

Capítulo

6

Influencia de SH en

el crecimiento de Diatomeas.

6.1.- INTRODUCCIÓN

Bentos.

Diatomeas.

Características generales.

Los bentos (biota que vive en o cerca del fondo de un cuerpo de agua) en las zonas eufóticas abarcan no sólo hábitats con vegetación de dimensiones macroscópicas, sino también, grandes áreas que se encuentran colonizadas predominantemente por microorganismos fotosintéticos activos.

Esto es así especialmente en superficies de sedimento que a simple vista parecen no tener ningún tipo de vida vegetal evidente. En una inspección más detallada, sin embargo, la coloración pardusca o verdosa de la superficie es debida a los ensambles de microorganismos, los llamados microfitobentos. Este término se refiere a algas eucarióticas

microscópicas unicelulares (Baccilariophyceae, Chlorophyceae y Dinophyceae) y a las cianobacterias procarióticas que viven en superficies del sedimento. Crecen en hábitats que se extienden desde la arena de zonas entre mareas y los planos del fango, hasta pantanos de sal y camas de vegetación acuática sumergida. Aunque menos visible que las macroalgas o las plantas vasculares, los microfitobentos pueden contribuir perceptiblemente a la producción primaria en las zonas litorales [1, 2]. En muchos sistemas acuáticos bajos la biomasa de microalgas bénticas excede la del fitoplancton en las aguas que baña los sedimentos. Los principales factores limitantes del crecimiento de microfitobentos son la disponibilidad de nutrientes y luz. Así, los ensambles de microfitobentos se encuentran en las capas superficiales más elevadas de los sedimentos, justo

en la interfaz sedimento-agua [3, 4]. Las SH son naturalmente irradiadas en la misma capa por lo que resulta interesante el estudio del efecto de la irradiación de las SH sobre el crecimiento de microfitobentos.

Baccilariophyceae: Diatomeas

Las diatomeas son abundantes en casi todos los ambientes acuáticos. Morfológicamente son organismos sencillos, sin flagelos, unicelulares o en forma de pequeñas agrupaciones de células. Sin embargo presentan gran diversidad (10000 a 12000 especies descritas) y son probablemente los eucariotas más abundantes en el medio acuático. En términos de su contribución a la productividad global, las diatomeas son los organismos fotosintéticos acuáticos más importantes, dominando en el fitoplancton de las aguas frías, ricas en nutrientes, especialmente en zonas de surgencias en los océanos. Son especialmente importantes en las aguas antárticas, donde son consumidas directamente por el krill (un pequeño crustáceo), que a su vez constituye la base de la dieta de ballenas, focas, pingüinos y peces. Algunas diatomeas producen toxinas (principalmente ácido domoico) y pueden formar *blooms* tóxicos semejantes a los producidos por los dinoflagelados y algunas cianofitas. La mayoría son

fotosintéticas y presentan clorofila *a*, clorofila *c*, y pigmentos accesorios como β -caroteno, fucoxantina, diadinoxantina y diatoxantina. Presentan sustancias de reserva en gotas lipídicas y un hidrato de carbono soluble (crisolaminarina). Algunas diatomeas son capaces de vivir en medios donde llega poca luz, y donde hay altas concentraciones de materia orgánica, como es el caso de los fondos marinos. En esas condiciones las diatomeas presentan metabolismo heterótrofo.

El rasgo más distintivo de las diatomeas es su pared celular (teca = frústulo), compuesta de sílice (SiO_2) hidratada y pequeñas cantidades de materia orgánica. El frústulo está formado por dos mitades desiguales que encajan una en otra (*epiteca* = la parte externa; *hipoteca* = la parte encajada por dentro). La sílice es resistente a los ataques enzimáticos, por lo que las diatomeas son menos vulnerables al ataque de microorganismos que otras algas cuyas paredes están compuestas por polisacáridos. Las diatomeas son un buen ejemplo de organismos que alteran la multiplicación asexual (aumentando el número de individuos mediante divisiones mitóticas) y la reproducción sexual (división por meiosis, con recombinación genética). Cuando una diatomea se divide por

mitosis, cada una de las mitades de la teca pasa a una célula hija. La pared heredada funciona siempre como epiteca y cada célula genera una nueva hipoteca. El resultado es que la mitad de las células de cada generación van siendo cada vez más pequeñas. Llega un punto crítico en el que ya no es posible la división celular por este procedimiento y la diatomea pasa a reproducirse sexualmente, restaurando el tamaño original de las células, ver figura 6.1.

