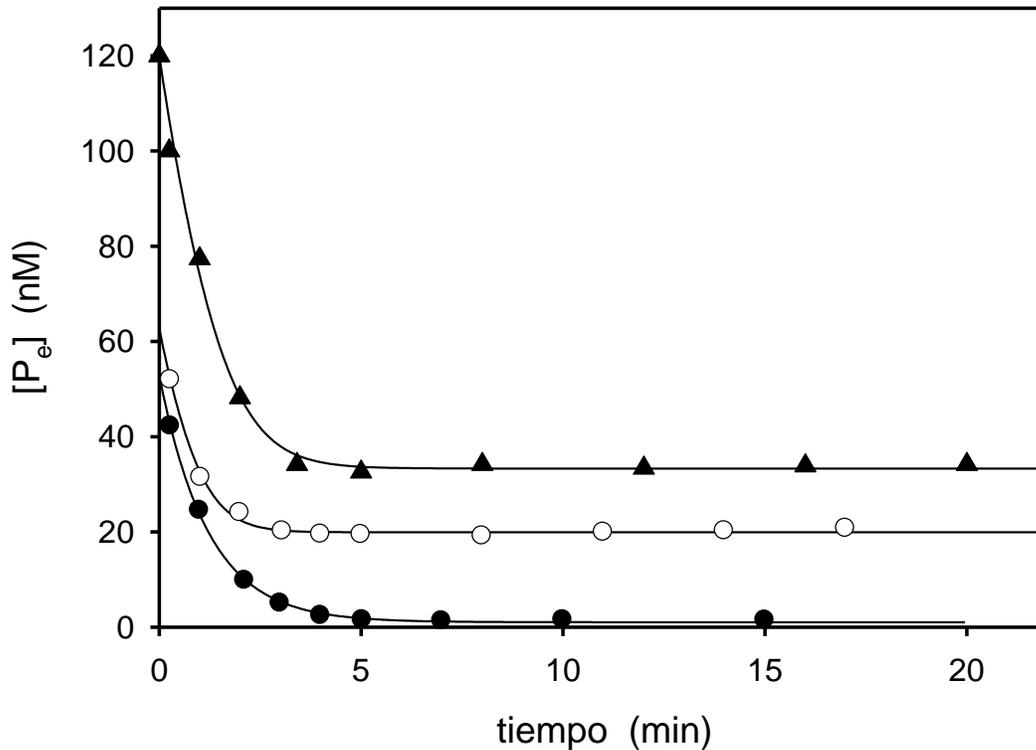


Fig. 8. Efecto de la preincubación en *A. nidulans*, realizada a través de la dilución en 10 veces el cultivo original de crecimiento, para alcanzar una concentración final de $20 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$, y posteriormente expuesta a $2.5 \mu\text{M}$ fosfato. El valor umbral fue alcanzado en tres horas y el experimento fue realizado 40 min después, con la suspensión de algas preincubadas. Círculos negros: población no preincubada (control); círculos blancos: adición de 50 nM fosfato (luego de 40 min); triángulos: adición de 120 nM fosfato luego de 80 min a otra suspensión celular proveniente de la misma población preincubada. Las curvas representan los mejores ajustes computados usando cinética de primer orden para la población control (círculos negros: $k = 0.83 \text{ min}^{-1}$, $[\text{P}_e]_A = 1.0 \text{ nM}$ fosfato) y la Eq. 3 para las población preincubada (círculos blancos: $L_p = 36.8 \text{ nM min}^{-1}$, $[\text{P}_e]_A = 19.9 \text{ nM}$ fosfato; triángulos: $L_p = 37.8 \text{ nM min}^{-1}$, $[\text{P}_e]_A = 32.9 \text{ nM}$ fosfato).

Para investigar si las alteraciones del sistema de incorporación de fosfato fueron ocasionadas por una regulación simple a través de la formación de producto (polifosfatos), se utilizaron dos suspensiones de algas provenientes del mismo cultivo original premarcado, pero con diferente densidad celular. Las suspensiones fueron diluidas hasta obtener una suspensión A, conteniendo una concentración de *Clo a* equivalente a cinco veces el valor de la segunda suspensión B ($4 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$). Ambas poblaciones fueron expuestas a la misma concentración de fosfato en relación a su contenido de clorofila (Fig. 9). La suspensión de algas más densa tuvo una alta tasa de incorporación de fosfato alcanzando una concentración umbral muy baja cercana a 1 nM . El mejor ajuste de los datos fue obtenido con la función de cinética de primer

orden (Fig. 9; curva A), mostrando un comportamiento típico del estado estable no adaptado. Por el contrario, el comportamiento de absorción de la suspensión mas diluida mostró una actividad menor, con un nivel umbral de 27 nM fosfato y una cinética de incorporación diferente.

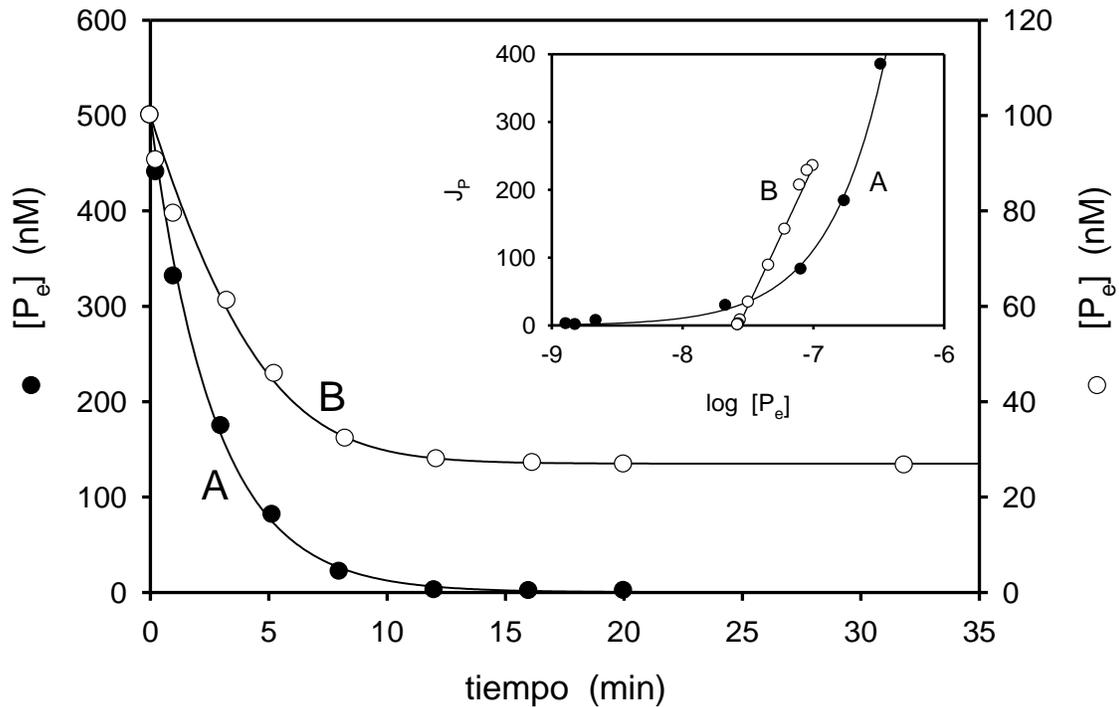


Fig. 9. Comparación de la incorporación neta de fosfato exhibida por dos poblaciones de *A. nidulans* provenientes del mismo cultivo original. Una suspensión conteniendo $20 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ (curva A) recibió un pulso de 500 nM fosfato, mientras que la población diluida cinco veces con respecto a la primera ($4 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$; curva B) fue expuesta a 100 nM fosfato. Las curvas representan los mejores ajustes computados usando la función de cinética de primer orden (curva A: $k = 0.37 \text{ min}^{-1}$; $[P_e]_A = 0.3 \text{ nM fosfato}$) y la Eq. 3 (curva B: $L_p = 10.2 \text{ nM min}^{-1}$; $[P_e]_A = 26.3 \text{ nM fosfato}$). *Inserto:* Regraficado semilogarítmico de los mismos datos. J_p está dado en $\mu\text{mol P}_i$ ($\text{mg Clo } a \text{ h}^{-1}$) $^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

El modelo de flujo-fuerza fue utilizado para analizar esta rápida adaptación a las fluctuaciones de fosfato. Únicamente el transcurso de la remoción de fosfato por la población menos densa pudo ser ajustado a esta función semilogarítmica, mostrado en la figura 9 (curva B). Cuando las tasas de incorporación relativas a las concentraciones de *Clo a*, correspondientes a ambas curvas de remoción, fueron graficadas en función el logaritmo de las concentraciones externas, se observó que la población menos densa incorporó el nutriente en una relación de dependencia lineal entre el flujo neto y el logaritmo de la concentración externa. Ambas poblaciones experimentaron un incremento similar de su concentración de polifosfato, si bien la población menos densa incrementó su contenido intracelular de fosfato en 1.5 veces su valor inicial, la suspensión mas

concentrada lo duplicó. Este fenómeno adaptativo extremadamente rápido tuvo lugar al inicio de la exposición al fosfato externo y fue independiente de la concentración del *pool* de polifosfato celular.

En el experimento destinado a investigar el efecto de pulsos sucesivos de fosfato en las propiedades cinéticas y energéticas del sistema de incorporación, se observó una dramática alteración de sus propiedades. Se incluyeron dos suspensiones de algas, provenientes del mismo cultivo original, aunque diferenciándose aún más en su densidad poblacional (Fig. 10). En el experimento de la figura 10 A, una suspensión concentrada de algas conteniendo $100 \mu\text{g Clo } a \text{ ml}^{-1}$ fue expuesta a dos pulsos subsecuentes de 500 nM y uno de $1 \mu\text{M}$ fosfato. La concentración de fosfato externo permaneció constante a un valor umbral de 3 nM luego del primer pulso. Aparentemente, el valor umbral aumentó luego del segundo y tercer pulso. Para determinar si este fenómeno pudiera deberse a la liberación extracelular de compuestos orgánicos fosforados, se procedió a separar las fracciones orgánica e inorgánica presentes en el medio de cultivo mediante su extracción.

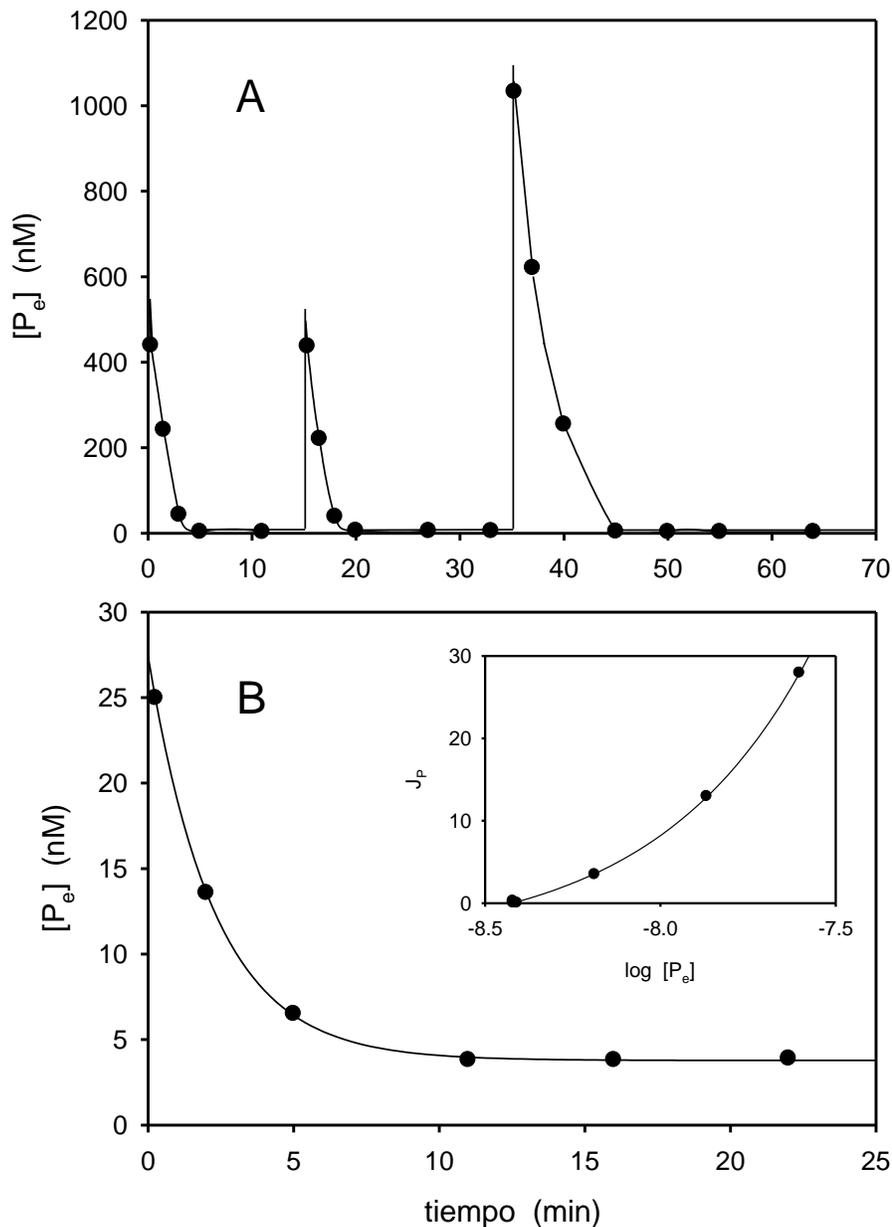


Fig. 10. Transcurso de la remoción de fosfato por *A. nidulans*. **A:** Una población algal densa ($100 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$) fue expuesta a dos pulsos subsecuentes de 500 nM y uno de $1 \mu\text{M}$ fosfato. El valor umbral fue reproducible y cercano a 3 nM fosfato, luego de restar la porción orgánica de fosfato de la concentración total. **B:** La suspensión de algas de A fue diluida adicionalmente a una concentración final de $20 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ y expuesta a un pulso adicional de 20 nM fosfato. La curva representa el mejor ajuste computado usando cinética de primer orden ($k = 0.44 \text{ min}^{-1}$, $[P_e]_A = 3.8 \text{ nM}$ fosfato). *Interno:* Regraficado semilogarítmico de los datos de B. El flujo neto (J_p) está dado en $\mu\text{mol } P_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

Luego de sustraída la porción orgánica del contenido total determinado en el medio, la concentración umbral corregida fue en todos los casos cercana a 3 nM fosfato, indicando que los procesos adaptativos no habían tenido lugar. La misma suspensión de algas fue adicionalmente diluida cinco veces luego de

transcurridos 80 minutos, alcanzando una concentración final de clorofila *a* de 20 $\mu\text{g l}^{-1}$. La dilución se realizó en un medio de cultivo fresco conteniendo 20 nM fosfato (Fig. 10 B). La concentración umbral fue alcanzada luego de otros 10 minutos y fue nuevamente cercana a 3 - 4 nM fosfato, posterior a la corrección con el fosfato orgánico externo. La cantidad total de fosfato almacenado por las algas durante los cuatro pulsos correspondió a 1.6 veces el contenido inicial intracelular. El mejor ajuste de los datos fue obtenido con la función de cinética de primer orden (Fig. 10B), de modo que el regraficado semilogarítmico no resultó en una relación lineal, pero correspondió a una curva ascendente indicando el estado fisiológico previo a la adaptación.

En un experimento paralelo (Fig. 11), una suspensión de algas conteniendo 10 $\mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ fue expuesta a tres adiciones subsecuentes de 50 nmol fosfato l^{-1} , resultando en tres valores umbrales diferentes (17 nM, 66 nM y 116 nM fosfato). La separación de las diferentes fracciones de fosfato orgánico e inorgánico confirmó que la radiactividad encontrada en el medio fue efectivamente ortofosfato y no fosfato orgánico externo, el que correspondió a 1.53 ± 0.24 nM fosfato. El cálculo de la cantidad de fosfato incorporado luego de los tres pulsos demostró que esta población de algas incorporó cinco veces menos que la suspensión del experimento paralelo de la figura 12 y por lo tanto insuficiente para una duplicación (0.32 veces su concentración inicial), quedando excluida de esta forma una posible regulación simple de la incorporación por la formación del producto.

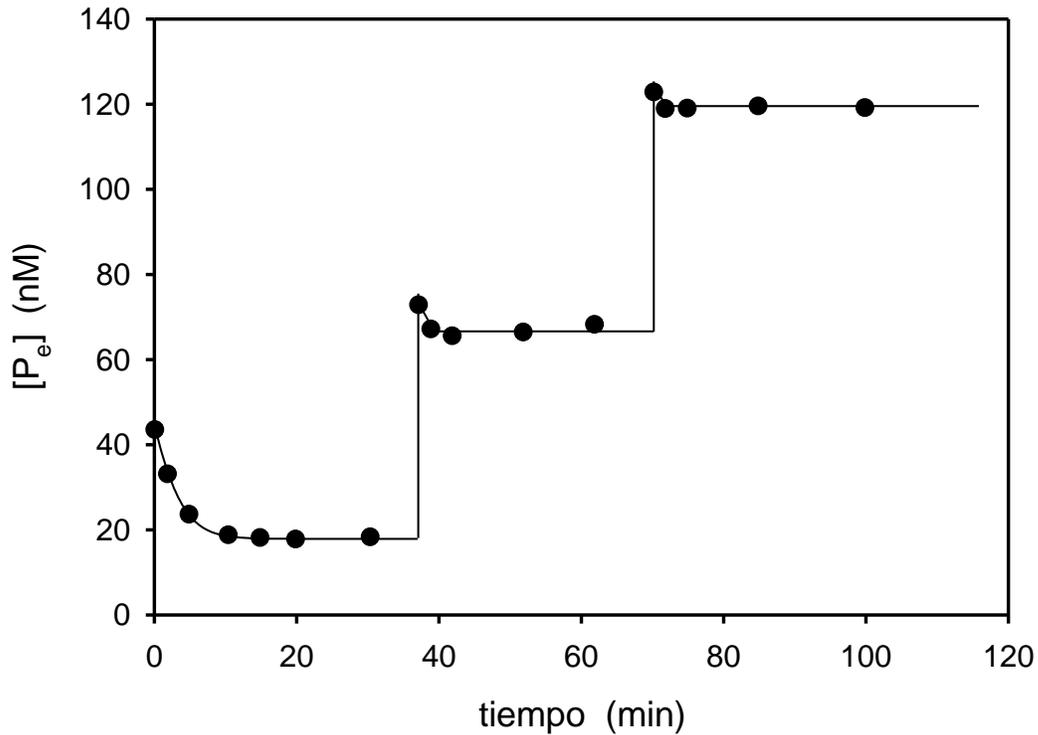


Fig. 11. Remoción de fosfato realizada con la misma suspensión de cianobacterias que la utilizada en el experimento presentado en la figura 10, pero con un contenido de $10 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$. Se aplicaron tres pulsos de fosfato a las algas. Los siguientes valores umbrales fueron observados: 18 nM (primera adición), 66 nM (segunda adición) y 116 nM fosfato (tercera adición).

