

FOTOSINTESIS-ILUMINACION EN ESPECIES DE *DUNALIELLA* Y EN CEPAS NATIVAS DE *D. SALINA* (DUNAL) TEODORESCO*

Photosynthesis-Illumination on species of *Dunaliella* and native strains of *D. salina* (Dunal) Teodoresco

VÍCTOR DELLAROSSA S. y ANA SILVA CIFUENTES DE LA T.**

ABSTRACT

In vitro rates of photosynthesis as a function of light intensity were measured in three species of *Dunaliella*: *D. salina* (Dunal) Teodoresco UTEX 1644, *D. pseudosalina* Masjuk et Radchenko CONC-010 from Salar de Atacama, *D. lateralis* Pascher et Jahoda strain from Nepal and three native strains of *D. salina* (Dunal) Teodoresco from the North of Chile (CONC-001 from Laguna La Rinconada, Antofagasta, CONC-003 from Puillar, Salar de Atacama and CONC-006 from Burro Muerto, Salar de Atacama).

Each species shows a characteristic photosynthetic response within the range of intensities from 35 to 600 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. *D. lateralis* and *D. pseudosalina* production rates were remarkably inhibited at the highest light intensity.

Photosynthetic efficiency was different among species and highest for *D. lateralis*. It was also different, but less evident, among strains. *D. salina* from Puillar, Salar de Atacama showed the highest photosynthetic potential.

Differences of parameters (α , P_m^B , I_k) among species and native strains should serve for optimization of biomass yield in the massive culture.

KEYWORDS: Photosynthesis, *Dunaliella*.

RESUMEN

Se estudia la respuesta fotosintética respecto a un gradiente constante de iluminación en tres especies del género *Dunaliella*: *D. salina* (Dunal) Teodoresco cepa UTEX 1644, *D. pseudosalina* Masjuk et Radchenko cepa CONC-010 Salar de Atacama, *D. lateralis* Pascher et Jahoda cepa de Nepal, y en tres cepas nativas de *D. salina* (Dunal) Teodoresco del Norte de Chile (cepa CONC-001 de Laguna La Rinconada, Antofagasta; CONC-003 Salar de Atacama, sector Puillar; CONC-006 Salar de Atacama, sector Burro Muerto).

Cada especie presenta una respuesta fotosintética particular en el rango de 35 a 600 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. *D. lateralis* y *D. pseudosalina* muestran marcada fotoinhibición, lo que no ocurre con *D. salina*. La especie con una mayor eficiencia fotosintética es *D. lateralis*.

Las diferencias encontradas en las curvas P-I entre distintas cepas nativas de *D. salina* son menos evidentes entre especies. *D. salina* cepa CONC-003 aparece como la más eficiente y con el mayor potencial fotosintético en condiciones de laboratorio. Esta información y el conocimiento de los diferentes parámetros fotosintéticos (α , P_m^B , I_k) puede facilitar decisiones de manejo en el cultivo masivo de microalgas.

INTRODUCCION

El género *Dunaliella* es un constituyente importante del fitoplancton de muchos ecosistemas, tanto de agua dulce como marinos, y generalmente dominante en ambientes hipersalinos.

* Investigación financiada por los proyectos PNUD-CHI 87/009 y FONDECYT 89/0823.

** Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Chile.

El género es capaz de tolerar un amplio rango de variación de estímulos ambientales, característica que lo hace un excelente sustrato de experimentación.

La especie *D. salina* (Dunal) Teodoresco es una de las microalgas mejor estudiadas para cultivos masivos por su capacidad para acumular metabolitos como glicerol y carotenos en condiciones de alta intensidad de luz, salinidad, temperatura y deficiencias nutricionales (Ben Amotz y Avron, 1983; Borowitzka *et al.*, 1984).

Existe un creciente interés económico en estos metabolitos secundarios, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevas cepas para maximizar su producción a través de cultivos a gran escala.

La acumulación de carotenos ha sido explicada como un mecanismo de protección frente a la intensa radiación que la especie es capaz de tolerar. Las consecuencias fisiológicas de tal respuesta se manifiestan preferentemente en las tasas de fotosíntesis y de respiración (Ben Amotz y Avron, 1983; Loeblich, 1982; Borowitzka *et al.*, 1984).