La composición y dureza de la pared celular confiere a las diatomeas un gran valor industrial. Grandes depósitos fósiles de diatomeas se extraen para su uso como filtros, abrasivos, aislantes térmicos, en pinturas para aumentar la visibilidad de señales, etc. También se usan como indicadores bioestratigráficos para

datar rocas sedimentarias en exploración de yacimientos petrolíferos y de gas, y como indicadores de cambios ambientales [5].

En la diatomea marina *Thalassiosira pseudonana* se ha secuenciado el genoma nuclear completo (34 millones de pares de bases), el genoma plastidial (129000 pares de bases) y el genoma mitocondrial, otros organismos muestran que las diatomeas tienen numerosos rasgos distintivos. Se han identificado genes particulares para el transporte de ácido silícico (H_4SiO_4) y la formación de las paredes celulares de sílice, para enzimas biosintéticas de varios tipos de ácidos grasos poli-insaturados, para un ciclo completo de la urea y el uso de diversos compuestos nitrogenados. Todos estos

Figura 6.1.- Diagrama esquemático de la multiplicación y reproducción sexual en diatomeas.

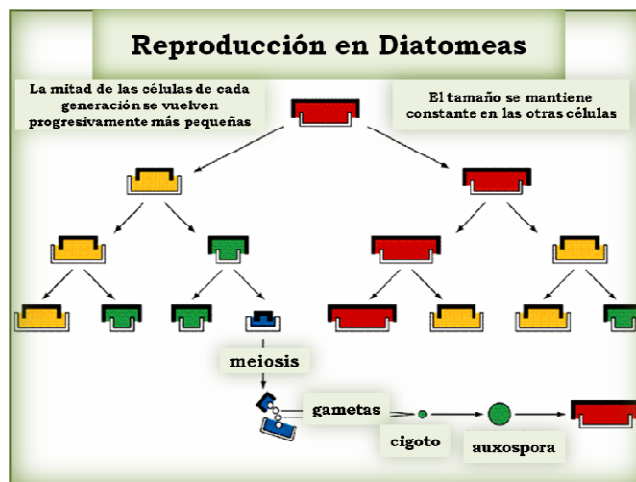
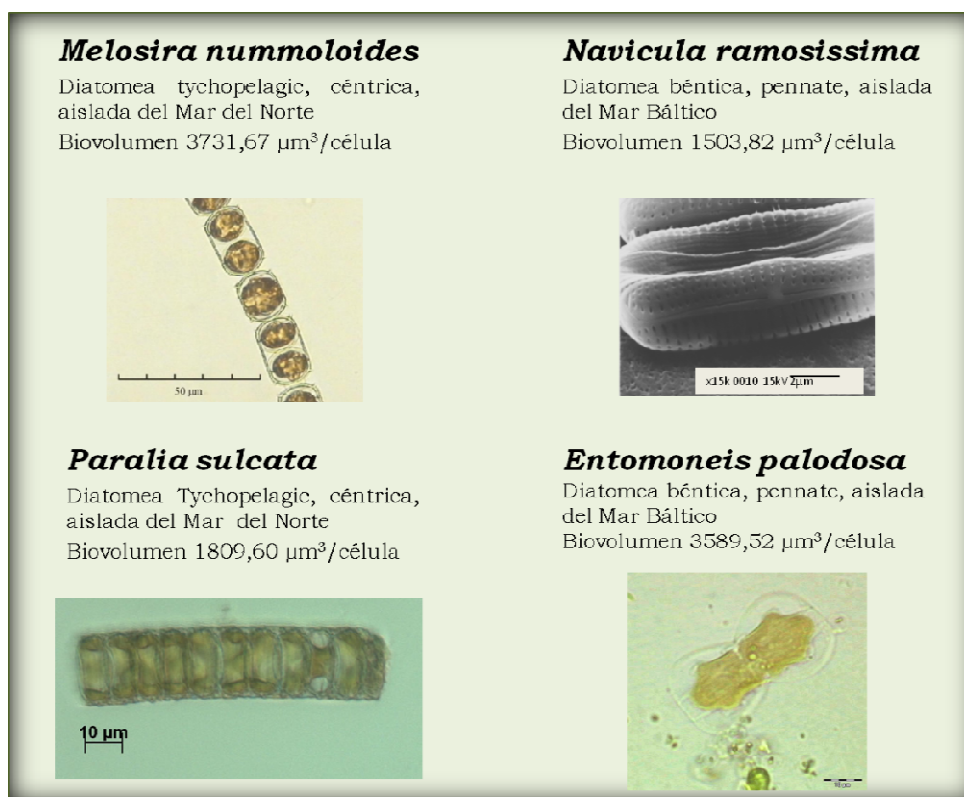


Figura 6.2.- Esquema descriptivo de las diatomeas utilizadas en este capítulo.

genes permiten que las diatomeas prosperen en ambientes acuáticos [6]. Debido a que las diatomeas, con las que se trabajó en los experimentos de este capítulo, figura 6.2, habitan en zonas bénticas, se investigó la influencia de las SH en su crecimiento. De acuerdo a lo presentado en los antecedentes de esta tesis, nuestra hipótesis es que las SH pueden influir positivamente en el crecimiento de diatomeas debido a la mayor disponibilidad de nutrientes en los sedimentos, así como también debido a la protección contra el aumento de la intensidad de la luz.