3.1.3. *Incorporación de fosfato y alteraciones del patrón de pigmentos durante la fase de crecimiento*

Una vez que el sistema de absorción haya adquirido propiedades lineales con respecto al eje $\log [P_e]$, el crecimiento celular dejaría de estar limitado por el fosfato, tornándose inminente el inicio de la división celular. De esta forma, fue interesante conocer el comportamiento de incorporación durante el inicio del crecimiento. La figura 12 muestra un experimento realizado con algas que fueron preincubadas con una concentración de fosfato equivalente a veinte veces su concentración inicial de fósforo total ($3.3 \mu\text{M}$). Se observó una fase de retraso del inicio del crecimiento o fase *lag* durante aproximadamente 13 horas desde donde se constató el inicio de la división celular. Se realizaron experimentos de incorporación luego de 14 horas, una vez que la población incrementara tres veces su densidad celular inicial durante la tasa máxima

de división (Fig. 12; curva B). Paralelamente se realizó un experimento control (curva A) con una población limitada en su crecimiento pero con igual densidad celular (1.20×10^6 células ml^{-1}).

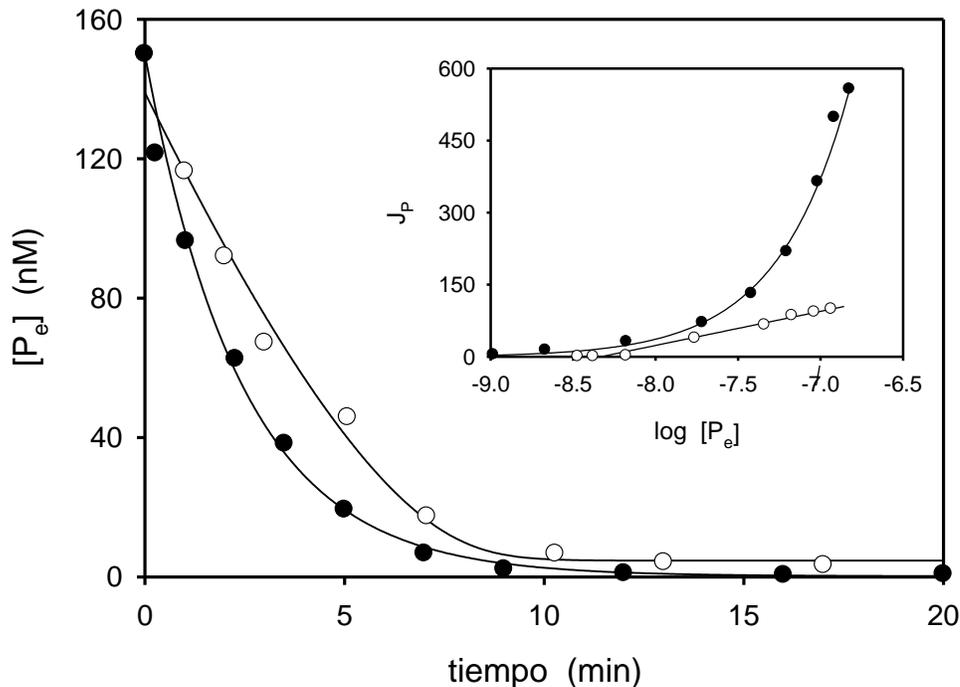


Fig. 12. Transcurso de la remoción neta de fosfato por *A. nidulans* durante el crecimiento. La suspensión de cianobacterias ($13 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$) fue preincubada con $3.33 \mu\text{M}$ fosfato correspondiendo a veinte veces la concentración inicial de fósforo total en el cultivo. Círculos negros: adición de fosfato a una población no preincubada, proveniente del mismo cultivo. Círculos blancos: experimento realizado con la población preincubada, luego que la población incrementara tres veces su número (14 horas) y paralelamente al experimento control. Las curvas representan el mejor ajuste obtenido con la función de cinética de primer orden para la población control: $k = 0.41 \text{ min}^{-1}$; $[P_e]_A = 0.2 \text{ nM}$ fosfato; y la Eq. 3 para la población preincubada: $L_p = 6.86 \text{ nM min}^{-1}$; $[P_e]_A = 4.7 \text{ nM}$ fosfato. *Interno:* Regraficado semilogarítmico de los mismos datos. J_p está dado en $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

Durante el período de crecimiento se observó una alteración en la coloración de los cultivos, pasando de verde-amarillo, característico de cultivos deficientes por fosfato, a verde-azul típico de los cultivos suficientes por el nutriente. De esta forma se investigó, durante el crecimiento algal, la composición relativa y absoluta de los principales pigmentos involucrados en la captación de energía lumínica.

En el mismo experimento de la figura 12 fue posible evaluar las alteraciones en la composición de los pigmentos luego de alcanzada la dependencia lineal del flujo neto de fosfato en el logaritmo de la concentración externa (Fig. 12, *interno*), y posteriormente iniciado el crecimiento algal. Se realizaron

determinaciones de la composición relativa de pigmentos previo a la preincubación y posteriormente al inicio de la división celular. El transcurso de las alteraciones en el contenido de pigmentos *in vivo* se muestran en la figura 13. Los espectros fueron realizados con igual número celular y ajustados a una línea base de la misma cianobacteria previamente despigmentada (ver MATERIALES Y MÉTODOS). Posteriormente se procedió a ajustar los diferentes espectros a 750 nm para comparar los máximos de absorbancia. El espectro de absorbancia control (Fig. 13; línea sólida) muestra una composición típica de pigmentos de *A. nidulans* en estado deficiente por fosfato, el cual se caracteriza por una menor fracción de los pigmentos accesorios como la ficocianina (pico de absorbancia: 630 nm).

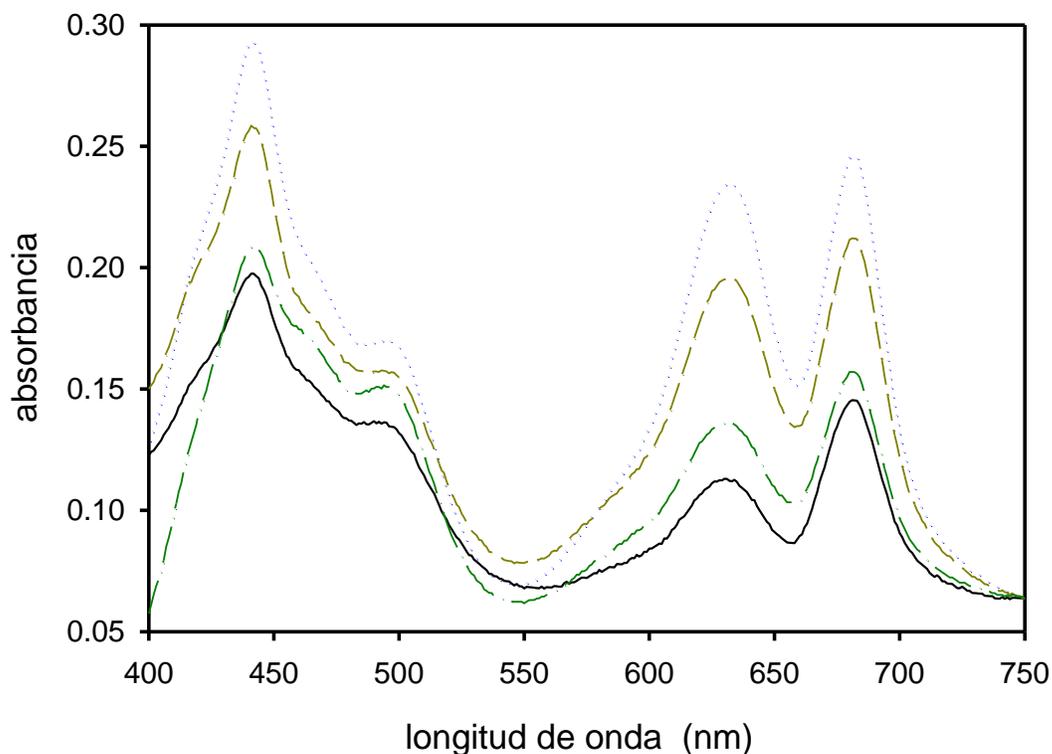


Fig. 13. Espectros de absorbancia de *A. nidulans* durante el crecimiento y la correspondiente reorganización del patrón de pigmentos, pertenecientes al experimento de la Fig. 12, realizado previo (línea sólida) y luego del agregado de un pulso de fosfato equivalente a veinte veces la concentración de PT inicial presente en el medio (ver texto). Los espectros siguientes fueron medidos a 17 h (línea punteada), 23 h (línea cortada) y 77 h (línea cortada-punteada) de agregado el pulso. Como línea base se utilizó la misma cianobacteria previamente despigmentada. Pico de clorofila *a*: 680 nm; ficocianina: 630 nm; caroteno: 500 nm.

Luego de 17 horas de la adición de fosfato, las algas alcanzaron una densidad seis veces mayor a su número inicial, observándose modificaciones significativas en el sistema de recolección de energía lumínica (Fig. 13; línea punteada). Durante esta fase de división celular, correspondiente a la velocidad máxima de crecimiento

($\mu = 0.277 \text{ h}^{-1}$) y a una duplicación inicial (td_{ini}) de 2.5 horas, se alcanzaron las absorbancias máximas para la clorofila, los carotenoides y especialmente la ficocianina. En los siguientes espectros fue posible verificar una disminución progresiva de la absorbancia en todos los pigmentos, así como una disminución en la tasa de crecimiento ($\mu = 0.067 \text{ h}^{-1}$; $td = 10.3 \text{ h}$; Fig. 14).

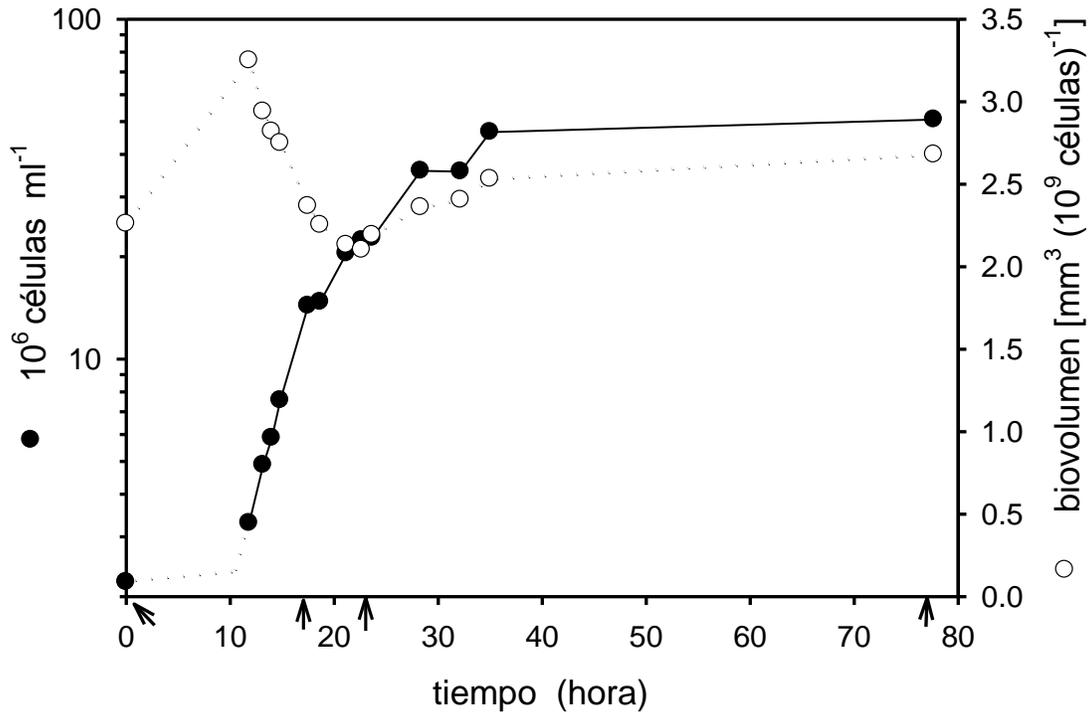


Fig. 14. Transcurso de tiempo del crecimiento de *A. nidulans* y la variación respectiva del volumen celular, correspondiente al experimento de la Fig. 12. $\mu = 0.114 \text{ h}^{-1}$; $\mu_{ini} = 0.277 \text{ h}^{-1}$; $td = 6.08 \text{ h}$; $td_{ini} = 2.5 \text{ h}$. Las flechas indican los tiempos donde se analizaron los espectros de absorbancia.

Luego de 77 horas de incubación y transcurridas 42 horas del cese del crecimiento (Fig. 14), el aparato de captación de luz regresa a una composición cercana al espectro inicial característico de la población deficiente por fosfato. Sin embargo, es posible observar una persistencia de valores elevados de absorbancia, particularmente aquellos correspondientes al pico de ficocianina (Fig. 13). En este caso, la variación observada en la composición de pigmentos a lo largo del tiempo de incubación no se debió a variaciones en el volumen celular, dado que en los momentos de realización de los espectros los volúmenes fueron comparables y aún el espectro de absorbancias altas (23 h) correspondió con los volúmenes celulares menores (Fig. 14).

Se incluyeron más intervalos de tiempo en un experimento similar, donde fue posible comprobar que la reorganización observada en la composición de pigmentos del sistema de recolección de energía lumínica, se inició previo al comienzo de la división celular. En el experimento de la figura 15, una suspensión más densa de la cianobacteria, conteniendo $40 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$, recibió un pulso de fosfato de $5 \mu\text{M}$, correspondiendo a diez veces la concentración inicial de fósforo total en el cultivo. Se realizaron espectros de absorbancia durante la fase *lag* (la que tomó de 7 a 8 horas luego de agregado el pulso) y durante la división celular. La absorbancia máxima de los picos de ficocianina y clorofila fue registrada a 10 horas de agregado el fosfato (Fig. 15, línea punteada) y previo el inicio de la división celular a máxima tasa (0.23 h^{-1} ; tiempo de duplicación = 3.0 h).

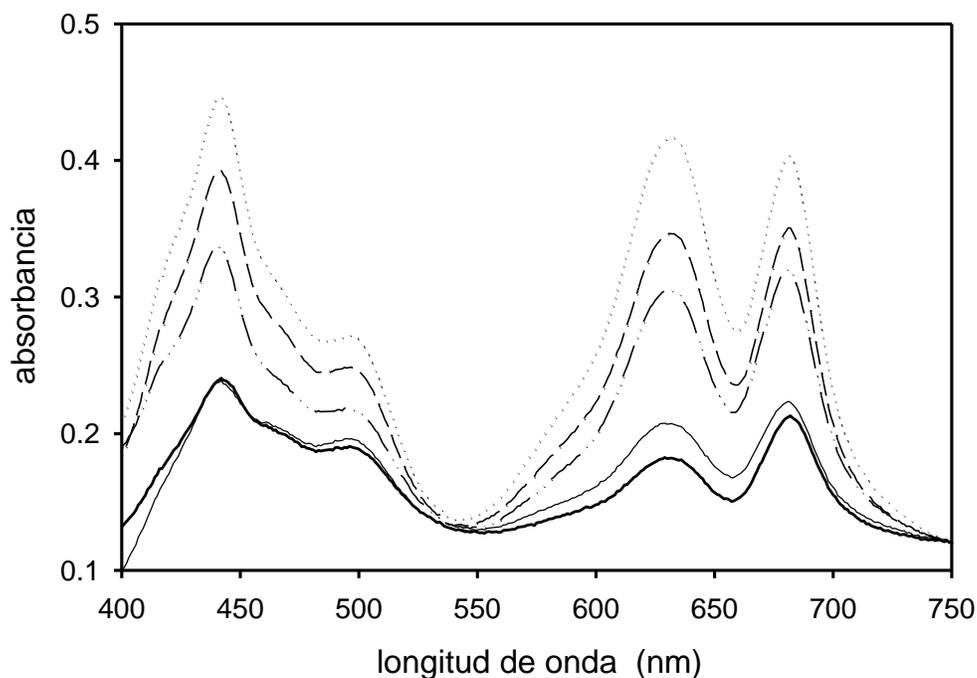


Fig. 15. Espectros de absorbancia de *A. nidulans* conteniendo $40 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ (línea sólida gruesa) y luego de recibir un pulso de fosfato de $5 \mu\text{M}$ fosfato equivalente a diez veces la concentración de PT inicial. Los espectros siguientes muestran la reorganización del patrón de pigmentos, medidos al cabo de 7 h (línea cortada), 10 h (línea punteada), 14.5 h (línea cortada-punteada) y 31.7 h (línea sólida fina) de agregado el pulso. Como línea base se utilizó la misma cianobacteria previamente despigmentada. Por simplicidad sólo se incluyen cinco espectros. Pico de clorofila *a*: 680 nm; ficocianina: 630 nm; caroteno: 500 nm.

Cuando la población comenzó a dividirse a una tasa menor ($\mu = 0.08 \text{ h}^{-1}$; $\text{td} = 8.1 \text{ h}$) la cianobacteria disminuyó su contenido de pigmentos a medida que fue alcanzando el estado estacionario (Fig. 16A y B). De forma similar a lo encontrado en el experimento de la figura 15, la absorbancia descendió progresivamente

hasta un valor cercano al espectro inicial. Sin embargo, la aproximación a la condición inicial se produjo aquí, coincidentemente con la finalización de la división celular (Fig. 15 y 16A).

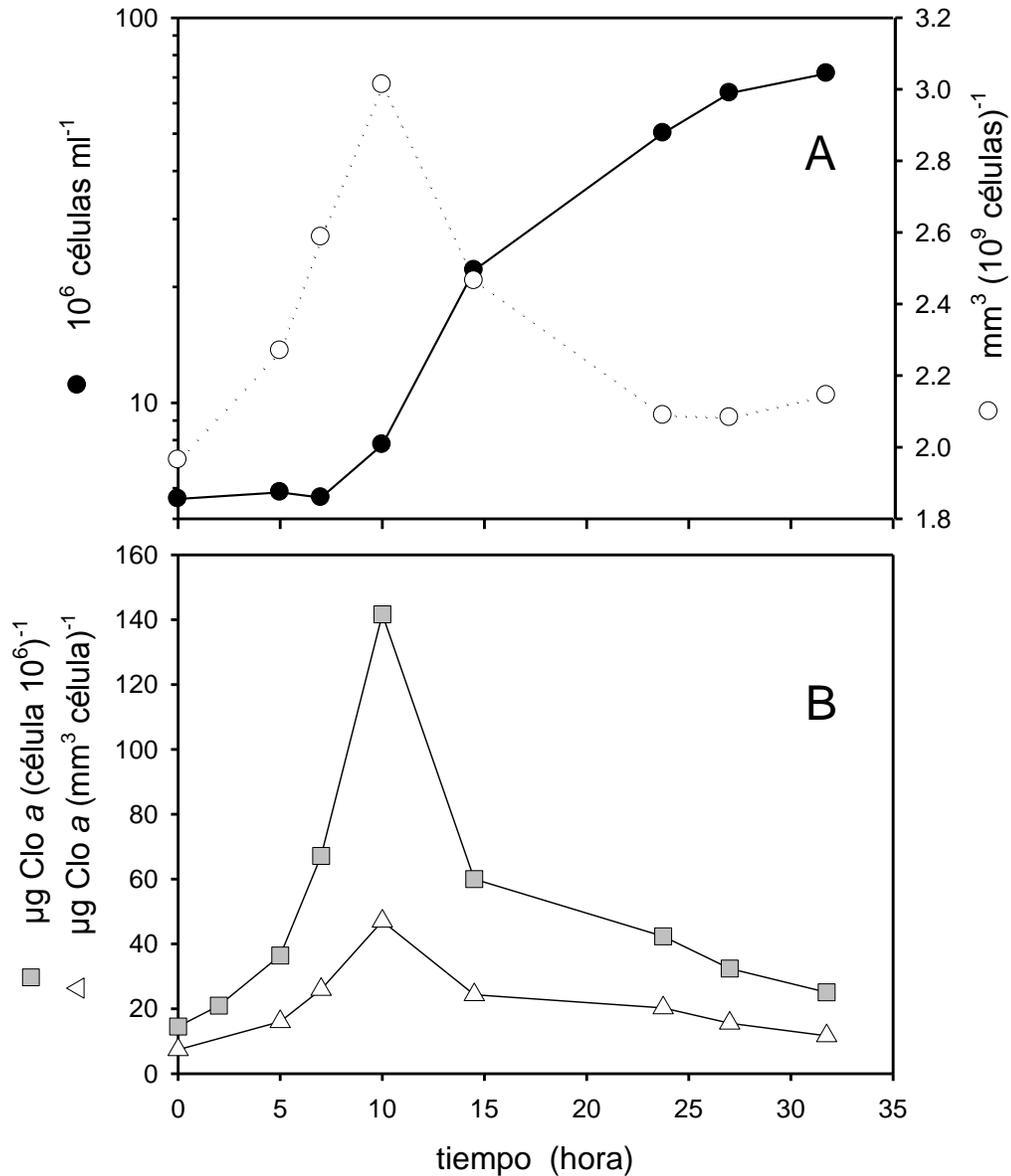


Fig. 16. A: Transcurso de la densidad celular de un cultivo de *A. nidulans* y su respectiva modificación del volumen celular, correspondiente al experimento de la Fig. 15. $\mu = 0.124$ h^{-1} ; $\mu_{ini} = 0.23$ h^{-1} ; $td = 5.6$ h; $td_{ini} = 3.0$ h. **B:** Variación de la concentración de Clo *a* relativa al número y volumen celular en función del tiempo.