El glicerol puede ser sintetizado en cantidades significativas en las especies halotolerantes (Gilmour *et al.*, 1982, 1984) y la concentración varía en proporción directa con el contenido extracelular de sal (Roubicek *et al.*, 1986). Aproximadamente el 80 por ciento del total del CO₂ fijado se orienta hacia la síntesis de glicerol (Kaplan *et al.*, 1980) principal metabolito osmoregulador en *Dunaliella* (Brown y Borowitzka, 1979).

El propósito del presente trabajo fue investigar, en condiciones de laboratorio, el efecto de un rango de intensidades de luz sobre la tasa de fotosíntesis en 3 especies de *Dunaliella* y en 3 cepas nativas de *D. salina* (Dunal) Teodoresco. En general, las estrategias fotoadaptativas son diferentes entre distintas especies de algas (Harris, 1978; Falkowsky, 1980, 1983; Richardson *et al.*, 1983) y en la actualidad poco se sabe sobre la respuesta fotosintética de microalgas halotolerantes.

En una primera etapa se utiliza como sustrato experimental especies de ambientes extremos para conocer la magnitud de las diferencias interespecíficas. *D. lateralis* Pascher et Jahoda es una especie de agua dulce, mientras que *D. salina* y *D. pseudosalina* Masjuk et Radchenko son halotolerantes. *D. salina* es el alga con la mayor capa-

dad carotenogénica conocida (Milko, 1963; Aasen *et al.*, 1969) y *D. pseudosalina* posee una morfología muy similar pero no es carotenogénica.

En una segunda etapa se utilizan cepas nativas de *D. salina* del norte de Chile para estimar variaciones intraespecíficas.

El conocimiento de la respuesta fotosintética en un rango de iluminación permite el cálculo de parámetros fotosintéticos que describen cada una de las fases de la curva, los que pueden apoyar decisiones en el manejo del cultivo masivo de *D. salina*.

MATERIALES Y METODOS

El punto de partida para el estudio comparativo de las distintas especies de *Dunaliella* es la curva fotosíntesis-iluminación (P vs I). La curva P vs I es una función esencialmente dinámica y no lineal, característica que impide realizar extrapolaciones a escalas de tiempo muy diferentes a la de la evidencia experimental.

Para la obtención de la curva P vs I las cepas fueron incubadas en un incubador con 6 niveles de iluminación (35, 70, 120, 200, 400 y 600 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) con 3 réplicas por nivel, a una temperatura de $17 \pm 2^\circ \text{C}$, por lapsos de 4 a 6 horas utilizando el método del oxígeno disuelto (Strickland y Parsons, 1972) y el del radiocarbono (Irwin *et al.*, 1986). Incubaciones paralelas con ambas técnicas (Irwin, 1991) permitieron utilizar un coeficiente fotosintético experimental de 1.5. El flujo de fotones se midió con un cuantámetro licor 185-A, y la biomasa con un fluorómetro TURNER, modelo 111.

Los experimentos se realizaron con cultivos unialegales previamente mantenidos en iguales condiciones de luz (ca. 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) y en fase de crecimiento exponencial. Las especies halotolerantes crecieron en solución Erdschreiber + 12.5 por ciento de NaCl y *D. lateralis*, en medio Bristol. En las condiciones dadas, los cultivos de *D. salina* presentan células verdes con bajo contenido de carotenos.

Las curvas P-I fueron normalizadas por sus respectivos valores de biomasa, para obtener ta-

sas específicas de fotosíntesis facilitando la comparación de los resultados. Los parámetros y unidades utilizadas se indican a continuación.

- P : tasa de fotosíntesis [$\mu\text{g C/l/h}$]
- B : biomasa [$\mu\text{g clorofila "a"/l}$]
- P^B : tasa específica de fotosíntesis [$\text{mg C/mg clorofila "a"/h}$]
- P_m^B : número de asimilación [$\text{mg C/mg clorofila "a"/h}$] o tasa específica máxima de fotosíntesis a saturación lumínica.
- : pendiente de la curva P vs I [$\text{mgC/mg clorofila "a"/h}/\mu\text{E/m}^2/\text{s}$]
- I_{op} : iluminación óptima [$\mu\text{E/m}^2/\text{s}$]
- I_k : índice de fotoadaptación [$\mu\text{E/m}^2/\text{s}$]. Este parámetro es el cociente entre P_m^B y .