Por tanto, la presencia de SH en los medios de cultivo permite describir mejor el nicho fundamental de las diatomeas (con la temperatura, los nutrientes y las condiciones de luz) en su medio natural.

6.2.- RESULTADOS

Análisis comparativo de los ensayos de crecimiento con diferentes algas.

6.2.1.- Recuento de células

Las tasas de crecimiento y el número de células $\times \text{mL}^{-1}$ exhibidas por las diatomeas pennates *N. ramosissima* y

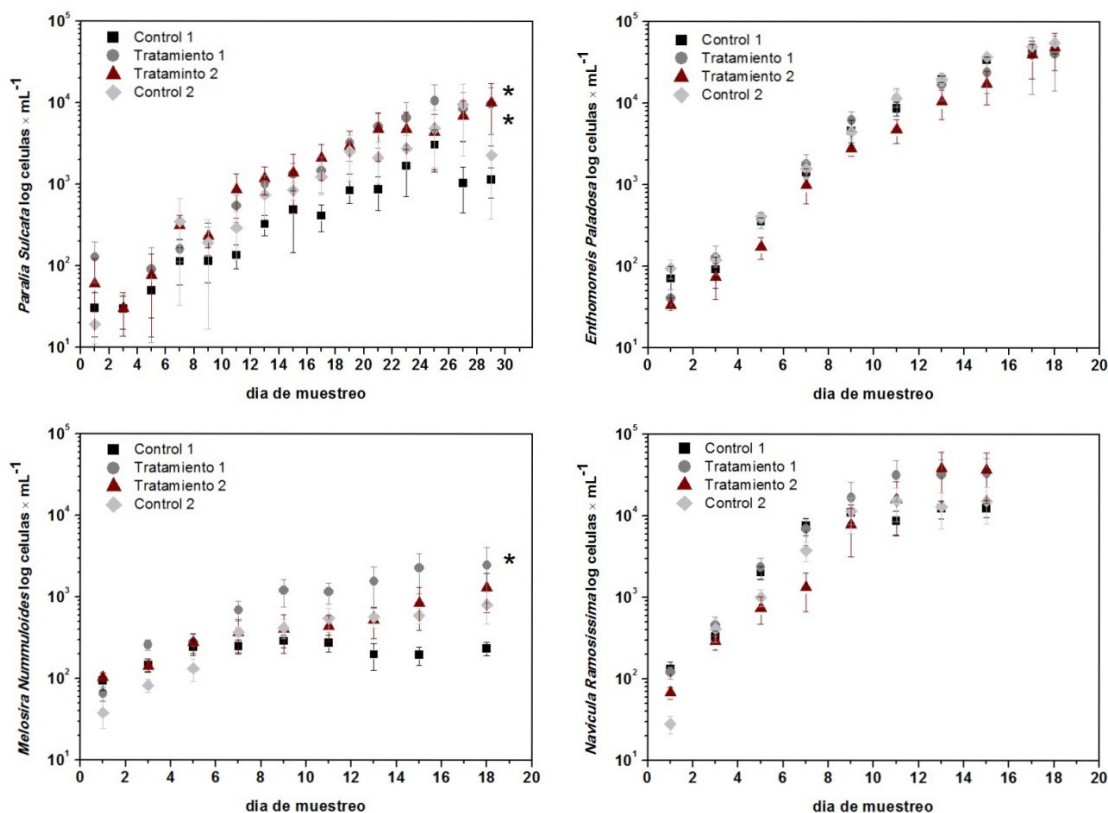
E. palodosa fueron mayores en comparación con los valores registrados para diatomeas céntricas, *P. sulcata* y *M. nummuloides* (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,05$) (figura 6.3). Para el recuento de individuos no se determinaron diferencias significativas entre tratamientos en el crecimiento de *N. ramosissima* y *E. palodosa*.

El crecimiento más lento fue para *P. sulcata* el cual tomó 27 días para entrar en la fase estacionaria, mientras que para todas las otras

algas comenzó entre los días 11 y 17 (figura 6.3).