En este caso, el desarrollo del volumen celular fue máximo conjuntamente con los valores máximos de absorbancia (Fig. 16A). La acumulación de Clo *a* por célula, observada al inicio de la división celular,

correspondió a diez veces la concentración inicial del pigmento. Aunque el volumen celular presentó un valor máximo en el mismo intervalo de tiempo, la concentración de Clo *a* por volumen fue mayor a seis veces su concentración inicial (Fig. 16B).

3.2. INCORPORACIÓN DE FOSFATO POR COMUNIDADES DE FITOPLANCTON EN LAGOS EUTRÓFICOS *

3.2.1. *Monitoreo de las condiciones físico-químicas en los lagos Canteras y Rodó*

El rango de concentración de fósforo total (PT) en el agua superficial del Lago Canteras fue entre 5 y 6 $\mu\text{mol l}^{-1}$, mientras que el ortofosfato (PO_4^{-3}) fue indetectable por el método de molibdato (Tabla 2). La fracción particulada tampoco presentó diferencias importantes. La concentración de clorofila *a* (Clo *a*) en la superficie fue cercana a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ en ambas ocasiones de muestreo.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos obtenidos en muestras superficiales del Lago Canteras. PO_4 : ortofosfato, PTD: fósforo total disuelto, PTP: fósforo total particulado, NTD: nitrógeno total disuelto, NT: nitrógeno total.

| Fecha de muestreo | T (°C) | PO_4^{-3} | PTD | PTP | PT ($\mu\text{mol l}^{-1}$) | NO_3^- | NTD | NT | Clo <i>a</i> ($\mu\text{g l}^{-1}$) |
|-------------------|-----------|--------------------|-----|-----|----------------------------------|-----------------|------|------|--|
| 5 diciembre | 24.0 | Indet. | 2.8 | 3.1 | 5.9 | - | - | - | 47.2 |
| 12 diciembre | 25.2 | Indet. | 1.4 | 3.9 | 5.3 | 7.1 | 30.7 | 95.2 | 49.0 |

La temperatura del agua superficial del Lago Rodó fue máxima en enero (25.3 °C), mientras que el mínimo valor se registró en junio (11.5 °C). La concentración de fósforo total varió a lo largo del período de estudio de 2.6 a 6.9 $\mu\text{mol l}^{-1}$ y reflejó la actividad del sistema de bombeo (Fig. 17). La concentración de ortofosfato fue cercana a los límites de detección, dificultando una determinación analítica precisa. Sin embargo, fue posible determinar el fósforo total disuelto, el que presentó valores mínimos en marzo (0.3 $\mu\text{mol l}^{-1}$). La Clo *a* disminuyó continuamente después de diciembre y alcanzó un valor mínimo de 75 $\mu\text{g l}^{-1}$ en febrero. Posteriormente se observó un incremento progresivo hasta el mes de junio, con el máximo valor registrado (260 $\mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$).

* Los resultados obtenidos con las comunidades naturales de fitoplancton se publicarán parcialmente en *European Journal of Phycology* como: Aubriot, L., Wagner, F. & Falkner G. The phosphate uptake behaviour of phytoplankton communities in eutrophic lakes reflects alterations in the phosphate supply. (en prensa)

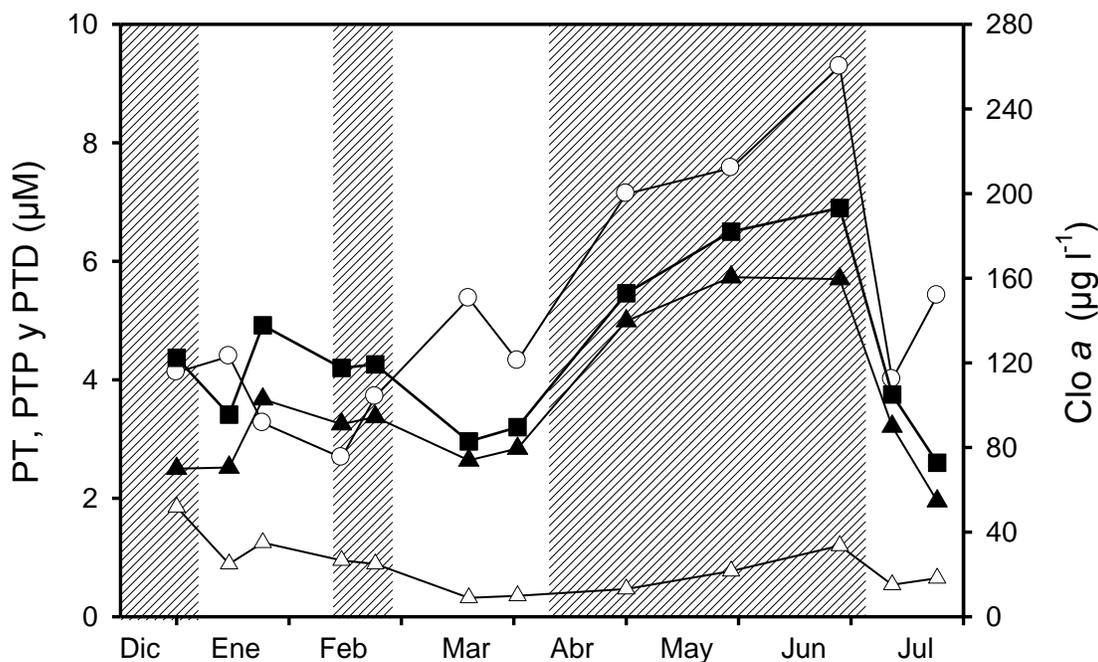


Fig. 17. Concentración de las principales fracciones de fósforo y de Cloa (círculos blancos) en las muestras superficiales del Lago Rodó durante el período de estudio. Los períodos de funcionamiento del sistema de bombeo están representados en las áreas sombreadas. PT: fósforo total (cuadrados), PTP: fósforo total particulado (triángulos negros), PTD: fósforo total disuelto (triángulos blancos).

3.2.2. Absorción neta de fosfato por comunidades fitoplanctónicas en el Lago Canteras

Se realizaron dos experimentos con fitoplancton del Lago Canteras el 5 y 12 de diciembre de 1997 (Fig. 18). El mismo protocolo experimental fue aplicado en ambas fechas de muestreo: las poblaciones de fitoplancton fueron premarcadas como fuera descrito en MATERIALES Y MÉTODOS, y posteriormente fueron analizadas las características del comportamiento de incorporación, luego del agregado de dos pulsos consecutivos de $[^{32}\text{P}]$ fosfato.

Se aplicaron 280 nM fosfato en el primer pulso y se siguió la disminución de la concentración de fosfato externo a lo largo del tiempo, hasta que la incorporación se detuvo en un valor estable (Fig. 18A). Luego de este procedimiento, la muestra recibió un segundo pulso de 60 nM $[^{32}\text{P}]$ fosfato y se midió el proceso de absorción nuevamente para determinar si la comunidad fitoplanctónica aún tenía la capacidad de incorporar el nutriente con las mismas características de absorción encontradas luego del primer pulso (Fig. 18B).

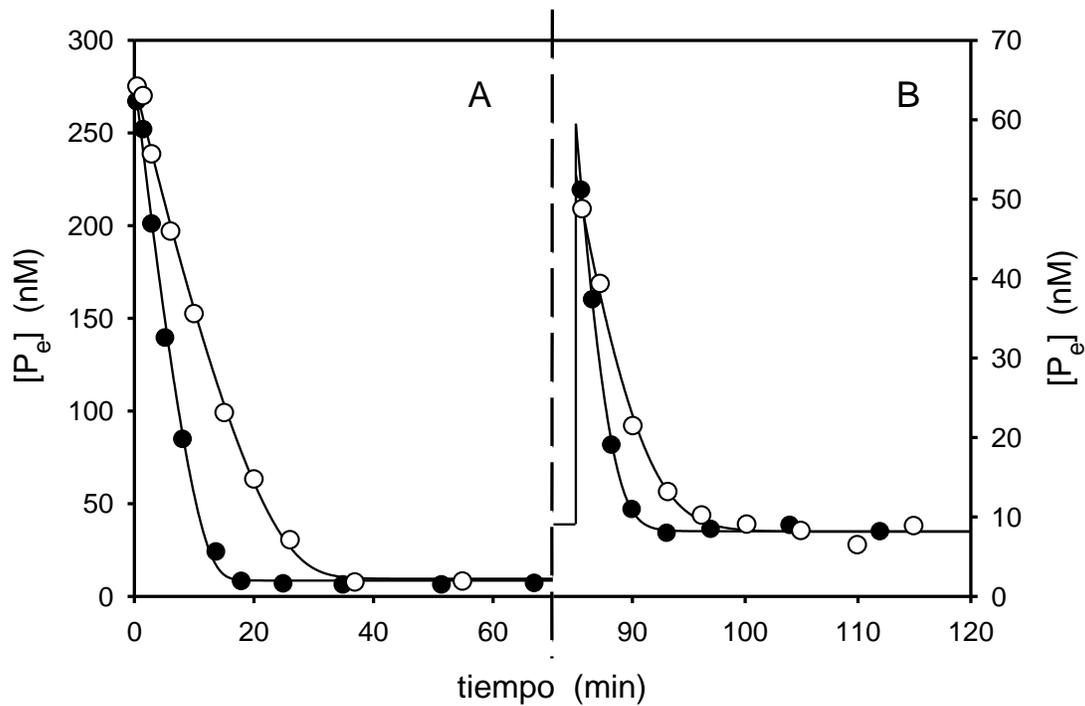


Fig. 18. Comparación del transcurso de la remoción de fosfato por dos muestras independientes de comunidades fitoplanctónicas del Lago Canteras, correspondientes al 5 (círculos negros) y 12 (círculos blancos) de diciembre. El contenido de clorofila *a* fue 47.2 y 49.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ respectivamente. Luego del premarcado, las dos muestras fueron expuestas al mismo patrón de pulsos sucesivos de 280 nM y 60 nM ^{32}P fosfato. **A:** Transcurso de la remoción de fosfato luego del agregado de 280 nM fosfato a las comunidades. Las curvas representan el mejor ajuste computado, obtenido con la Eq. 3 (círculos negros: $L_p = 8.0 \text{ nM min}^{-1}$, $[\text{P}_e]_A = 8.5 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.997$; círculos blancos: $L_p = 3.9 \text{ nM min}^{-1}$, $[\text{P}_e]_A = 9.5 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.999$). **B:** Transcurso de la remoción de fosfato luego del siguiente agregado de 60 nM fosfato. Las curvas representan el mejor ajuste computado, obtenido con la Eq. 3 (círculos negros: $L_p = 8.7 \text{ nM min}^{-1}$, $[\text{P}_e]_A = 8.3 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.999$; círculos blancos: $L_p = 4.1 \text{ nM min}^{-1}$, $[\text{P}_e]_A = 8.1 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.995$).

El análisis de la remoción de fosfato a lo largo del tiempo indicó que, en todos los casos, la disminución en la concentración de fosfato externo obedeció la relación de flujo-fuerza (Eq. 3) dentro del rango de concentración testado. Además, este análisis mostró que en un mismo experimento, las propiedades energéticas y cinéticas del sistema de absorción de la comunidad respectiva no cambiaron durante los pulsos subsecuentes, como fuera revelado por los valores calculados de L_p y $[\text{P}_e]_A$ a partir del modelo (ver leyenda de la figura 18). Sin embargo, se obtuvieron diferencias considerables entre los coeficientes de conductividad obtenidos en los experimentos del 5 y 12 de diciembre, indicado por las pendientes obtenidas de las gráficas Thellier semilogarítmicas (Fig. 19). Por el contrario, los valores umbrales (intersección con el eje $\log[\text{P}_e]$) permanecieron esencialmente incambiados.

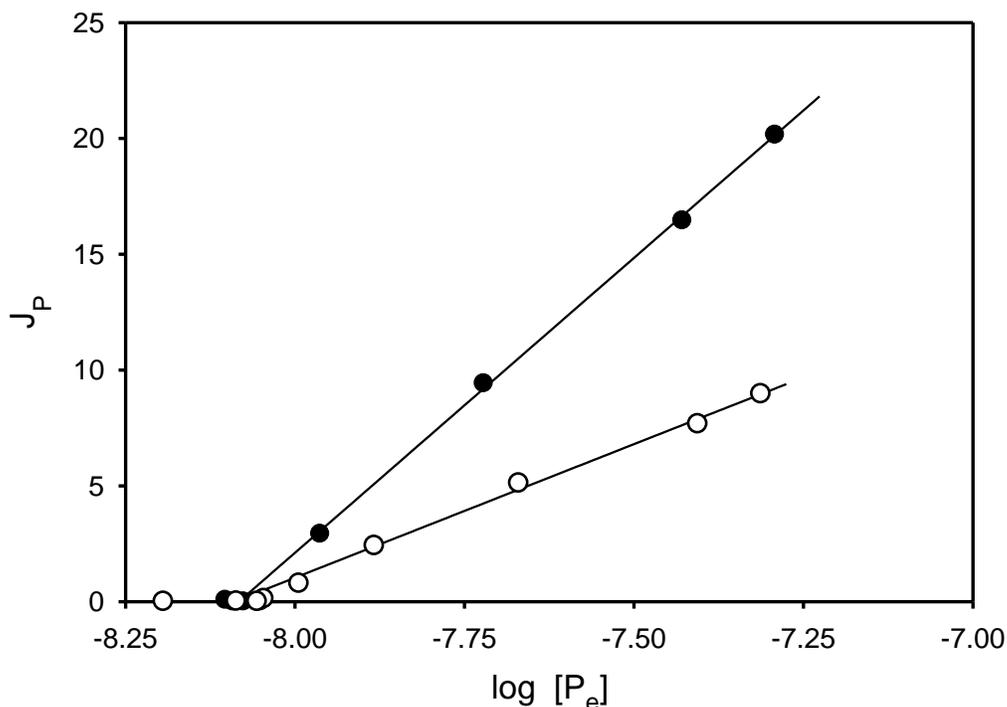


Fig. 19. Regraficado semilogarítmico de la dependencia de la concentración en la tasa de incorporación obtenida a partir de los transcurso de la remoción de fosfato de la Fig. 18B. Los círculos negros refieren a la comunidad premarcada obtenida el 5 de diciembre y los círculos blancos refieren al día 12 del mismo mes. J_p está dado en $\mu\text{mol P}_i$ $(\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración (M).

Estas alteraciones de la cinética de incorporación de fosfato fueron observadas en un estudio más detallado, con poblaciones fitoplanctónicas provenientes del Lago Rodó, durante exposiciones discontinuas de los organismos a altas concentraciones de fosfato por la descarga de aguas subterráneas.

3.2.3. *Absorción neta de fosfato por comunidades fitoplanctónicas en el Lago Rodó*

Como fuera indicado en *Área de estudio*, el Lago Rodó difiere del Lago Canteras en que el suministro de nutrientes proviene de la afluencia de aguas subterráneas. El sistema de bombeo de agua fue periódicamente interrumpido y reanudado entre diciembre de 1997 y julio de 1998, de modo que la actividad de incorporación de fosfato por el fitoplancton pudo relacionarse al estado prevaleciente del nutriente en el lago.

La composición específica del fitoplancton al comienzo del período de estudio consistió en *Scenedesmus* sp. en codominancia con *Coelastrum* sp. y *Crucigenia* sp. (Tabla 3). A partir de enero, las cianobacterias coloniales comenzaron a ser dominantes en el lago, representadas por *Merismopedia* spp., *Coelastrum* sp. y *Microcystis* spp. Fueron encontradas cianobacterias filamentosas a partir de febrero, principalmente representadas por *Anabaena* sp. y *Limnothrix* sp., mientras que al comienzo de marzo la especie dominante pasó a ser *Raphidopsis mediterranea*, constituyendo 60 % del biovolumen de los principales géneros, a pesar de que se registraran oscilaciones considerables en su abundancia. Desde fines de marzo hasta julio ocurrieron períodos de codominancia de esta especie con *Synedra* spp., *Coelosphaerium* sp., *Microcystis* spp. y *Cryptomonas* spp. Un período de dominancia transitoria de *Cryptomonas* a fines de junio correspondió a 70 % del biovolumen de los principales grupos y coincidió con la mayor concentración de Clo *a* medida en el agua superficial durante el período de estudio.