RESULTADOS

1. Curvas P-I entre especies de *Dunaliella*

En la Tabla I se indican los principales parámetros fotosintéticos obtenidos en especies de *Dunaliella* y en cepas nativas de *D. salina*. La Fig. 1 muestra las tasas específicas de fotosíntesis

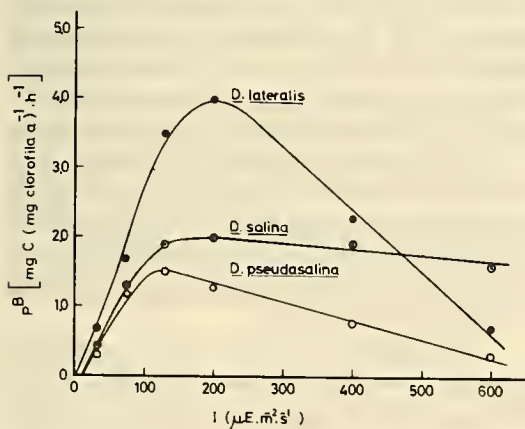


FIG. 1. Relación entre la tasa específica de fotosíntesis y la densidad de flujo fotónico en especies del género *Dunaliella*, en condiciones de laboratorio.

en las tres especies. Destaca la marcada fotoinhibición que experimenta *D. lateralis* por sobre los $200 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$. *D. pseudosalina* se fotoinhibe a partir de los $120 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$. Tanto *D. lateralis* como *D. pseudosalina* presentan un 80 por ciento de fotoinhibición a $600 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$, mientras que *D. salina*, frente al mismo estímulo tiene sólo un 20 por ciento de fotoinhibición.

D. lateralis muestra el más alto valor de P_m^B (ca. $4 \mu\text{g C}/\mu\text{g clorofila/h}$) valor que duplica el potencial fotosintético máximo de las especies halotolerantes. Con el parámetro α se observa la misma tendencia, lo que indica una mayor eficiencia de la especie de agua dulce en la captación de fotones.

2. Curvas P-I entre cepas de *D. salina*.

En la Fig. 2 se han graficado las curvas P-I obtenidas con las cepas nativas de *D. salina*.

En la Fig. 2 se han graficado las curvas P-I obtenidas con las cepas nativas de *D. salina*. Las funciones son muy similares con poca variabilidad entre ellas. La cepa CONC-003 muestra un mayor potencial fotosintético y una mayor eficiencia en las condiciones dadas en laboratorio.

El índice de fotoadaptación es ligeramente superior para la cepa CONC-001, pero en general este índice es muy constante tanto entre especies como entre cepas.

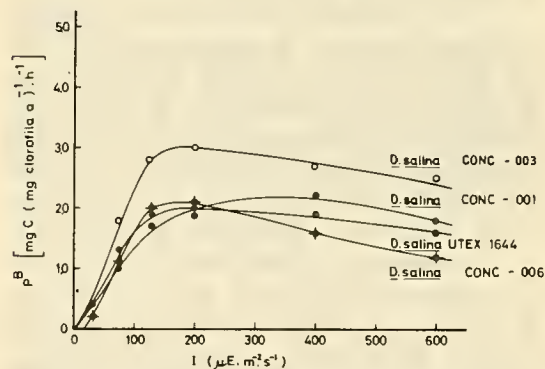


FIG. 2. Relación entre la tasa específica de fotosíntesis y la densidad de flujo fotónico en cepas de *Dunaliella salina*, en condiciones de laboratorio.

TABLA I. Principales parámetros fotosintéticos entre especies de *Dunaliella* y en cepas de *D. salina*.

	UTEX 1644 <i>D. salina</i>	<i>D. lateralis</i>	CONC 010 <i>D. pseudosalina</i>	CONC 001-ANT. <i>D. salina</i>	CONC 003-Puilar <i>D. salina</i>	CONC 006-B. Muerto <i>D. salina</i>
α	= 0.017	0.033	0.013	0.015	0.027	0.020
(a) P	: 0.13	0.03	0.24	0.03	0.12	0.06
(b) F	: 20.6	259.9	6176	305	24.9	96.3
(c) r	: 0.97	0.99	0.92	0.99	0.98	0.99
P_m^B	= 2.0	4.0	1.5	2.2	3.0	2.1
I_k	= 116	121	115	146	111	105
I_{op}	= 200	200	150	300	200	200

(a, b y c) = probabilidad, test F y coeficiente de correlación.

DISCUSION

Dos atributos básicos definen la condición de estado de un cultivo: a) sus características físicas o aspectos tangibles de masa, espacio y tiempo, los que constituyen la arquitectura del cultivo, y b), el transporte de materia, energía e información que corresponden al funcionamiento o fisiología del sistema.