Tabla 3. Composición específica y biovolumen respectivo de las comunidades fitoplanctónicas en el Lago Rodó presentes en muestras superficiales, entre diciembre de 1997 y julio de 1998.

| Especies | Biovolumen (mm ³ l ⁻¹) | | | | | | | |
|-------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1997 | | | 1998 | | | | |
| | 22 Dic | 19 Ene | 11 Feb | 18 Mar | 24 Abr | 28 May | 25 Jun | 10 Jul |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | 6.3 | 1.8 | 0.7 | | | | | |
| <i>Coelastrum</i> sp. | 3.2 | 15.8 | | | | | | |
| <i>Crucigenia</i> sp. | 3.0 | | | | | | | |
| <i>Raphidiopsis</i> sp. | | | | 14.0 | 13.9 | 1.6 | 13.0 | 2.7 |

| | | | | | | | | |
|---------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| <i>Pseudanabaena</i> sp. | | | | 1.0 | 0.7 | 0.6 | 0.6 | 0.8 |
| <i>Anabaena</i> sp. | | | 0.3 | | | 0.5 | | |
| <i>Limnothrix</i> sp. | | | 1.3 | | | | | |
| <i>Microcystis</i> spp. | 0.8 | 5.1 | 3.1 | 1.7 | 1.3 | 1.8 | 1.2 | 0.4 |
| <i>Merismopedia</i> spp. | | 20.1 | 8.4 | 0.2 | | | | |
| <i>Gomphosphaeria</i> sp. | | | 0.9 | | | | | |
| <i>Coelosphaerium</i> sp. | | | | | | 3.3 | | |
| <i>Synedra</i> spp. | 0.3 | | 2.4 | 0.6 | 5.2 | 7.0 | 0.7 | 0.9 |
| <i>Nitzschia</i> spp. | | | | 0.2 | 0.2 | 1.1 | | |
| <i>Aulacoseira</i> sp. | | 7.6 | | | | | | |
| <i>Cryptomonas</i> spp. | | 7.5 | | 5.4 | | | 39.8 | 2.9 |

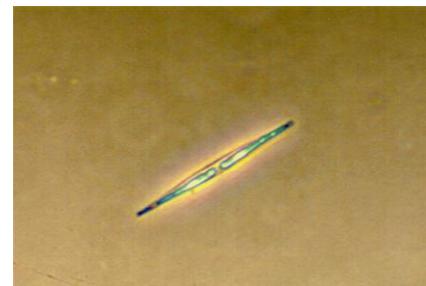
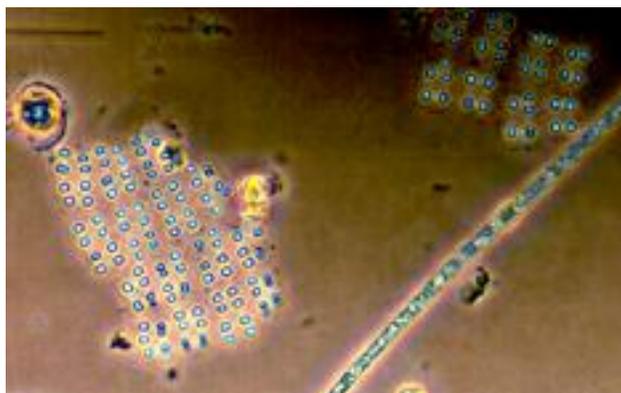
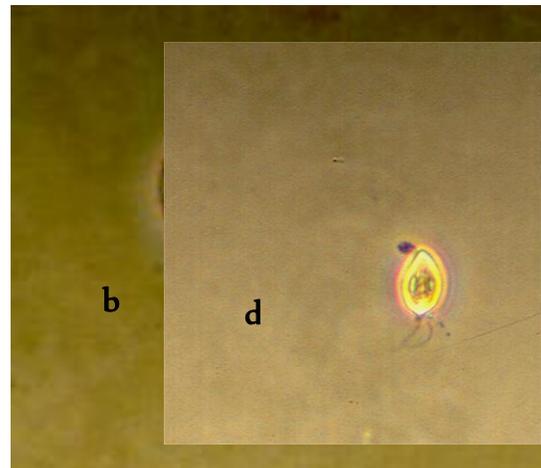
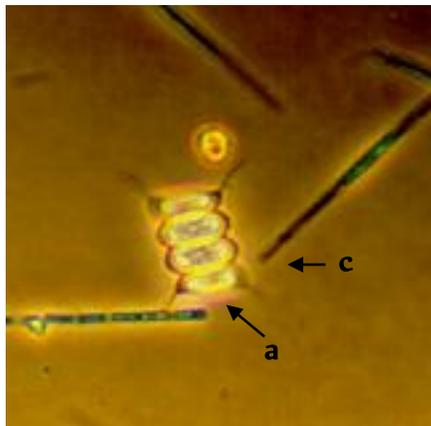




Fig. 20. Taxa representativos del fitoplancton del Lago Rodó: *Scenedesmus* sp. (a), *Microcystis* spp. (b), *Merismopedia* spp. (c), *Synedra* spp. (d), *Raphidiopsis mediterranea* (e), *Cryptomonas* spp. (f).

El experimento de la figura 21 A se llevó a cabo en diciembre de 1997, al final del período durante el cual el agua subterránea fuera constantemente bombeada al lago por más de un año. También aquí el fitoplancton fue previamente marcado con el trazador y luego expuesto a dos pulsos subsecuentes de 60 nM fosfato; prácticamente el mismo valor umbral de aproximadamente 15 nM fosfato fue alcanzado luego de los pulsos. Una comparación de los coeficientes de conductividad computados, que se obtuvieron de los datos de cada pulso, mostró que el sistema de absorción no fue desactivado durante los agregados de fosfato. Incluso el segundo coeficiente de conductividad fue un poco mayor, aunque el incremento observado de 2.1 a 2.6 $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ fue irrelevante. La dependencia lineal del logaritmo de la concentración externa en la tasa de incorporación a partir de los datos del primer pulso se muestra en la figura 21B.

El fosfato externo fue removido con mayor rapidez que durante el período previo rico en nutrientes, cuando el fitoplancton premarcado fue expuesto a pulsos de ^{32}P fosfato, muestreados en el lapso en el cual el sistema de bombeo estuvo interrumpido durante dos semanas aproximadamente (Fig. 22, 22 de enero). Se ajustó la relación flujo-fuerza para cuantificar esta activación revelando que los parámetros de incorporación L_p (relativo a $\text{Clo } a$) y $[\text{P}_e]_{A'}$ fueron diferentes a los de la figura 21. Aquí, una disminución del valor umbral de aproximadamente 15 a 6 nM fue acompañado por un incremento de cinco veces en el coeficiente de conductividad, desde 2.1 a 10.8 $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$.

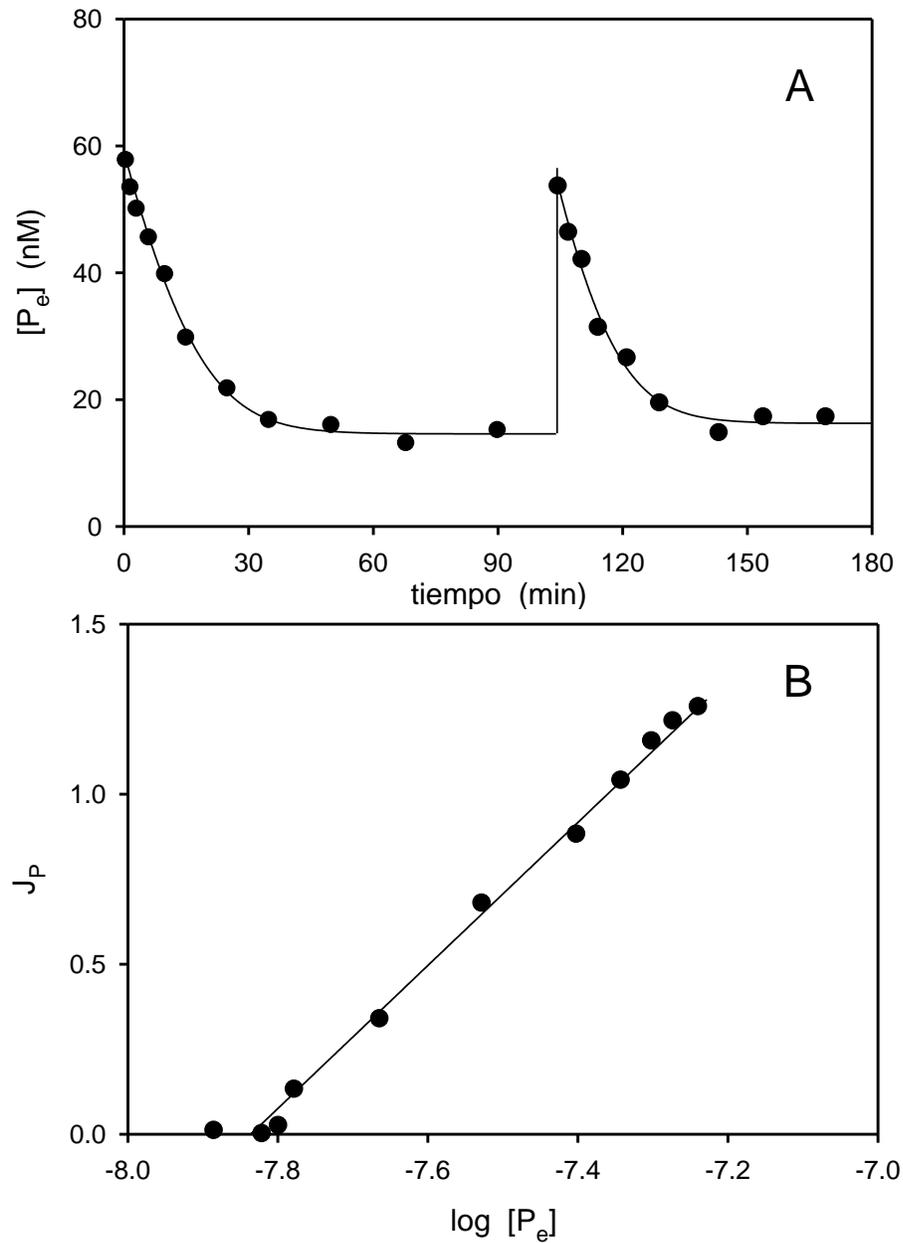


Fig. 21. Transcurso de la remoción de fosfato en una muestra de fitoplancton del Lago Rodó obtenida el 30 de diciembre. La concentración de clorofila *a* de la comunidad fue 115 $\mu\text{g l}^{-1}$. Pevio al experimento, la muestra fue premarcada para obtener datos de incorporación neta. **A:** Aplicado de dos pulsos subsecuentes de 60 nM [³²P] fosfato a la comunidad y posterior seguimiento de los correspondientes transcurros de tiempo. Las curvas representan el mejor ajuste computado utilizando la Eq. 3 (primer pulso: $L_p = 1.8 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 14.6 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.996$; segundo pulso: $L_p = 2.2 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 16.2 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.990$). **B:** Regraficado semilogarítmico de los datos de incorporación obtenidos de A (primer pulso de fosfato). J_p está dado en $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

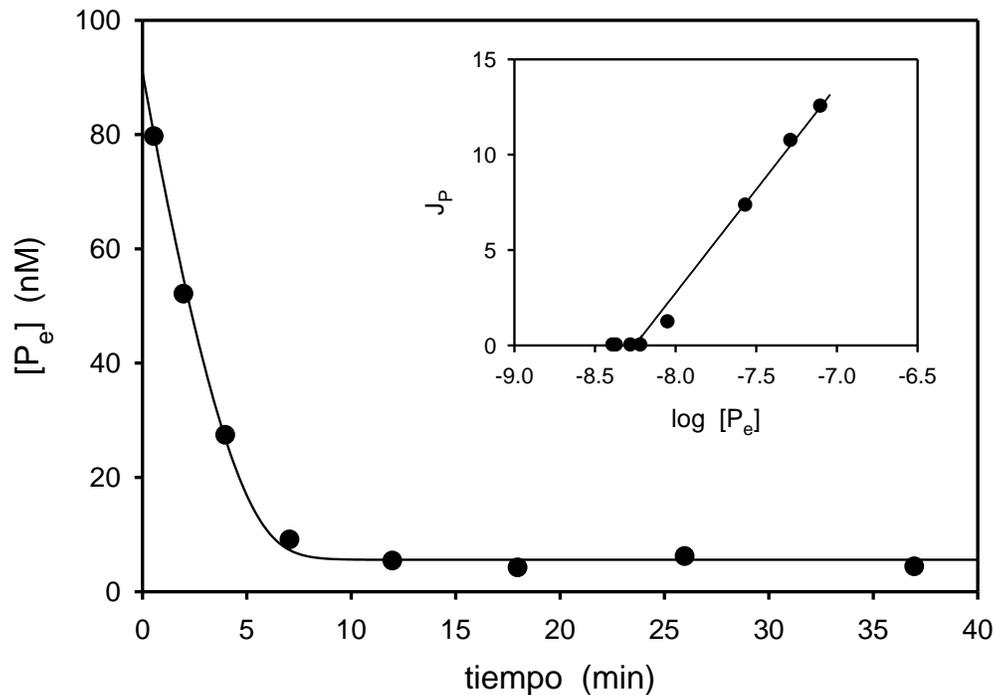


Fig. 22. Transcurso de la remoción de fosfato de una muestra premarcada de fitoplancton obtenida del Lago Rodó el 22 de enero. El contenido de *Clo a* de la muestra fue $91.5 \mu\text{g l}^{-1}$. Se siguió la incorporación neta mediante la disminución de la concentración externa de fosfato luego del agregado de 90 nM fosfato a la comunidad de fitoplancton. La curva representa el mejor ajuste computado usando la Eq. 3 ($L_p = 7.2 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 5.6 \text{ nM}$ fosfato, $r^2 = 0.998$). *Interno:* Regraficado semilogarítmico de los mismos datos. J_p esta dado en $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

Debido a que una pausa en el suministro de aguas subterráneas resultó en una activación de la capacidad de incorporación, fue interesante investigar cómo una reanudación de la descarga de agua podría alterar nuevamente los parámetros cinéticos y energéticos aparentes de la utilización de fosfato por la comunidad de fitoplancton. Un análisis computacional de la remoción de fosfato a lo largo del tiempo determinado el 21 de febrero (Fig. 23), reveló una nueva alteración de los parámetros de incorporación: el valor umbral aumentó a 10 nM fosfato y el coeficiente de conductividad disminuyó a $4.8 \mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$.

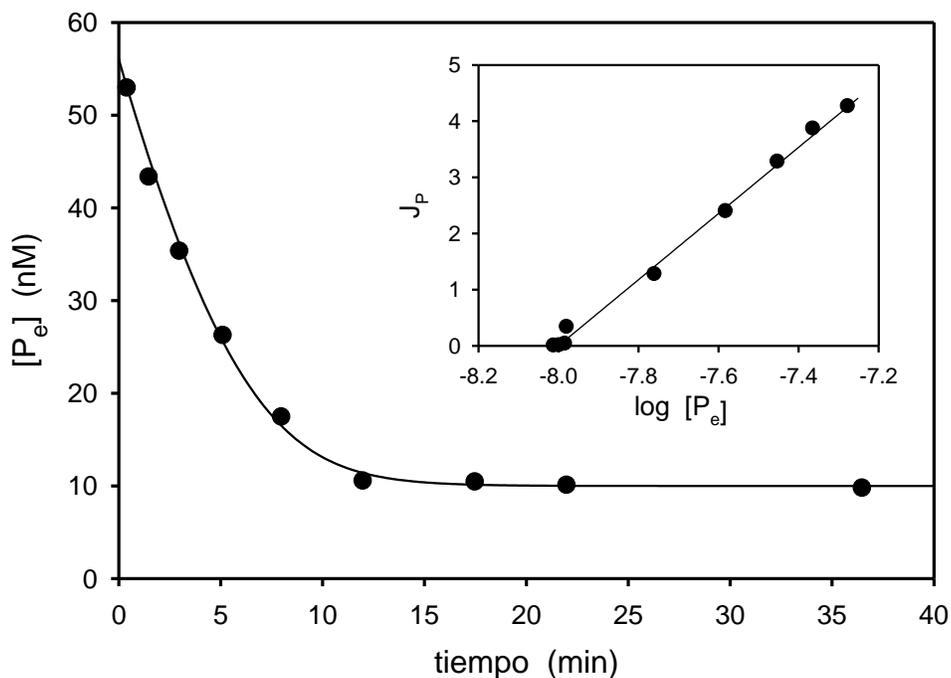


Fig. 23. Transcurso de la remoción de fosfato de una muestra premarcada de fitoplancton del Lago Rodó, obtenida el 21 de febrero. El contenido de Clo *a* de la muestra fue $104 \mu\text{g l}^{-1}$. La concentración inicial de fosfato fue cercana a 60 nM. La curva representa el mejor ajuste computado de los datos obtenido con la Eq. 3. ($L_p = 4.4 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 10 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.997$). *Interno:* Regraficado Thellier de los mismos datos mostrando una dependencia lineal de la tasa de incorporación en el logaritmo de la concentración. J_p está dado en $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

La actividad de incorporación de fosfato de la comunidad fitoplanctónica prevaleciente se acentuó dramáticamente al final del verano, cuando se interrumpió el sistema de suministro de agua subterránea durante seis semanas. En este caso, incluso un pulso con una concentración inicial de casi $1 \mu\text{M}$ fue rápidamente utilizado (Fig. 24), y sorprendentemente, la remoción de fosfato a lo largo del tiempo se ajustó a la función semilogarítmica, indicando que la validez de la relación lineal flujo-fuerza se extendió en un rango extremadamente amplio de concentración de casi dos ordenes de magnitud.

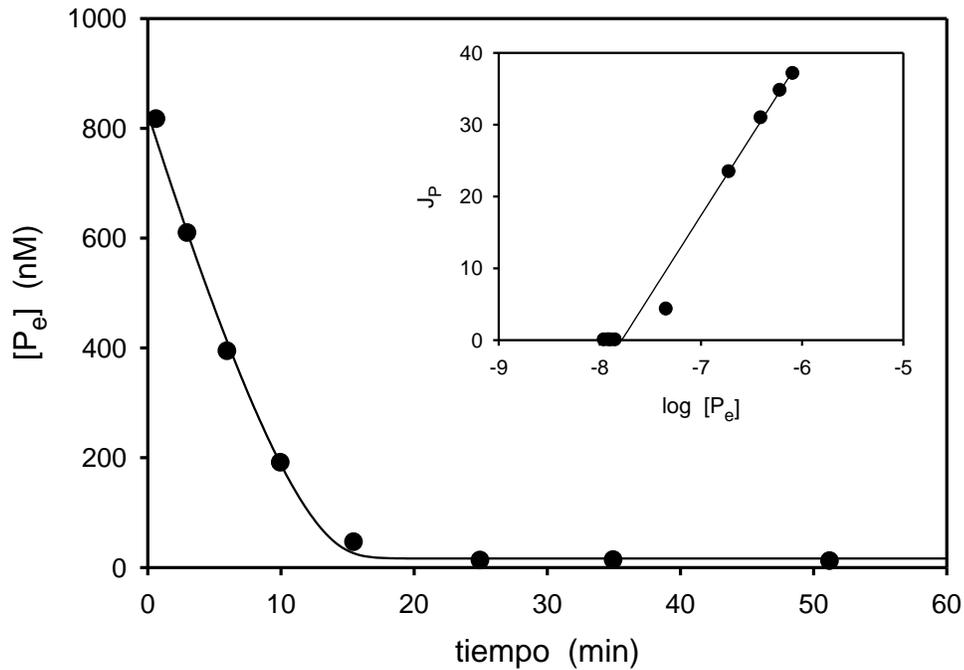


Fig. 24. Transcurso de la remoción de fosfato de una muestra premarcada de fitoplancton obtenida del Lago Rodó el 31 de marzo. Se agregó un pulso de concentración alta, cercano a $1 \mu\text{M}$ a la comunidad con $121 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$. El ajuste computado de los datos fue realizado con la Eq. 3 ($L_p = 19.4 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 16.5 \text{ nM}$ fosfato, $r^2 = 0.998$). *Interno:* Regraficado Thellier de los mismos datos mostrando una dependencia lineal de la concentración en la tasa de incorporación. J_p está dado en $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

Este tipo de análisis se realizó durante los cinco meses siguientes. Durante este período, la composición de especies del fitoplancton en la superficie varió considerablemente como puede ser visto en la tabla 2. Las constantes cinéticas obtenidas a partir del modelo flujo-fuerza y la bondad del ajuste del modelo se muestran en la tabla 4. La figura 25 muestra los valores umbrales y los correspondientes coeficientes de conductividad medidos durante este período y permite relacionar los cambios observados en estos parámetros con los períodos de descarga de agua subterránea en el lago.

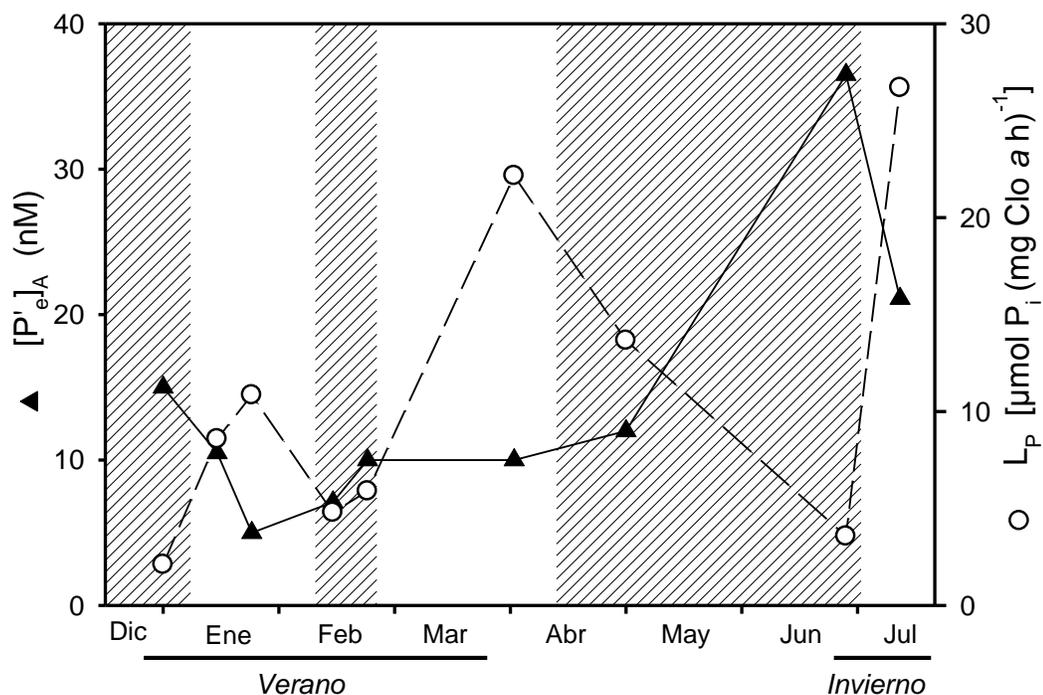


Fig. 25. Cambios en la actividad de incorporación de fosfato de comunidades fitoplanctónicas del Lago Rodó entre diciembre 1997 y julio 1998. La concentración umbral aparente $[P_e^i]_A$ (triángulos, escala izquierda) fue determinada por medición directa en las comunidades premarcadas y el coeficiente de conductividad respectivo L_P (círculos blancos, escala derecha) fue calculado de acuerdo a la Eq. 3 a partir de los transcurso de la remoción de fosfato. Los períodos de bombeo de agua subterránea al lago son representados en las áreas sombreadas.

Tabla 4. Constantes cinéticas del modelo flujo-fuerza obtenidas a partir del ajuste de las curvas de incorporación neta de fosfato por el fitoplancton del Lago Rodó. $[P_e]_{ini}$: concentración del pulso inicial de fosfato; $[P_e]_A$: concentración umbral observada; L_P : coeficiente de conductividad; $[P_e]_A$: concentración umbral esperada; r^2 : coeficiente de determinación.

| Muestreo | $[P_e]_{ini}$ (nM) | $[P_e]_A$ (nM) | L_p [$\mu\text{mol P(mg Clo h)}$] | $[P_e]_A$ (nM) | r^2 |
|--------------|-----------------------|-------------------|--|-------------------|-------|
| 30 diciembre | 60 | 14.7 \pm 1.47 | 2.11 | 14.6 | 0.996 |
| | 60 | 16.4 \pm 1.44 | 2.63 | 16.2 | 0.990 |
| 13 enero | 50 | 10.4 \pm 2.69 | 8.58 | 10.5 | 0.976 |
| 22 enero | 100 | 5.0 \pm 0.93 | 10.85 | 5.6 | 0.998 |
| | 100 | 6.2 \pm 2.13 | 11.26 | 6.8 | 0.993 |
| 12 febrero | 50 | 7.2 \pm 2.12 | 4.78 | 7.1 | 0.996 |
| 21 febrero | 60 | 10.2 \pm 0.35 | 5.89 | 10.0 | 0.997 |
| 18 marzo | 50 | 2.7 \pm 0.32 | - | - | - |
| 31 marzo | 50 | 5.1 \pm 1.20 | - | - | - |
| | 1000 | 10.2 \pm 0.79 | 22.20 | 16.5 | 0.998 |
| 29 abril | 1000 | 11.0 \pm 3.63 | 13.67 | 16.0 | 0.999 |
| | 700 | 16.5 \pm 1.96 | 10.35 | 19.1 | 0.999 |
| 25 junio | 120 | 32.9 \pm 3.32 | 3.57 | 34.6 | 0.985 |
| | 500 | 35.6 \pm 2.93 | 4.65 | 38.0 | 0.998 |
| 9 julio | 600 | 21.1 \pm 3.67 | 26.70 | 23.4 | 0.998 |
| | 600 | 28.6 \pm 4.19 | 33.79 | 31.5 | 0.998 |

3.2.4. *Estudios preliminares sobre el comportamiento adaptativo de comunidades naturales expuestas a un suministro fluctuante de fosfato*

Se realizaron experimentos en junio y julio de 1998 utilizando una estrategia experimental alternativa. Como fuera analizado previamente, la modificación de los valores umbrales y los correspondientes coeficientes de conductividad de las comunidades fitoplanctónicas, reflejaron claramente el aporte previo de fosfato hacia el

lago. De esta forma, fue interesante conocer si estos cambios adaptativos a las fluctuaciones de fosfato observados en escalas temporales de días a semanas y con modificaciones considerables de la composición específica de la comunidad, pudieran ser manifestados como propiedades inherentes a la misma comunidad en el transcurso de un mismo experimento. Para evitar que una determinada respuesta de la comunidad se deba a la saturación de la capacidad de incorporación, fue necesario controlar la concentración de organismos, de forma tal que la concentración agregada de fosfato sea la misma de acuerdo a la dilución aplicada a la suspensión de organismos (ej.: concentración agregada relativa a la concentración de Clo *a*). Una posibilidad es utilizar la misma agua del lago filtrada para diluir el fitoplancton. Una desventaja es que probablemente la filtración de un volumen determinado provoque la ruptura o lisis de algunos organismos (dada su alta abundancia), y por lo tanto aporte fosfato a la muestra filtrada impidiendo cuantificar la concentración final del nutriente. Fue necesario entonces experimentar con un medio de cultivo libre de fosfato y de composición química conocida para incubar la suspensión de fitoplancton.

Se experimentó con un medio de cultivo para cianobacterias (Kratz y Myers 1955) modificado con el objetivo de obtener una composición química aproximada al ambiente y a su vez libre de fosfato (medio LF, tabla 5 y 6).

Se centrifugó una muestra del Lago Rodó a 6000 r.p.m. durante 7 minutos y posteriormente el fitoplancton se resuspendió en el mismo volumen inicial utilizando el medio LF. Suponiendo que la perturbación ocasionada a los organismos fuera alta, se incubó la comunidad bajo condiciones controladas de temperatura (20 °C) durante más de 15 horas, para asegurar su aclimatación a las nuevas condiciones experimentales y poder evaluar su resistencia al tratamiento. Dado el prolongado período de incubación, fue necesario premarcar a los organismos con pulsos de mayor concentración, por dos razones principales: para evitar un aumento en la deficiencia del fitoplancton por el nutriente, y en segundo lugar, para marcar con el trazador la fracción más estable y de intercambio lento (polifosfatos), disminuyendo así el efecto del reflujo de fosfato no marcado que pudiese alterar la medición del valor umbral.

Tabla 5. Composición química del medio de cultivo LF utilizado en la resuspensión de la comunidad fitoplanctónica.

| Compuesto | mmol l ⁻¹ |
|--------------------|----------------------|
| NaNO ₃ | 7.05 |
| NaHCO ₃ | 3.75 |

| | |
|--|-------|
| KNO ₃ | 0.4 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0.122 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0.099 |
| EDTA | 0.037 |
| Na ₂ SiO ₃ 5H ₂ O | 0.572 |

Tabla 6. Comparación de las principales características físico-químicas entre el Lago Rodó y el medio de cultivo LF. El pH se ajustó con H₂SO₄ hasta el valor indicado

| | Conductividad (mS cm ⁻¹) | Alcalinidad (mg CaCO ₃ l ⁻¹) | pH |
|-----------|---|--|-----|
| Medio LF | 1.24 | 220 | 8.3 |
| Lago Rodó | 0.9 - 1.3 | 280 - 300 | 8.2 |

La pérdida de fitoplancton por este procedimiento fue menor a 20%, determinada por la diferencia entre la extracción de Clo *a* en el sobrenadante y la muestra original. Inmediatamente a la resuspensión en el medio, se premarcó e incubó una muestra tratada, con cuatro pulsos de 500 nM [³²P]fosfato, paralelamente a una muestra natural (control), con el objetivo de evaluar si la capacidad de incorporación pudiera verse alterada por el procedimiento aplicado, a través de diferencias en sus valores umbrales.

Luego de 24 horas de agregados los pulsos, incluidas 14 horas de fase oscura, las concentraciones umbrales obtenidas fueron 8.1 nM y 12.7 nM para la muestra tratada y control respectivamente. En la figura 26 se muestra el transcurso de tiempo de la remoción neta de fosfato luego del agregado de un nuevo pulso de alta concentración a una submuestra que previamente se diluyó 1:1 con el mismo medio LF.

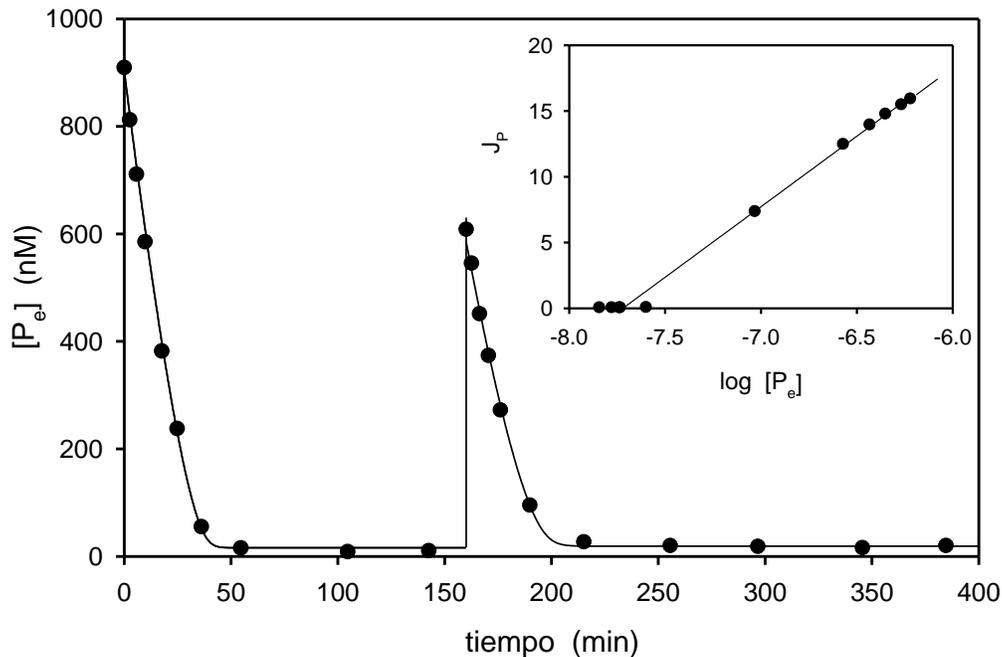


Fig. 26. Transcurso de la remoción neta de fosfato de una muestra de fitoplancton del Lago Rodó resuspendida en el medio LF y posteriormente premarcada. Se agregaron dos pulsos de alta concentración ($1 \mu\text{M}$ y 600 nM fosfato) a la suspensión de algas de $164 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$, luego de 24 horas. El ajuste computado de los datos se realizó con la Eq. 3 (primer pulso: $L_p = 7.82 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_{e,A}] = 16.0 \text{ nM}$ fosfato, $r^2 = 0.999$; segundo pulso: $L_p = 6.14 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_{e,A}] = 19.1 \text{ nM}$ fosfato, $r^2 = 0.999$). *Interno:* Regraficado Thellier de los datos del transcurso de incorporación obtenidos a partir del segundo pulso de fosfato. J_p está dado en $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

Posteriormente fue agregado un segundo pulso repitiéndose la incorporación del trazador. El comportamiento lineal determinado con el modelo flujo-fuerza reveló que los coeficientes de conductividad fueron similares en el transcurso de ambos pulsos (13.7 y $10.2 \mu\text{mol P}_i [\text{mg Clo } a \text{ h}]^{-1}$ respectivamente), así como los valores umbrales alcanzados. Estos resultados mostraron que el comportamiento de incorporación no sufrió alteraciones considerables por la perturbación ocasionada, permitiendo que la comunidad incorporara altas concentraciones del nutriente bajo estas condiciones experimentales.

Esta baja perturbación fue verificada posteriormente cuando se agregó un pulso de 120 nM fosfato seguido de otro cuatro veces superior, a una muestra del mismo lago a la que se le aplicó el mismo tratamiento que al experimento anterior (Fig. 27). Las cinéticas de incorporación fueron también similares, aunque los valores umbrales alcanzados fueron más altos que en otras ocasiones (37 nM fosfato, Fig. 27).

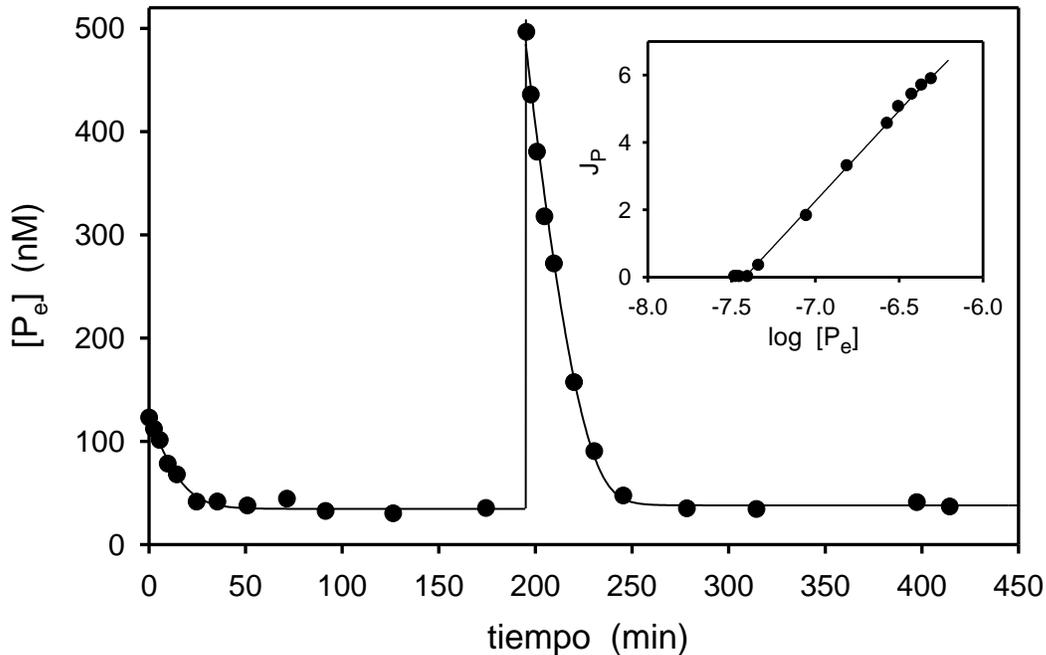


Fig. 27. Transcurso de la remoción neta de fosfato de una muestra de fitoplancton del Lago Rodó resuspendida en el medio LF y posteriormente premarcada. Luego de 24 horas, se agregaron 120 nM y 500 nM fosfato a la suspensión de algas con una concentración de Clo *a* igual a 164 $\mu\text{g l}^{-1}$. El ajuste computado de los datos fue realizado con la Eq. 3 (primer pulso: $L_p = 4.22 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 34.6 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.985$; segundo pulso: $L_p = 6.35 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 38.0 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.998$). *Interno:* Regraficado semilogarítmico de los datos del transcurso de incorporación obtenidos a partir del segundo pulso de fosfato. J_p está dado en $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$ y el logaritmo de la concentración externa de fosfato es expresado relativo a la unidad estándar de concentración.

La concentración umbral que se obtuvo luego de finalizado el premarcado fue igual a las que prosiguieron a los pulsos. Estos experimentos fueron realizados bajo condiciones de bombeo continuo de agua subterránea, lo que explicaría los altos valores umbrales hallados.

Como fuera demostrado previamente, la cianobacteria *A. nidulans* es capaz de adaptarse cinética y energéticamente en pocos minutos a cambios en el suministro de fosfato. Fue entonces interesante conocer si esta propiedad adaptativa manifestada por un organismo procariota unicelular "simple", pudiese ser compartida por una comunidad natural con diversos niveles de organización. Una respuesta similar a la obtenida con la cianobacteria se observó cuando se experimentó alterando la densidad de organismos de una comunidad fitoplanctónica del mismo lago. Se aplicó la misma estrategia experimental utilizada en los experimentos previos, a través de la resuspensión de una muestra del Lago Rodó en el medio LF. Posteriormente se procedió a premarcar la comunidad con 4 pulsos de 200 nM el día previo a la experiencia, y luego de 22 horas fue verificado que los organismos hubieran alcanzado el valor umbral. Se

procedió a dividir la muestra en dos submuestras, diluidas de forma tal que la cantidad de fosfato agregado externamente por unidad de biomasa fuera idéntico en ambos casos. Por consiguiente, la submuestra *A* contuvo $79 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$ y fue expuesta a una concentración inicial de 600 nM fosfato, mientras que la submuestra *B* fue diluida diez veces ($8 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}$) con el medio de cultivo LF, a partir de la submuestra *A* y recibiendo 60 nM fosfato. La figura 28 muestra cómo la comunidad con más concentración de organismos, que fue expuesta a las concentraciones más altas, incorporó rápidamente el nutriente de forma comparable a la tasa de remoción obtenida en el experimento de la figura 24.