Se puede distinguir una arquitectura a nivel de célula, producto de la disposición topológica de microestructuras y una arquitectura del cultivo, como consecuencia de la disposición espacial de las células que lo componen.

Si los principales parámetros fotosintéticos se analizan respecto a la organización de cada célula de *Dunaliella*, α indicaría la tasa a la que el estímulo es transformado por la arquitectura fotosintética y estaría controlada por la fase clara del proceso fotosintético (Rabinowitch y Govindjee, 1969) y por lo tanto existiría una relación con la composición pigmentaria del organismo.

D. lateralis y *D. salina* CONC-003 presentan un α que aproximadamente duplica el del resto de los cultivos (Tabla I). Esta habilidad fotoadaptativa en ambas especies podría estar relacionada con un aumento en la cantidad de pigmentos (Prezelin, 1981) o bien, con la arquitectura pigmentaria (Kirk, 1984), lo que implicaría variaciones en el tamaño, ordenamiento y transparencia de los tilacoides (Berner *et al.*, 1989).

P_m^B es el efecto neto máximo de la interac-

ción entre el estímulo y los centros de reacción (Herron y Mauzerall, 1972). P_m^B estaría relacionado con la fase oscura del proceso fotosintético y sería dependiente de los mecanismos bioquímicos de carboxilación y transporte de electrones. A nivel enzimático la actividad de RUBISCO adquiere una importancia fundamental, especialmente al variar su actividad con la luz (Raven y Beardall, 1981) y por su capacidad de actuar ya como carboxilasa u oxidasa.

Los altos valores de α para *D. lateralis* y *D. salina* CONC-003 se corresponden con altos valores de P_m^B . Esta situación se podría explicar aceptando que ambas especies poseen capacidad para alterar el tamaño de las unidades fotosintéticas y/o los procesos enzimáticos de carboxilación.

El índice fotoadaptación, I_k , muestra poca variabilidad entre los diferentes cultivos (Tabla I). Los mecanismos fisiológicos que explican la fotoinhibición no son aún bien comprendidos pero este efecto no se visualiza en forma tan marcada en las cepas de *D. salina*.

Experimentos de terreno con *D. salina* indican requerimientos de luz muy altos (Ben Amotz y Avron, 1983; Thomas *et al.*, 1986), sin embargo, los valores absolutos y específicos de las tasas de fotosíntesis señaladas por estos autores son muy similares a los encontrados en laboratorio.

Tomando la célula como unidad de referencia, los valores de α , P_m^B , I_k tienen una explicación fisiológica y bioquímica.

Otra forma de interpretar los parámetros fotosintéticos es considerando el cultivo como un todo. En esta visión destaca la capacidad de aglomeración y de dispersión de las células de *Dunaliella*. Algunas especies regulan su posición en la columna de agua de acuerdo a la luz y a la temperatura (Teodoresco, 1938) y es el cultivo el que puede configurar diferentes arreglos topológicos, es decir, es capaz de cambiar su arquitectura.

Desde este punto de vista, la curva P-I es la resultante del comportamiento de cada nodo o unidad de interacción estímulo-arquitectura. α caracteriza la fase de fotodependencia de la curva P-I y P_m^B la de fotosaturación.

La fotoadaptación, como fenómeno, compromete un amplio rango de escalas espacio-temporales (Gallegos *et al.*, 1983). Se pueden observar cambios en P_m^B en lapsos de 5 a 6 horas, tiempo muy similar al que se requiere para detectar variaciones en el tamaño de las unidades fotosintéticas (Lewis, 1983). Si la escala de tiempo para la fotoadaptación es más breve que para la mezcla vertical en la columna de agua, el cultivo debería mostrar un gradiente vertical de adaptación a la luz; si la situación es lo inverso, las poblaciones mostrarán una respuesta uniforme en la columna de agua (Lewis *et al.*, 1984; 1985). En el proceso de fotoadaptación existirían a lo menos dos componentes, uno biológico y otro físico, capaces de cambiar la arquitectura de un cultivo.

En condiciones naturales el estímulo lumínico tiene un carácter cíclico, por lo que α , P_m^B e I_k son parámetros esencialmente dinámicos en el espacio y en el tiempo.

El rol que un organismo unicelular tiene como elemento de una "arquitectura dinámica" en un cultivo masivo es diferente del que presenta

como entidad aislada. Un mayor nivel de organización incide en una menor eficiencia en la utilización de la luz (Kirk, 1983). El fenómeno de agrupamiento de células, frecuentemente observado en cultivos de *D. salina* (Teodoresco, 1938) origina la aparición de nuevos límites para el conjunto. Esto tiene incidencia directa en la regulación del estímulo lumínico por lo que puede considerarse como una habilidad fotoadaptativa del cultivo.