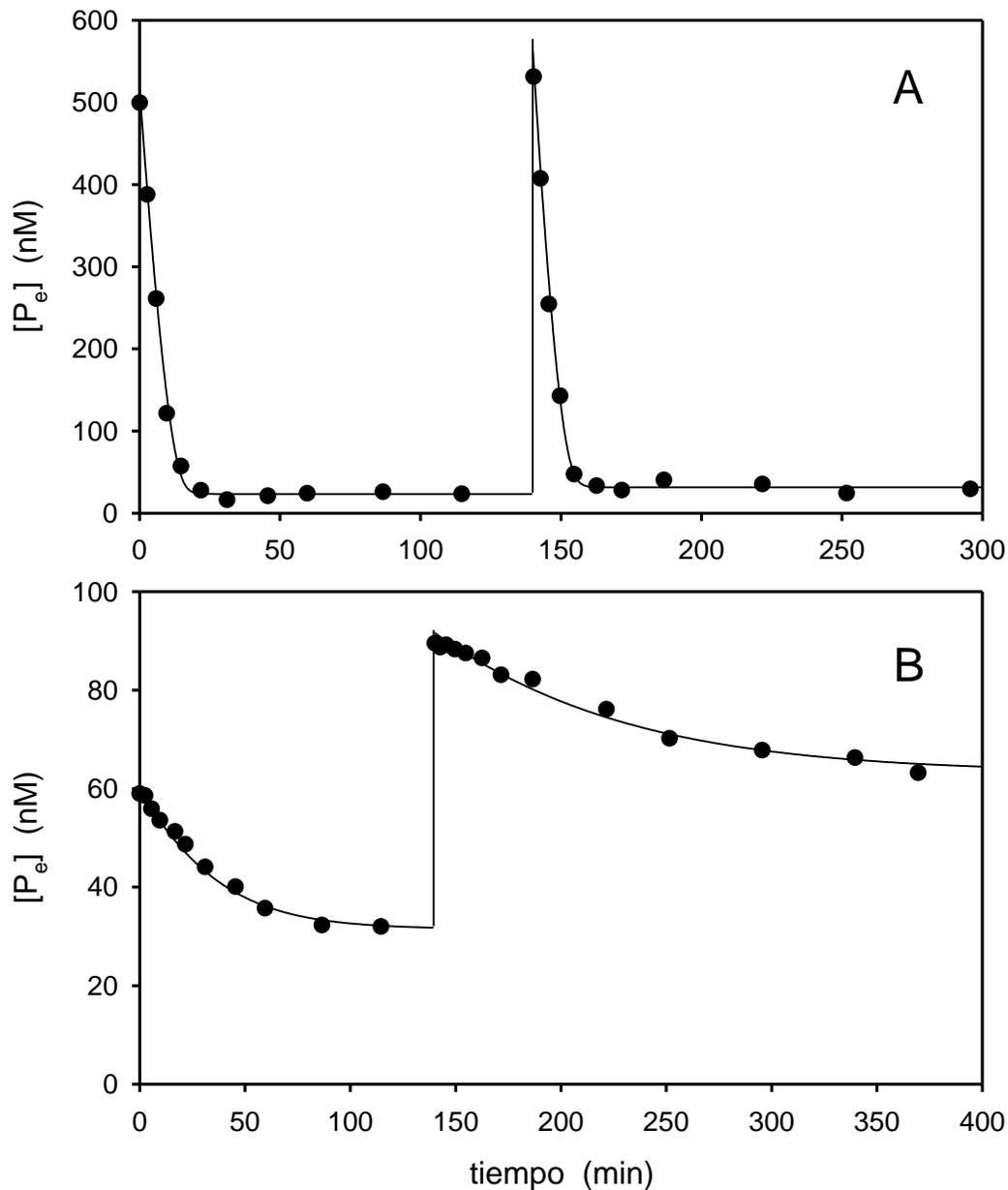


Fig. 28. Transcurso de la remoción neta de fosfato por el fitoplancton de dos submuestras diluidas con el medio LF, provenientes de la misma muestra original del Lago Rodó. La muestra fue resuspendida en el medio LF y posteriormente premarcada; luego de 22 horas, se dividió en dos submuestras (A y B). **A:** Absorción neta de fosfato luego del agregado de dos pulsos de 600 nM a una suspensión conteniendo $79 \mu\text{g Clo } l^{-1}$. El ajuste de los datos fue realizado con la Eq. 3 (primer pulso: $L_p = 15.2 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 23.4 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.998$; segundo pulso: $L_p = 19.3 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 31.5 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.998$). **B:** Absorción neta de fosfato luego del agregado de dos pulsos de 60 nM a una suspensión diluida diez veces ($8 \mu\text{g Clo } l^{-1}$) con respecto a la anterior suspensión. El ajuste de los datos fue realizado con la Eq. 3 (primer pulso: $L_p = 1.12 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 32.5 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.996$; segundo pulso: $L_p = 0.82 \text{ nM min}^{-1}$, $[P_e]_A = 63.2 \text{ nM fosfato}$, $r^2 = 0.982$).

En contraste, la misma comunidad con menor concentración de células detuvo la incorporación de fosfato a una concentración umbral de 31 nM mostrando una menor actividad. Luego de exponer las suspensiones de fitoplancton a un nuevo pulso de igual concentración, fue posible observar una nueva alteración en el coeficiente de conductividad así como en el valor umbral aparente de la suspensión *B*. El valor de L_p disminuyó de 19.3 a 14.1 $\mu\text{mol P}_i (\text{mg Clo } a \text{ h})^{-1}$, mientras que la concentración umbral aumentó de 32 nM a 63 nM fosfato para el primer y segundo pulso respectivamente. Comparativamente, los coeficientes de conductividad calculados a partir de las segundas adiciones, revelaron que el L_p de la comunidad *A* fue casi 2.5 veces mayor al de la suspensión *B*. Comparando la diferencia entre los valores umbrales se determinó que el fitoplancton de la dilución *B* incorporó dos veces menos fosfato que el de la comunidad más densa.

4. DISCUSIÓN

4.1. LA RESPUESTA DE LA CIANOBACTERIA *ANACYSTIS NIDULANS* A LAS FLUCTUACIONES DE FOSFATO REVELA SU FLEXIBILIDAD ADAPTATIVA

4.1.1. *Linealización del comportamiento de incorporación de fosfato de la población*

La cianobacteria *Anacystis nidulans* bajo condiciones de limitación de su crecimiento por fosfato, es capaz de utilizar concentraciones del nutriente extremadamente bajas sobre el valor umbral, dentro de un rango nanomolar de concentración (Fig. 5). Bajo condiciones de deficiencia por fosfato, el sistema de incorporación sufre una gran activación (Falkner et al. 1989), permitiendo que la cianobacteria incorpore altas concentraciones del nutriente, principalmente en forma de gránulos de polifosfato, fenómeno que es compartido por muchos otros microorganismos y conocido como “polyphosphate overplus phenomenon” (Liss & Langen 1962). Los valores umbrales observados en nuestro estudio, mediante medición directa o ajuste del modelo flujo-fuerza, fueron del mismo orden de magnitud que los encontrados en *Staurastrum luetkemullerii* y *Microcystis aeruginosa* (3 - 19 nM y 5 - 32 nM fosfato, Olsen 1989), así como en otras cianobacterias y otros grupos de algas (Admiraal & Werner 1983, Button 1985). Estos valores fueron similares también a los encontrados en estudios con poblaciones naturales de *Oscillatoria rubescens* (Falkner et al. 1984a) y poblaciones mixtas en lagos oligo-mesotróficos (Falkner & Falkner 1989, Istvánovics et al. 1994, Istvánovics & Herodek 1995).

Sin embargo, dicho valor de equilibrio no sería un parámetro poblacional estable, sino que fue modificado por las células de acuerdo a las variaciones respectivas de fosfato externo (ej.: Fig. 6 y 9). Cuando se incrementó la concentración de fosfato considerablemente sobre el valor umbral, la cianobacteria respondió mediante una alteración de las propiedades cinéticas y energéticas de su sistema de incorporación, resultando en valores umbrales elevados y en una linealización característica del comportamiento de incorporación (ej.: Fig. 7 y 9 *inserto*). Esta propiedad lineal fue mantenida por períodos prolongados, aunque no se agregaran nuevos pulsos de fosfato (Fig. 12), y dependiendo de una relación compleja entre el tiempo de exposición a las concentraciones elevadas y a la cantidad almacenada del nutriente, como fuera determinado en otros estudios con la misma cianobacteria (Falkner et al. 1989, Falkner et al. 1993, Falkner 1994, Wagner & Falkner 1992).

La densidad de organismos sería un factor determinante del cambio adaptativo, ya que en las poblaciones más diluidas, la disminución del fosfato externo se produce lentamente, permitiendo que las algas respondan mediante el ajuste de su sistema de incorporación (Fig. 9 y 11). Contrariamente, en las poblaciones más densas el fosfato externo disminuye rápidamente, evitando así que ocurran alteraciones del comportamiento de incorporación. De esta forma podemos excluir el efecto de un control simple mediado por la formación del producto, mostrando que las células tornaron obviamente a un estado adaptado (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995). Como fuera establecido en otros estudios, la eficiencia de la conversión de energía es mucho mayor en la forma lineal de operación que en las no

lineales (Stucki 1980, Stucki et al. 1983, Falkner et al. 1993). Esta adaptación dependió de la velocidad de disminución del fosfato externo, lo que a su vez estuvo determinada por la actividad de toda la población (Falkner et al. 1996). Una vez alcanzada la linealidad del comportamiento de incorporación, luego de la transición, el sistema de incorporación de los organismos se mostró altamente sensible. Este fenómeno se observó en el experimento de la figura 8, posterior a la preincubación, donde se observó un incremento subsecuente de $[P_e]_A$ luego de duplicar la concentración inicial. La obtención de dicha respuesta luego de 80 min, indica que la adaptación a las concentraciones elevadas de fosfato fue persistente y sensible a un nuevo cambio de concentración externa. Los valores umbrales variables observados en el experimento de las figuras 10 y 11, mostraron un “comportamiento abierto” de incorporación con múltiples posibilidades de respuesta a las nuevas fluctuaciones de concentración externa. Por lo tanto, bajo condiciones naturales de crecimiento, la organización del metabolismo celular puede, en cualquier momento, ajustarse a la situación ambiental prevaleciente.

Esta linealización del comportamiento de incorporación ocurre a corta escala temporal (minutos) (Fig. 9) y se debería a un cambio en el grado de acoplamiento entre la incorporación de fosfato y la energía disponible para este proceso, como fuera planteado en otras investigaciones (Wagner et al. 1994, Falkner et al. 1995). Sin embargo, en el transcurso de la adaptación a un suministro deficiente de fosfato en el medio de cultivo a largo plazo, fue demostrado por Wagner et al. 1994, que este evento no está restringido únicamente a cambios moleculares en el sistema de absorción de la membrana celular, sino que también es el resultado de cambios en las propiedades cinéticas y energéticas de la ATPsintetasa de la membrana tilacoide. Wagner & Falkner (1992) observaron una alteración en la estequiometría H^+/ATP en la fotofosforilación presente en tilocoides aisladas de *A. nidulans*, durante adaptaciones a diferentes niveles de fosfato en el medio de cultivo, y que bajo condiciones de crecimiento limitado por fosfato, el transporte del nutriente hacia la célula se encuentra acoplado a una ATPasa. Como fuera visto (Wagner et al. 1995), el cambio adaptativo se caracteriza por un proceso bifásico de incorporación, expresado por una transición lenta desde un estado inicial a otro final caracterizado por diferentes propiedades cinéticas. Las enzimas que presentan tales propiedades son conocidas como “histeréticas” (*hysteretic*) o “enzimas de memoria” (Frieden 1979, Neet & Ainslie 1980), y posteriormente fue demostrado que varias ATPasas presentan dichas propiedades (Grisar et al. 1978, Schobert & Lanyi 1989).

La base molecular del comportamiento adaptativo permanece aún confusa, aunque se han realizado estudios preliminares (Wagner et al. 1994, Falkner et al. 1998). La respuesta adaptativa estaría mediada por proteínas ligasas de alta afinidad por fosfato, como fuera visto por Wagner et al. (1994). Estos autores determinaron que luego de establecidas las condiciones de limitación del crecimiento por fosfato, *A. nidulans* sintetiza en pocas horas un tipo de proteína con propiedades de alta actividad ligasa por fosfato. Un estudio reciente (Falkner et al. 1998) realizado con una cepa mutante para el gen *sphX* (carente de dicha proteína), demostró que a pesar de poder incorporar fosfato a niveles nanomolares, la cianobacteria mutante es incapaz de adaptarse en pocos minutos a un incremento transitorio en la concentración externa de fosfato y por lo tanto sería incapaz de sobrevivir bajo condiciones naturales.

Sin embargo, Falkner et al. (1995) plantean las dificultades de una caracterización molecular responsable por esta flexibilidad adaptativa, dado que el sistema de incorporación también se adapta a las condiciones del test experimental, y por lo tanto, cambiará constantemente sus propiedades. Esta respuesta compleja se acentúa aún más cuando el fenómeno adaptativo deja de ser una propiedad objetiva de la célula y pasa a ser el resultado de la interacción de toda la población con su ambiente (Falkner et al. 1996).

Luego de alcanzar el estado adaptado, los organismos comenzarán a incorporar el nutriente con óptima eficiencia, resultando en valores umbrales elevados. Como fuera demostrado previamente, estas células habrán almacenado una menor concentración de polifosfatos, de modo que cabría esperar entonces un menor crecimiento posterior (Rhee 1973). Sorprendentemente, estudios recientes de la relación compleja entre la incorporación de fosfato y la fijación fotosintética de CO₂ por *A. nidulans* (Wagner et al. 1999), sugieren lo contrario. Wagner et al. (1999), mostraron que existen diferencias en la utilización del carbono intracelular entre las algas adaptadas y no adaptadas a las fluctuaciones de fosfato, y observaron que, previo a los pulsos, el CO₂ fue asimilado a compuestos de bajo peso molecular (LMWC, en inglés *low molecular weight compounds*) para su utilización inmediata y a compuestos de alto peso molecular (glicógeno, HMWC en inglés *high molecular weight compounds*) en forma equitativa. Luego de agregar 2.5 μM fosfato, 70 % del carbono asimilado se encontró en el *pool* de LMWC. Se obtuvieron resultados similares a nuestro estudio, cuando se agregó la misma cantidad de fosfato por célula a dos diluciones diferentes del mismo cultivo, indicando que la forma del suministro de fosfato determinaría potencialmente el metabolismo de carbono y posiblemente, el crecimiento subsecuente de la población (Wagner et al. 1999, Wagner et al. en revisión).

Como el valor umbral dependió de la tasa de disminución de la concentración externa de fosfato en el medio, fenómeno que a su vez está determinado por la actividad de la población, y dado que este valor es decisivo para determinar la cantidad de fosfato incorporado por célula, la población como un “todo” determinará el crecimiento subsiguiente de las células individuales y exhibirá, por lo tanto, un comportamiento “coherente” (Falkner et al. 1996, Wagner et al. 1999).

Las propiedades lineales de incorporación persistieron durante la división celular, indicando que la información acerca de la fluctuación de fosfato precedente fue transmitida a las células hijas (Fig. 12). Estos resultados indican que las propiedades del sistema de incorporación fueron independientes de la proliferación celular. Como se excluye una regulación simple y directa del transportador de fosfato mediada por el tamaño de los gránulos de polifosfato, investigaciones previas postularon que el sistema de incorporación debe tener algún tipo de capacidad de procesamiento de información, pudiendo “recordar” el patrón de pulsos durante los períodos donde no ocurre incorporación (Falkner et al. 1993, Falkner et al. 1996, Falkner et al. 1998, Wagner et al. 1995, Wagner et al. 1999). De acuerdo con los resultados obtenidos por Wagner et al. (1995), *Anacystis nidulans* estaría equipada con una estructura de “memoria,” y fue demostrado que esa información acerca de los pulsos previos, puede ser transferida a las generaciones subsiguientes. La capacidad de almacenar información estaría explicada por una

propiedad de la membrana citoplasmática: durante los pulsos se forman ensamblajes de traslocación de fosfato energéticamente distinguidos, que reflejan el suministro previo de fosfato en el ambiente, vía regulación de la tasa de incorporación (Falkner et al. 1998). Una base teórica para este fenómeno es analizada en detalle por Falkner et al. (1996), a través de la interacción de subsistemas convertidores de energía.

La alteración del sistema de recolección de energía lumínica, bajo diferentes condiciones nutricionales, ha sido extensamente estudiado en *A. nidulans* por Wanner et al. (1986) quienes observaron que la cianobacteria disminuye el contenido de clorofila y ficobilisomas, durante la privación por nitrógeno y azufre. Otros estudios (Coller & Grossman 1992, Falkner et al. 1996) indican la presencia de diferencias notorias en los espectros de absorbancia celular de los principales pigmentos fotosintéticos de la misma cianobacteria, entre el estado limitado y suficiente por fosfato. El primero, caracterizado por una baja fracción de los pigmentos accesorios como las ficobilinas, indispensables para la utilización de bajas intensidades de luz. Estas diferencias fueron observadas también en la cianobacteria filamentosa *Planktothrix agardhii* y proclorofita *Prochlorothrix hollandica* (Ducobu 1998b).

En el presente estudio, fue posible seguir estos cambios de sistema recolector de energía lumínica, durante la transición entre el estado de limitación del crecimiento y la fase correspondiente al inicio de la proliferación celular. Los espectros de absorbancia fueron normalizados a 750 nm debido a que se observaron cambios en las propiedades de dispersión de luz por las células durante el crecimiento (datos no mostrados), causado posiblemente por cambios en la ultraestructura celular (Wanner et al. 1986, Collier & Grossman 1992). Por consiguiente, el número celular no fue un buen sistema de referencia para la normalización de los datos. Similar a lo observado en este estudio, Collier & Grossman (1992) encontraron que *A. nidulans*, acumula Clo *a* durante las primeras 9 h y posteriormente disminuye su concentración, aunque en dicho estudio no se consideró que la acumulación de pigmentos fuera acompañada por un incremento en el volumen celular. El mismo comportamiento fue observado para la ficocianina, en contraste con los resultados obtenidos con otros nutrientes como nitrógeno y azufre, donde la acumulación de pigmentos inicial no fue observada (Grossman et al. 1994). La principal diferencia observada entre los estados de limitación del crecimiento y la proliferación celular, más allá de un incremento en la concentración de los principales pigmentos previo a la división celular, fue la absorbancia relativa entre los picos correspondientes a la ficocianina y la clorofila *a*. Durante el estado de limitación del crecimiento, el flujo de fotones estaría en exceso con respecto a las demandas metabólicas de la célula (Falkner et al. 1996). Si las células acumulasen cantidades considerables de fosfato, como para la producción de varias generaciones, no comenzarían a crecer hasta no haber reconstruido su aparato de recolector de luz (Wagner et al 1999 en revisión) (Fig. 11 y 13). Durante este período, la concentración de ficocianina se incrementa considerablemente. Como resultado, esta reorganización metabólica permitirá a la célula sustentar máximas velocidades de crecimiento. El regreso rápido a las condiciones iniciales de composición de pigmentos, al alcanzar progresivamente el estado estacionario de crecimiento, probablemente evitaría el exceso del flujo de electrones a través de los fotosistemas y por lo tanto, la producción de radicales de oxígeno tóxicos (Yokoyama et al. 1991, Collier et al. 1994).

Con respecto al comportamiento de crecimiento de *A. nidulans*, Falkner et al. (1996) definieron tres estados principales: primero, cuando el fosfato almacenado es escaso como para la formación de pocas divisiones, la linealización del comportamiento de incorporación no ocurre y el crecimiento subsiguiente sería lento y manteniendo el mismo sistema convertor de energía. Segundo, cuando ocurre una linealización transitoria de la tasa de incorporación, con escaso almacenamiento de polifosfato, el crecimiento posterior sería también lento y con el mismo sistema recolector de luz. Estas estrategias parecerían útiles, considerando el escaso fosfato almacenado, pues permitiría una utilización económica del nutriente durante un período de tiempo prolongado (Falkner et al. 1996). En tercer lugar, y correspondiéndose con nuestros resultados, si persistiese la linealización del comportamiento de incorporación, conjuntamente con un gran almacenamiento de fosfato en gránulos de polifosfato, los organismos comenzarían a crecer a una alta tasa luego de la reconstrucción del sistema convertidor de energía, bajo las condiciones ecológicas prevalecientes (Falkner et al. 1996, Wagner et al. 1999 en revisión). Cabe señalar que lo único invariable en torno a la reorganización metabólica, durante la transición entre el estado de no crecimiento y la proliferación celular, fue el modo lineal de operación (Fig. 12).

4.1.2. *Importancia biológica del comportamiento adaptativo*

Diferentes especies podrían diferir en su respuesta adaptativa frente a cambios ambientales y por consiguiente, en su capacidad de almacenar información acerca de fluctuaciones previas de fosfato (Wagner et al 1995). Olsen (1989) comparó las cinéticas de incorporación entre la clorofita *Staurastrum luetkemullerii* y la cianofita *Microcystis aeruginosa*, encontrando que esta última presentó una mayor tasa de incorporación de fosfato y por lo tanto, debería ser un mejor competidor por el recurso en el medio. Sorpresivamente, no se observó dicha situación en experimentos de competencia utilizando cultivos mixtos, en los que *S. luetkemullerii* tuvo una mayor tasa de crecimiento que la cianobacteria, cuando el nutriente fue suministrado continuamente y en bajas concentraciones. Cuando se modificó el suministro de fosfato de modo continuo a pulsos, *M. aeruginosa* respondió inmediatamente aumentando su densidad celular (Olsen et al. 1989). Los autores propusieron que el factor decisivo para obtener una incorporación neta positiva que determine el crecimiento, es el mantenimiento de una "concentración crítica" (o valor umbral), la que fue menor en *S. luetkemullerii* que en *M. aeruginosa*. De esta forma, la adaptación a las fluctuaciones debe ser un factor decisivo para la proliferación de algas en condiciones de limitación por fosfato y, en consecuencia, para la composición específica del fitoplancton (Falkner et al. 1995, Falkner et al. 1996).

Como se demuestra en esta investigación, un incremento prolongado en la concentración externa sobre el valor umbral, resulta en una transición característica del sistema de incorporación, manifestada por

un aumento de la concentración de equilibrio y una relación lineal entre el flujo neto y el logaritmo de la concentración externa. El tiempo necesario de persistencia de la fluctuación sobre el valor umbral para estimular dicha transición fue mayor a 10 minutos. Por lo tanto, esta transición histerética es dependiente de la concentración y del tiempo. En consecuencia, el valor umbral de la célula será el resultado de la interacción de toda la población con su ambiente (Falkner et al. 1995, Falkner et al. 1996). Una vez alcanzado el nuevo estado adaptado, la dependencia de la tasa de incorporación en la concentración obedeció la relación de flujo-fuerza dentro de un rango extenso de concentración.

La población algal adaptada muestra una gran flexibilidad adaptativa potencial de respuesta a las nuevas fluctuaciones de fosfato, como lo muestran los distintos valores umbrales alcanzados por los organismos dentro de un mismo experimento (Fig. 8 y 11). Esta flexibilidad demostrada en la modificación del comportamiento de absorción, estaría basada en la presencia de varios subsistemas de incorporación operando simultáneamente, con propiedades cinéticas distinguibles y diferentes grados de acoplamiento energético (Falkner et al. 1995, Wagner & Falkner 1992, Wagner et al. 1995). Como fuera postulado por los mismos autores, la tendencia a operar con óptima eficiencia cercano al equilibrio termodinámico, resultará en una adaptación de la constante de Michaelis al valor de equilibrio $[P_e]_A$, de tal forma que ambos deberán poseer el mismo orden de magnitud (ver sección 1.3.). El surgimiento de un nuevo estado adaptado conlleva la reorganización de estos subsistemas interactuantes y por lo tanto a la pérdida de su "independencia", para pasar a conformar una nueva unidad funcional (Falkner et al. 1996). Como consecuencia, se inicia una cascada de eventos de reorganización celular, los que involucran una utilización diferencial de CO_2 (Wagner et al. 1999), así como la reconstrucción del aparato recolector de energía lumínica, para culminar en el crecimiento algal masivo o floración.

De acuerdo con lo expuesto por Falkner et al. (1996), los valores umbrales altos son el resultado de un proceso de incorporación en el cual las propiedades de la célula individual se ajustan a los cambios de concentración externa, que son causados a su vez por la actividad de toda la población. Por lo tanto, bajo condiciones naturales de crecimiento, las poblaciones algales estarían continuamente expuestas a fluctuaciones de fosfato en su medio, operando entonces permanentemente en el "modo lineal" de incorporación.

Los resultados presentados aquí indican que el comportamiento adaptativo de absorción refleja una compleja interdependencia entre organismo, población y su ambiente respectivo, de modo tal que la organización del metabolismo celular puede, en cualquier momento, ajustarse a la condición ambiental prevaleciente. Un abordaje similar con poblaciones naturales en un lago, podría servir como una herramienta apropiada para interrogar *in situ* a una comunidad dada, acerca de su estado nutricional por fosfato, y consecuentemente, acerca de las fluctuaciones previas en su ecosistema acuático.

4.2. EL COMPORTAMIENTO DE INCORPORACIÓN DE FOSFATO DE COMUNIDADES FITOPLANCTÓNICAS EN LAGOS EUTRÓFICOS REFLEJA ALTERACIONES EN EL SUMINISTRO DE FOSFATO

4.2.1. *Respuesta adaptativa del fitoplancton a un suministro fluctuante de fosfato*

La utilización de la metodología de premarcado de comunidades naturales de fitoplancton con [^{32}P] fosfato, aplicada por primera vez en este estudio, permitió medir la incorporación neta de fosfato, y en consecuencia, una concentración umbral en la cual la comunidad en su conjunto cesa la absorción del nutriente. Estos valores umbrales del fitoplancton de los lagos Canteras y Rodó, fueron del mismo orden de magnitud con respecto a los obtenidos con la cianobacteria *A. nidulans* en el “modo lineal” de incorporación. Istvánovics et al. (1994) calcularon y extrapolaron valores de equilibrio similares para el Lago Erken, Suecia (9 - 40 nM fosfato), a partir de la determinación de las tasas de incorporación bruta y el ajuste del modelo flujo-fuerza, aunque no midieron directamente los valores umbrales. A través de este acercamiento, determinaron que la inestabilidad de la estratificación térmica presente en dicho lago aportó ortofosfato a la zona eufórica ($\approx 3 \text{ mg P m}^{-2} \text{ día}^{-1}$; Istvánovics et al. 1990, Pierson et al. 1992), lo que provocó una deficiencia por fosfato de moderada a baja (Istvánovics et al. 1992). Este estado nutricional del fitoplancton se evidenció por los bajos coeficientes de conductividad y los altos valores umbrales hallados, en contraste con la alta deficiencia por fosfato observada en el Lago Balaton, Hungría (Istvánovics & Herodek 1995). Comparativamente, los coeficientes de conductividad encontrados en los lagos Rodó y Canteras, fueron del mismo orden de magnitud que los hallados para el Lago Balaton, aunque los valores máximos de L_p encontrados en el Lago Rodó fueron dos veces superiores.

Los transcurros de remoción de fosfato obtenidos con comunidades naturales de fitoplancton de los lagos hipereutróficos estudiados, siguieron destacablemente bien la relación lineal de flujo-fuerza, en los rangos amplios de concentración utilizados. Investigaciones previas sobre la incorporación bruta de fosfato por comunidades naturales en lagos meso y oligotróficos, mostraron que el comportamiento lineal de absorción sería un fenómeno generalizado (Falkner & Falkner 1989, Istvánovics et al. 1993, Istvánovics et al. 1994, Istvánovics & Herodek 1995). Falkner & Falkner (1989) encontraron este peculiar comportamiento en experimentos con fitoplancton del Lago Irrsee, Austria, y aunque no midieron el valor umbral directamente, la aplicación de la relación flujo-fuerza les permitió calcular una “concentración de fosfato límite” (20 - 45 nM fosfato), donde la absorción del nutriente cesa, a partir de experimentos de incorporación bruta ([^{32}P] fosfato incorporado). Observaron un constante incremento del coeficiente de conductividad, lo que indicó un aumento en la deficiencia por fosfato, producido por una disminución progresiva de su concentración ambiental. Por lo tanto, la biomasa algal se sustentó por las fluctuaciones transitorias en la concentración externa de fosfato.

Si consideramos el coeficiente de conductividad como un indicador de la deficiencia por fosfato (Falkner et al. 1984a, b, Falkner et al. 1993, Istvánovics y Herodek 1995, Wagner et al. 1995), podemos concluir que la disminución observada de L_p en el Lago Canteras (Fig. 18) pudo ser atribuida a un aporte difuso de fosfato, posiblemente debido a la escorrentía producida por la lluvia del 10 de diciembre, lo que condujo a una desactivación de la capacidad de absorción de la comunidad prevaleciente. Esta hipótesis se apoya en las alteraciones de la actividad de incorporación encontradas en la comunidad fitoplanctónica del Lago Rodó durante exposiciones discontinuas de los organismos a altas concentraciones de fosfato, ocasionadas por el aporte de agua subterránea.

Aparentemente, el cese del flujo de nutrientes hacia el lago (enero de 1998) causó una deficiencia nutricional, y como consecuencia, una activación de los sistemas de incorporación de la comunidad respectiva. En general, el valor umbral aumentó y el coeficiente de conductividad disminuyó cuando el Lago Rodó recibió una entrada de nutrientes (Fig. 25). Los incrementos observados en los valores umbrales durante el período de estudio, no podrían ser explicados por el agotamiento de la capacidad de incorporación de la comunidad, y que por esta razón la concentración externa permaneciera en un valor más alto. En dicho caso, no hubiera ocurrido incorporación luego del último agregado de fosfato en el experimento de la figura 21 A. Cuando la descarga de agua subterránea fue interrumpida, se observó una tendencia opuesta con respecto a los parámetros de incorporación. En este caso, un incremento pronunciado del coeficiente de conductividad de la comunidad fue acompañado por una disminución del valor umbral. Debe mencionarse que durante el período comprendido entre diciembre y julio, la concentración de ortofosfato fue tan baja que no pudo ser determinada apropiadamente por el método convencional de molibdato. Incluso, en los períodos de flujo constante de agua hacia el lago, la comunidad de fitoplancton permaneció en un estado deficiente por fosfato y fue siempre capaz de utilizar cualquier incremento en la concentración externa de fosfato sobre el valor umbral. De este modo, los métodos de análisis químico no podrían proporcionar una información adecuada acerca de la dinámica en el suministro del nutriente en este sistema acuático. Sin embargo, los cambios observados en la actividad de incorporación reflejaron claramente las descargas de nutrientes en el lago. Podemos concluir entonces que el análisis de la actividad de incorporación del fitoplancton mediante la relación flujo-fuerza, es una herramienta apropiada para monitorear la entrada de fosfato a un lago, bajo condiciones donde los métodos analíticos convencionales fallan.

A pesar de ocasionar cierta perturbación a la comunidad natural por la estrategia experimental utilizada (ver sección 3.2.4.), no se observaron alteraciones apreciables en la actividad de incorporación de fosfato en estos experimentos. Se obtuvieron valores umbrales estables y coeficientes de conductividad similares luego de cada pulso de fosfato, comportamiento similar al obtenido con comunidades provenientes del mismo lago. En este caso, el comportamiento de incorporación fue también independiente del *pool* de polifosfatos y de la concentración inicial, como fuera visto en cultivos mono-específicos de *A. nidulans*. De esta forma, fue posible determinar en forma reproducible el valor umbral de las comunidades fitoplanctónicas, gracias a la baja perturbación ocasionada a los sistemas de incorporación de alta afinidad por fosfato (Fig. 17, 19, 26, 27).

Sin embargo, como fuera demostrado para cultivos de *A. nidulans*, el valor umbral no sería una propiedad estable del sistema de incorporación, sino que estaría bajo influencia de la densidad de organismos y por consiguiente, de la persistencia del incremento de concentración sobre el valor umbral en el ambiente (Falkner et al. 1996, Falkner et al. 1995, Wagner 1995). Cuando se experimentó modificando la densidad de organismos, la comunidad fitoplanctónica mostró una relación compleja entre la concentración externa del nutriente y la densidad de microalgas, similar a la encontrada en cultivos de *Anacystis nidulans* (ej.: Fig. 9), así como en otros estudios realizados con la misma cianobacteria (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995). La respuesta obtenida luego de agregar la misma cantidad de fosfato en relación a la dilución realizada a la comunidad, no se debió a un posible efecto a través de la saturación de la capacidad de incorporación del fitoplancton. (Fig. 28 B). Sin embargo, estos resultados muestran que hubo una modificación de las propiedades de incorporación de la comunidad con menor concentración de organismos. Basándonos en los resultados obtenidos con la cianobacteria, la prolongada exposición de la comunidad al fosfato externo por encima del valor umbral sería el factor determinante del cambio de las propiedades de incorporación. Como fuera visto también en cultivos de *A. nidulans*, la suspensión de organismos más densa incorporó el nutriente rápidamente, de modo tal que los cambios en el comportamiento de incorporación no habrían tenido lugar. Aparentemente, la actividad de incorporación de la suspensión fitoplanctónica más concentrada permaneció en el estado más activo, resultando en valores umbrales más bajos. A diferencia de lo encontrado en los experimentos con *A. nidulans* (Fig. 9; Fig. 10 y 11), la curva de remoción de fosfato por la suspensión A (más concentrada) siguió la relación de flujo-fuerza. Esta alta actividad de incorporación pudo ser observada en los experimentos anteriores donde la comunidad fue expuesta, incluso, a altas concentraciones de fosfato externo sin registrarse cambios importantes en los valores umbrales y los coeficientes de conductividad respectivos (ej.: Fig. 22, 26 y 27).

Estos resultados apoyan la hipótesis de Wagner et al. (1995), quienes plantean que si la concentración de fosfato externo excediera el valor umbral de forma intermitente y por períodos cortos, parecería útil para los organismos tomar el nutriente a una velocidad alta. Si de algún modo la concentración de fosfato externo alcanzara niveles apreciablemente superiores al valor umbral, y por períodos prolongados de tiempo, la actividad de los sistemas de incorporación se adaptarían temporalmente, ajustados a la nueva situación de crecimiento, donde el flujo conforma los requerimientos nutricionales de la célula. Este fenómeno adaptativo pudo ser identificado durante el monitoreo de la actividad de incorporación en el Lago Rodó, especialmente al final del período prolongado de descarga de aguas enriquecidas, cuando se registraron los valores umbrales más altos correspondiéndose con bajos coeficientes de conductividad (Fig. 25). De acuerdo con estos resultados preliminares, el valor umbral de la comunidad estaría influido por la concentración de organismos, y por lo tanto dependería de la estabilidad temporal de la concentración externa del nutriente. De esta forma, los microorganismos ajustarían sus características de incorporación a las fluctuaciones ambientales de fosfato, de forma tal que la remoción del nutriente provocada por toda la comunidad, siempre proceda con óptima eficiencia, mediante la disminución de la actividad del transporte resultando en valores umbrales

elevados (Falkner et al. 1989). Debido a las implicancias del comportamiento adaptativo observado y a su carácter inusitado, será necesario profundizar en futuras investigaciones antes de poder generalizar acerca de esta respuesta adaptativa de un ensamblaje multiespecífico en un ambiente fluctuante. Sin embargo, es posible aventurar algunas implicancias de este fenómeno adaptativo en el marco de la discusión acerca de la competencia por recursos.

La teoría de competencia por recursos se define como la depresión de la tasa reproductiva del competidor debido al consumo, y por lo tanto, al agotamiento de los recursos compartidos (Hardin 1960, Tilman 1982). Sin embargo, las comunidades fitoplanctónicas mantienen una alta diversidad específica, característica que fue denominada "paradoja del plancton" por Hutchinson (1961), cuestionando el principio de exclusión competitiva. En apoyo a la teoría de competencia, Sommer (1984) planteó la existencia de diferentes estrategias competitivas basándose en las cinéticas de incorporación específicas y en experimentos biespecíficos en quemostatos. Sommer (1984) concluyó que los organismos "competitivamente exitosos" poseen altos cocientes V_{\max}/K_s de las constantes de Michaelis, por lo que tenderán a reducir la concentración de fosfato externo por debajo de la capacidad de incorporación de otros organismos con menor afinidad. Estas especies con menor afinidad desaparecerán gradualmente (Sommer 1984, Spijkerman & Coesel 1997), de modo que una especie excluirá competitivamente a la otra (Kilham & Kilham 1980). Sin embargo, Reynolds (1988) no encontró una separación clara entre algas con distintas estrategias adaptativas en relación a su afinidad por fosfato. Istvánovics y Herodek (1995) discuten la validez de los resultados de competencia obtenidos con experimentos mixtos cuando se los extrapola al ambiente natural, argumentando que la exclusión competitiva pudo haberse producido por tratarse de muestras cerradas donde se interrumpió el principal suministro de fosfato *in situ*, o en ambientes perfectamente homogéneos donde la tasa de suministro de fosfato fue constante o muy baja para mantener las concentraciones por encima de los valores umbrales (Olsen et al. 1989). La reducción de los valores umbrales a niveles más bajos de concentración (ej.: < 10 nM), es "costoso" en términos energéticos (Falkner et al. 1989). Estudios realizados en el Lago Obertrumsee, Austria, durante una floración algal de *Oscillatoria rubescens* (Falkner et al. 1984a, b), demostraron que la cianobacteria mantuvo su crecimiento a medida que fue capaz de compensar la disminución de la concentración de fosfato en el lago, a través de una reducción mayor del valor umbral. Estos autores observaron un continuo descenso del valor umbral extrapolado de 182 nM fosfato, alcanzando 8 nM fosfato cuando finalizó la floración de cianobacterias. Posteriormente, la concentración ambiental disminuyó inclusive por debajo de este valor, conduciendo a la desaparición de la población (Falkner et al. 1984a). Según Istvánovics & Herodek (1995), en ambientes deficientes por fosfato, cada especie de fitoplancton debería estar "adaptada en afinidad" y las diferencias interespecíficas deberían manifestarse en relación a la sensibilidad a las fluctuaciones ambientales, al grado de pérdida de fosfato por las células y mantenimiento de las cuotas celulares.

En un trabajo reciente, Reynolds (1998) plantea que la influencia de la competencia interespecífica en la estructuración de las comunidades es débil, y postula que las perturbaciones ambientales son los principales factores que mantienen una alta diversidad biológica, muy lejos de los estados de exclusión

competitiva. En concordancia con el presente estudio, en un ambiente altamente dinámico y heterogéneo, donde se producen aportes de fosfato puntuales y por períodos cortos, no sería la alta afinidad lo que proporcionaría una ventaja competitiva, sino la habilidad de las especies de ajustar, cinética y energéticamente, la actividad de incorporación a estas fluctuaciones rápidas de fosfato (Falkner et al. 1995, Falkner et al. 1996, Wagner et al. 1995, Istvánovics et al. 1994, Istvánovics & Herodek 1995).

Sommer (1999) propone nuevamente que la biodiversidad del fitoplancton no necesita ser explicada por factores externos, sino que se puede basar en los procesos de competencia en si mismos. Acompañando esta hipótesis, Huisman & Weissing (1999) presentaron un modelo asumiendo que el ambiente es homogéneo y que el crecimiento específico obedece la ecuación de Monod y por lo tanto, la función irreversible de Michaelis-Menten (ver sección 1.3). Sin embargo, parece difícil predecir el mantenimiento de la biodiversidad del fitoplancton, cuando aún no se ha esclarecido el comportamiento de incorporación de un nutriente limitante por una comunidad natural y cómo estas poblaciones responden a las perturbaciones en el suministro del recurso compartido.