En ambiente natural, el exceso de estímulo opera en una escala de tiempo mayor y puede ser más efectivo para las diferentes cepas nativas superar estas condiciones mediante una intensa actividad carotenogénica. La células rojas necesitan de un mayor estímulo para alcanzar la fotosaturación (Loeblich, 1982; Borowitzka *et al.*, 1984).

Un aspecto no considerado en el estudio y que puede tener gran incidencia en el manejo del cultivo masivo es la dependencia del proceso fotosintético de las diferentes longitudes de onda (Lewis *et al.*, 1986). Existe disminución de la capacidad fotosintética en la región azul del espectro (Vesk y Jeffrey, 1977) y su efecto es pronunciado especialmente en las células ricas en carotenos (Loeblich, 1982).

Los parámetros fotosintéticos pueden constituir un real apoyo en decisiones de manejo de cultivo de microalgas (Cabrera y Montecinos, 1987) pero el análisis de su significado, respecto al cultivo como un todo, indica que deben ser considerados desde un punto de vista retroalimentativo.

Si bien los resultados *in vitro* permiten destacar una mayor eficiencia fotosintética en una de las cepas nativas de *D. salina*, es imperativo contrastar esta información con experimentos "in situ" antes de decidir una extrapolación de los valores a escala ecológica.

BIBLIOGRAFIA

- Aasen, A.J., Eimhjellen, K.E. & S. Liaenen-Jensen 1969. An extreme source of β -carotene. *Acta Chimica Scandinavica* 23: 2544-2545.
- Ben Amotz, A. & M. Avron 1983. On the factors which determine the massive α -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 72: 593-597.
- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K. & P.G. Falkowski 1989. Photoadaptation and the "package" effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 25: 70-78.
- Borowitzka, L.J., Borowitzka, M.A. & T.P. Moulton 1984. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia* 116/117: 115-121.

- Brown, A.D., & L.J. Borowitzka. 1979. Halotolerance of *Dunaliella*. In Levandowsky, M. & S.H. Hunter (eds.). Biochemistry and Physiology of Protozoa. Vol. 1, Academic Press. New York: 139-190.
- Cabrera, S. & V. Montecinos 1987. Fotosíntesis y cultivo masivo de microalgas. Invest. Pesq. (Chile) 34: 155-163.
- Falkowsky, P.G. 1980. Light shade adaptation in marine phytoplankton. In Falkowsky, P.G. (ed.) Primary productivity in the sea. Plenum Press: New York, 99-119.
- Falkowsky, P.G. 1983. Light shade adaptation and vertical mixing of marine phytoplankton: A comparative field study. J. Mar. Res. 41: 215-237.
- Gallegos, C.L., Platt, T., Harrison, W.G. & B. Irwin 1983. Photosynthetic parameters of arctic marine phytoplankton. Vertical variations and time scales of adaptation. Limnol. Oceanogr. 28: 698-708.
- Gilmour, D.J., Hipkins, M.F. & A.A. Boney 1982. The effect of salt stress on the primary processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. Plant Sc. Letters 26: 325-330.
- Gilmour, D.J., Hipkins, M.F. & A.A. Boney 1984. The effect of decreasing the external salinity on the primary processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. J. Exp. Bot. 35: 18-27.
- Herron, H.A. & D. Mauzerall 1972. The development of photosynthesis in a greening mutant of *Chlorella* and an analysis of the light saturation curve. Plant Physiol., 50: 141-148.
- Harris, G.P. 1978. Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton. Ergeb. Limnologie 10: 1-171.
- Irwin, B., Caverhill, C., Dickie, P., Horne, E. & T. Platt 1986. Primary production on the Labrador Shelf during June and July 1984. Can. Data Rep. Fish: Aquat. Sci. 577: 162 pp.
- Irwin, B. 1991. Coulometric measurement of primary production, with comparison against dissolved oxygen and ¹⁴C methods in a seasonal study. Mar. Ecol. Prog. Ser. 71:97-102.
- Kaplan, A., Schreiber, U. & M. Avron 1980. Salt induced metabolic changes in *Dunaliella salina*. Plant Physiol. 65: 810-813.
- Kirk, J.T.D. 1983. Light and Photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press, 401 pp.