Los experimentos realizados en el presente estudio muestran que las comunidades presentaron valores umbrales temporalmente estables y en algunos casos dicha concentración fue elevada. Por lo tanto, se descartaría la hipótesis de un grupo fitoplanctónico cuya actividad de incorporación de fosfato tienda a agotar el recurso en el medio. Otra evidencia se basa en la propiedad potencial manifestada por la comunidad de alcanzar diferentes valores umbrales (Fig. 28).

De acuerdo con los principios de termodinámica lejana al equilibrio, una dependencia lineal de las tasas de reacciones sobre las fuerzas conductoras debería ser válida únicamente cercana al equilibrio. La extensión lineal observada en regiones lejanas al equilibrio, puede ser explicada solamente por una regulación especial del comportamiento de incorporación de fosfato de la comunidad en su totalidad. Un prerrequisito necesario para que ocurra esta linealidad, es 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 (Falkner et al. 1995, Wagner et al. 1995, Fig. 2). Cabe señalar que los requerimientos regulatorios necesitados para esta extensión de la linealidad fueron colmados, a pesar de las diferencias en la estructura y composición taxonómica de las comunidades. La explicación más parsimoniosa para esta cinética uniforme de incorporación, es que las especies individuales de la comunidad deben compartir las mismas propiedades cinéticas y energéticas, como resultado de un proceso de mutuo ajuste. Por lo tanto, estas especies desarrollaron un comportamiento coherente de incorporación con respecto al valor umbral. Si este no fuera el caso, por ejemplo: si una porción considerable de la comunidad incorporase fosfato a concentraciones altas sobre el valor umbral medido, la remoción de fosfato en función del tiempo, en particular la obtenida con los pulsos más altos, sería mucho más compleja y no se podría ajustar a la función logarítmica simple empleada (Wagner et al. en revisión). Siguiendo esta línea de argumentación, si un conjunto multiespecífico posee la facultad de ajustar mutuamente sus propiedades de incorporación, cabría

esperar que estos organismos actúen como un sistema autoreferencial (Falkner et al. 1996), y por lo tanto puedan adaptarse a los incrementos transitorios en la concentración externa de fosfato sobre el valor umbral.

Una de las evidencias directas acerca de una posible respuesta adaptativa de la comunidad surge de las diferencias en L_p obtenidas en el fitoplancton del Lago Canteras (Fig. 18). Por otro lado, la composición y biomasa específica del fitoplancton del Lago Rodó durante los muestreos realizados en marzo, abril y junio, fueron similares (Tabla 3), a pesar de que el aporte de fosfato al lago sufrió alteraciones extremas. Sin embargo, las características de incorporación en dichas ocasiones mostraron relaciones opuestas en L_p y $[P_e]_A$. En tercer lugar, el experimento de la figura 28 muestra como la misma comunidad se adapta a la modalidad del suministro de fosfato a través de la modificación de sus propiedades de incorporación.

Postulamos entonces que los cambios en los parámetros cinéticos y energéticos observados en el Lago Rodó reflejan un evento adaptativo manifestado por toda la comunidad. Debido a esta facultad adaptativa, las propiedades de incorporación de la comunidad respectiva fueron ajustadas a la situación prevaleciente del nutriente en el medio, aunque la composición taxonómica de la misma cambiara durante ese período. De esta forma, la regulación de la respuesta adaptativa y la evolución hacia la linealidad se mostraron marcadamente invariables, independientemente de los elementos constitutivos de la comunidad fitoplanctónica.

Los cambios observados en los parámetros cinéticos y energéticos de la comunidad, son un claro ejemplo de la complejidad de las relaciones interespecíficas en ecosistemas acuáticos. Estudios futuros serán necesarios para determinar si comunidades fitoplanctónicas deficientes por fosfato poseen la facultad de sobrellevar un evento adaptativo, como respuesta a alteraciones transitorias en la concentración externa de fosfato. Diferentes grupos del fitoplancton bajo condiciones variables de deficiencia por fosfato, podrían diferenciarse en su sensibilidad a las fluctuaciones ambientales y por lo tanto en su capacidad de utilización de un recurso limitante. Por lo tanto un enfoque experimental similar al propuesto en esta tesis, podría aportar nuevos conocimientos acerca de las relaciones interespecíficas complejas en ambientes acuáticos y acerca del rol de la capacidad adaptativa a las fluctuaciones de fosfato en la estructura y funcionamiento de una comunidad con alta diversidad biológica.

5. CONCLUSIONES

5.1. INCORPORACIÓN DE FOSFATO POR LA CIANOBACTERIA *A. NIDULANS*

- ▶ El factor determinante de la adaptación cinética y energética dependió del tiempo durante el cual las algas estuvieron expuestas a concentraciones externas por encima del valor umbral y por lo tanto, de la concentración de organismos.

- ▶ Este proceso adaptativo esta determinado por la actividad de toda la población.
- ▶ Una vez alcanzada la linealización, el sistema de incorporación se mostró altamente sensible, con múltiples posibilidades de respuesta a las nuevas fluctuaciones lo que resultó en valores umbrales variables o “comportamiento abierto”.
- ▶ Las nuevas propiedades de incorporación persistieron por varias horas, inclusive fueron compartidas por las células hijas una vez iniciado el crecimiento. Por lo tanto, esta propiedad es independiente de la proliferación celular.
- ▶ La reorganización del sistema de recolección de energía lumínica se manifestó en un aumento de la absorbancia de los principales pigmentos fotosintéticos, preponderantemente las ficobilinas y clorofila *a*, previo al inicio de la división celular.

5.2. INCORPORACIÓN DE FOSFATO POR COMUNIDADES DE FITOPLANCTON

- ▶ El transcurso de la remoción de fosfato por las comunidades fitoplanctónicas de los lagos estudiados, se ajustó destacablemente bien a la relación lineal de flujo-fuerza, en los rangos de concentración evaluados.
- ▶ La comunidad presentó una cinética de incorporación uniforme, lo que indica que las especies constitutivas desarrollaron un comportamiento coherente de incorporación con respecto al valor umbral.
- ▶ Los cambios observados en la actividad de incorporación de fosfato por el fitoplancton, reflejaron claramente las descargas de nutrientes en el lago.
- ▶ La regulación de las propiedades de incorporación y la evolución hacia la linealidad fueron marcadamente invariables, independientemente de los elementos constitutivos de la comunidad fitoplanctónica.
- ▶ El análisis de la actividad de incorporación neta del fitoplancton mediante la relación flujo-fuerza, es una herramienta apropiada para monitorear la entrada de fosfato a un lago, bajo condiciones donde los métodos analíticos convencionales fallan.

6. BIBLIOGRAFÍA

ADMIRAAL, W. & WERNER, D. (1983). Utilization of limiting concentrations of orthophosphate and production of extracellular organic phosphates in cultures of marine diatoms. *Journal of Plankton Research* 5: 495-513.

BEGON, M., HARPER J. L., TOWNSEND, C. R. (1990). *Ecology. Individuals, populations and communities.* Blackwell Scientific Publications, Boston, Oxford, London.

- BUTTON, D. K., DUNKER, S. S. & MORSE, M. L. (1973). Continuous culture of *Rhodotorula rubra*: kinetics of phosphate uptake, inhibition, and phosphate-limited growth. *Journal of Bacteriology* 113: 599-611.
- BUTTON, D. K. (1985). Kinetics of nutrient-limited transport and microbial growth. *Microbiology Review* 49: 270-297.
- BUTTON, D. K., DUNKER, S. S. & MORSE, M. L. (1985). Continuous culture of *Rhodotorula rubra*: kinetics of phosphate uptake, inhibition, and phosphate-limited growth. *Journal of Bacteriology* 13: 599-611.
- COLLIER, J. L. & GROSSMAN, A. R. (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *Journal of Bacteriology* 174: 4718-4726.
- COLLIER, J. L., HERBERT, S. K., FORK, D. C. & GROSSMAN, A. R. (1994). Changes in the cyanobacterial photosynthetic apparatus during acclimation to macronutrient deprivation. *Photosynthesis Research* 42: 173-183.
- DROOP, M. R. (1973). Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology* 9: 264-272.
- DROOP, M. R. (1974). The nutrient status of algal cells in continuous culture. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 54: 825-855.
- DUCOBU, H. (1998a). The ecophysiology of a prochlorophyte and a cyanobacterium with emphasis on phosphorus metabolism. PhD thesis, Laboratory of Microbiology, University of Amsterdam.
- DUCOBU, H. (1998b). Induction of a high-affinity phosphate-binding protein in *Prochlorothrix hollandica* and alteration of the photosynthetic pigment composition in *Prochlorothrix hollandica* and *Planktothrix agardhii* under phosphorus limitation. En: *The ecophysiology of a prochlorophyte and a cyanobacterium with emphasis on phosphorus metabolism*, 5: 63-77. PhD thesis, Laboratory of Microbiology, University of Amsterdam.
- EINSELE, W. (1941). Die Umsetzung von zugeführtem, anorganischen Phosphat im eutrophen See und ihre Rückwirkungen auf seinen Gesamthaushalt. *Zeitschrift für Fischerei und deren Hilfswissenschaften* 39: 407-488.
- FALKNER, G., STRASSER, P. & GRAFFIUS, D. (1984a). Phosphate uptake by blue-green algae during an algal bloom. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 22: 195-199.
- FALKNER, G., STRASSER, P. & GRAFFIUS, D. (1984b). Phosphate uptake by blue-green algae in vitro and in a lake during an algal bloom: Useful application of a force-flow relationship. *Hydrobiologia* 108: 265-271.
- FALKNER, G., FALKNER, R. & SCHWAB, A. (1989). Bioenergetic Characterization of transient state phosphate uptake by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology* 152: 353-361.
- 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, G., FALKNER, R. & WAGNER, F. (1993). Adaptive phosphate uptake behaviour of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*: analysis by a proportional flow-force relation. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 316: 784-787.
- FALKNER, G., WAGNER, F. & FALKNER, R. (1994). On the relation between phosphate uptake and growth of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 317: 535-541.

- FALKNER, G., WAGNER, F., SMALL, J.V. & FALKNER, R. (1995). Influence of fluctuating phosphate supply on the regulation of phosphate uptake by the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Journal of Phycology* 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 Biotheoretica* 44: 283-299.
- 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.
- FRIEDEN, C. (1979). Slow transitions and hysteretic behavior in enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 48: 471-489.
- GIBSON, C. E. & SMITH, R. V. (1982). Freshwater Plankton. En: Carr, N. G. & Whitton, B. A. (eds.). *The biology of cyanobacteria*, pp. 463-90. Blackwell, Oxford.
- GIMMLER, H. (1976). Phosphorylation in vivo. En: Trebst, A. & Avron, M. (eds.). *Photosynthetic Transport and Photophosphorylation*, *Encyclopedia of Plant Physiology* 5. Springer-Verlag, Berlin. pp. 448-472.
- GRISAR, T., FRERE, J. M., GRISAR-CHARLIER, J., FRANCK, G. & SCHOFFENIELS, E. (1978). Synaptosomal Na⁺, K⁺-ATPase is an hysteretic enzyme. *FEBS Letters* 89: 173-176.
- GROSSMAN, A. R., SCHAEFER, M. R., CHIANG, G. G. & COLLIER, J. L. (1994). The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. En: Bryant D. A. (eds.) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp. 641-675. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- GUILLARD, R. R. L. (1978). Counting Slides, En: Sournia, A. (ed.), *Phytoplankton Manual*, pp. 182-190. Unesco, Paris.
- HARDIN G. (1960). The competitive exclusion principle. *Science* 131: 1292-1297.
- HEALEY, F. P. (1982). Phosphate. En: Carr, N. G. & Whitton, B. A. (eds.). *The biology of cyanobacteria*, pp 105-124. *Botanical Monographs*. 19. Blackwell, Oxford.
- HUISMAN, J. & WEISSING, F. J. (1999). Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature* 402: 407-410.
- HUTCHINSON G. E. (1961). The paradox of the plankton. *American Naturalist* 95: 137-147.
- ISTVÁNOVICS, V., PETTERSSON, K. & PIERSON, D. (1990). Partitioning of phosphate uptake between different size groups of planktonic microorganisms in Lake Erken. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie* 24: 231-235.
- ISTVÁNOVICS, V., PETTERSSON, K., RODRIGO, M. A., PIERSON, D., PADISÁK, J. & COLOM, W. (1993). *Gloeotrichia echinulata*, a colonial cyanobacterium with a unique phosphorus uptake and life strategy. *Journal of Plankton Research* 15: 531-552.
- ISTVÁNOVICS, V., PADISÁK, P., PETTERSSON, K. & PIERSON, D. C. (1994). Growth and phosphorus uptake of summer phytoplankton in Lake Erken (Sweden). *Journal of Plankton Research* 16:1167-1196.
- ISTVÁNOVICS, V. & HERODEK, S. (1995). Estimation of net uptake and leakage rates of orthophosphate from ³²P-uptake kinetics by a linear force-flow model. *Limnology and Oceanography* 40: 17-32.
- KILHAM, P. & KILHAM, S. S. (1980). The evolutionary ecology of phytoplankton. En: Morris, I. (ed.). *The physiological ecology of phytoplankton*, pp. 571-597. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- KRATZ, W. & MYERS, J. (1955). Nutrition and growth of several blue-green algae. *American Journal of Botany* 42: 282-287.
- KUHL, A. (1974). Phosphorus. En: Stewart, W. D. P. (ed.). *Botanical monographs*, vol. 10. Algal physiology and biochemistry, pp. 636-654. University of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- KULAEV, I. & VAGABOV, V. (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* 24: 83-171.
- LEAN, D. R. S. & NALEWAJKO, C. (1976). Phosphate exchange and organic phosphorus excretion by freshwater algae. *Journal of Fisheries Research Board, Canada* 30: 1312-1323.
- LISS, E. & LANGEN, P. (1962). Versuche zur Polyphosphatüberkompensation in Hefezellen nach Phosphatverarmung. *Archiv für Mikrobiologie* 41: 383-392.
- MACKINNEY, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *The Journal of Biological Chemistry* 140: 315-322.
- MONOD, J. (1950). La technique de la culture continue: Theorie et applications. *Annales de l'Institut Pasteur* 79: 390-410.
- NEET, K. E., AINSLIE, G. R. JR. (1980). Hysteretic enzymes. *Methods of Enzymology* 64: 192-226.
- NIELSEN, S. O. & LEHNINGER, A. L. (1955). Phosphorylation coupled to the oxidation of ferrocytochrome c. *The Journal of Biological Chemistry* 215: 555-570.
- NUSCH, E. A. (1980). Comparison of different methods for chlorophyll and haepigments determination. *Archiv für Hydrobiologie. Beihefte Ergebnisse der Limnologie* 17: 14-36.
- OLSEN, Y. (1989). Evaluation of competitive ability of *Staurastrum luetkemullerii* (Chlorophyceae) and *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) under P limitation. *Journal of Phycology* 25: 486-499.
- OLSEN, Y., VADSTEIN, O., ANDERSEN, T. & JENSEN, A. (1989). Competition between *Staurastrum luetkemullerii* (Chlorophyceae) and *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) under varying modes of phosphate supply. *Journal of Phycology* 25: 499-508.
- PETTERSSON, K. (1979). Enzymatic determination of orthophosphate in natural waters. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie* 64: 585-607.
- PIERSON, D. C., PETTERSSON, K. & ISTVÁNOVICS, V. (1992). Temporal changes in biomass specific photosynthesis during the summer: regulation by environmental factors and the importance of phytoplankton succession. *Hydrobiologia* 243/244: 119-135.
- REYNOLDS, C. S. (1988). Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. En: Sandgren, C. D. (ed.). *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*, pp. 388-433. Cambridge University Press, New York.
- REYNOLDS, C. S. (1998). The state of freshwater ecology. *Freshwater Biology* 39: 741-753.
- RHEE, G. Y. (1973) A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate, and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *Journal of Phycology* 9: 459-506.
- RIGLER, F. H. (1956). A tracer study of the phosphorus cycle in lake water. *Ecology* 37: 550-562.
- RIGLER, F. H. (1968). Further observations with the hypothesis that molybdenum blue method measures orthophosphate in the lake water. *Limnology and Oceanography* 13: 7-13.
- ROTT, E. (1981). Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* 43: 34-61.

- SCASSO, F., MAZZEO, N., GORGA, J., KRUK, C., LACEROT G., CLEMENTE, J., FABIAN, D. & BONILLA S. (en prensa). Water quality changes of a subtropical shallow hypertrophic lake. Two years of whole lake study. *Aquatic Conservation*.
- SCHINDLER, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science* 195: 260-262.
- SCHOBERT, B. & LANYI, J. (1989). Hysteretic behavior of an ATPase from the archaebacterium *Halobacterium saccharovorum*. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 12805-12812.
- SEGEL, I. (1975). *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. Wiley, New York.
- SIMONIS, W. & URBACH, W. (1973). Photophosphorylation in vivo. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 89-114.
- SOMMER, U. (1984). The paradox of the plankton: Fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. *Limnology and Oceanography* 29: 633-636.
- SOMMER, U. (1989). The role of competition for resources in phytoplankton succession. En: Sommer U. (ed.). *Plankton ecology: succession in plankton communities*, pp. 57-107. Springer-Verlag, New York.
- SOMMER, U. (1999). Competition and coexistence. *Nature* 402: 366-367.
- SPIJKERMAN, E. (1998). Phosphorus uptake and growth kinetics in planktonic desmid species from trophically different lakes. PhD thesis, Department of Aquatic Ecology, University of Amsterdam.
- SPIJKERMAN, E. & COESEL, P. F. M. (1997). Growth kinetic parameters of two planktonic desmid species under fluctuating phosphorus conditions in continuous-flow culture. *Journal of Plankton Research* 19: 1899-1912.
- STRICKLAND, J. D. H. & PARSONS, T. R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board, Ottawa, Canada. Bulletin 167.
- STUCKI, J. (1980). The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation. *European Journal of Biochemistry* 109:269-283.
- STUCKI, J., COMPIANI, M. & CAPLAN, S. (1983). Efficiency of energy conversion in model biological pumps: optimization by linear nonequilibrium thermodynamic relations. *Biophysical Chemistry* 18: 101-109.
- THELLIER, M. (1970). An electrokinetic interpretation of the functioning of biological systems and its application to the study of mineral salt absorption. *Annals of Botany* 34: 983-1009.
- TILMAN, D. (1982). *Resource competition and community structure*. Princeton University Press, Princeton.
- VALDERRAMA, J. C. (1981). The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry* 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. *Journal of Plant Physiology* 140: 163-167.
- 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. (1999). The complex relation between phosphate uptake and photosynthetic CO₂ fixation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. En: Peschek et al. (eds.), *The phototrophic prokaryotes*, pp 739-744. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- WAGNER F., SAHAN, E. & FALKNER, G. (en revisión). The establishment of coherent phosphate uptake behaviour by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*.
- WANNER, G., HENKELMANN, A., SCHMIDT, A. & KOST, H.-P. (1986). Nitrogen and sulfur starvation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. An ultrastructural, morphometrical, and biochemical comparison. *Z. Naturforsch.* 41c: 741-750.
- YOKOYAMA E., MURAKAMI, A., SAKURAI, H. & FUJITA, Y. (1991). Effect of supra-high irradiation on the photosynthetic system of the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714. *Plant and Cell Physiology* 32: 827-834.