El crecimiento de *Paralia sulcata* con diferentes concentraciones de SH (sustancias del tipo ácido húmico extraídas del sedimento marino) necesitó 29 días para llegar a la fase estacionaria y este tiempo fue mucho más corto en ausencia de SH. A partir del recuento celular se observó una abundancia (células \times mL⁻¹) significativamente mayor, en los tratamientos con SH (tratamiento 1 y 2) (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,03$) (figura 6.3).

Figura 6.3.- Monitoreo del crecimiento expresado como abundancia (células \times mL⁻¹) en escala logarítmica en función del tiempo de muestreo. * Indica diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,03$).



El crecimiento de *Melosira nummolooides* con diferentes concentraciones de SH necesitó 18 días para llegar a la fase estacionaria. La fase de crecimiento exponencial se inició el día 3 y terminó el día 15. A partir del recuento celular se observó una abundancia (células \times mL⁻¹), significativamente mayor, en los tratamientos con SH (tratamientos 1 y 2) (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,03$) (figura 6.3).

Además, para *M. Nummolooides* se observó la menor velocidad de crecimiento (en comparación con las otras tres algas), figura 6.4., pero se determinaron diferencias significativas entre tratamientos y la mayor velocidad de crecimiento se observó para el tratamiento 1 (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,003$).

6.2.2.- Medidas de fluorescencia *in situ* (BBE)

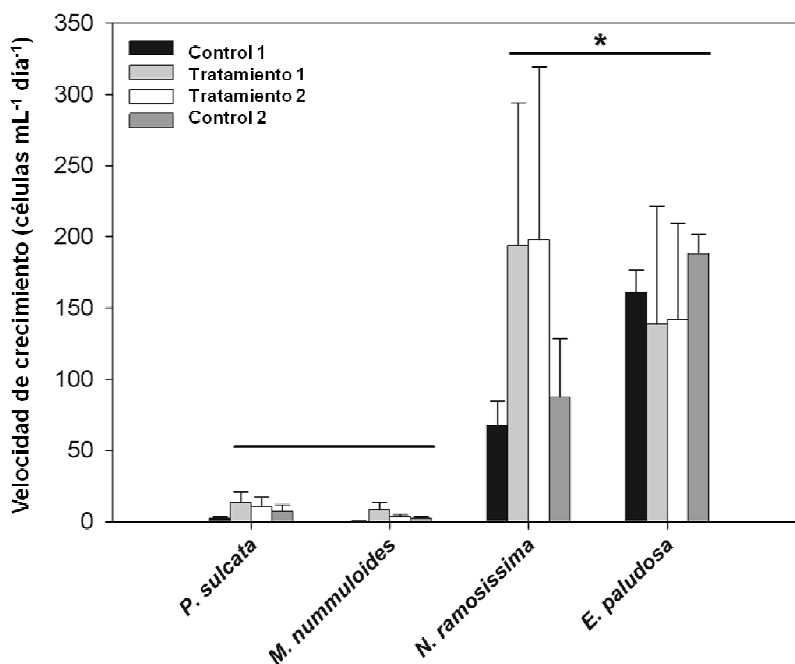
La clorofila *a* es el principal pigmento de la fotosíntesis y se encuentra en altas concentraciones en todas las diatomeas. De los valores de concentración de clorofila *a* determinados por fluorescencia se observaron diferencias significativas entre tratamientos para las cuatro diatomeas. Los valores bajos de

concentración de clorofila *a* registrados para *P. sulcata* y *M. nummolooides* pueden ser explicados a través de las limitaciones de la técnica debido a que ambas diatomeas forman cadenas causando mayor pérdida de intensidad de fluorescencia por efecto de filtro interno. Sin embargo, se observa una correlación significativa entre el número de células \times mL⁻¹ y la concentración de clorofila *a*, lo cual indica que las medidas de fluorescencia siguen siendo un buen método comparativo, *in vivo*, incluso para diatomeas que forman cadenas.

La mayor concentración de clorofila *a* para *P. sulcata* fue detectada para los tratamientos 1 y 2 (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,02$) y para *M. nummolooides* (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,04$) y *N. ramosissima* (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,02$) solo en el tratamiento 1.

Las altas correlaciones de la fluorescencia *in situ* y los datos de abundancia en ambos tratamientos con SH mostraron una buena adaptación de *P. sulcata* y *M. nummolooides* a condiciones de baja intensidad luminosa (por efecto de filtro interno de las SH). La correlación baja pero significativa en los tratamientos de control podría explicarse por el bajo número de células y los bajos valores de

Figura 6.4.- Velocidad media de crecimiento (células mL⁻¹ día⁻¹) (± Desviación Estándar) de las diatomeas para cada tratamiento. El asterisco * indica diferencias significativas de *N. ramosissima* y *E. paludosa* en comparación con *P. sulcata* y *M. nummuloides* (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,001$).



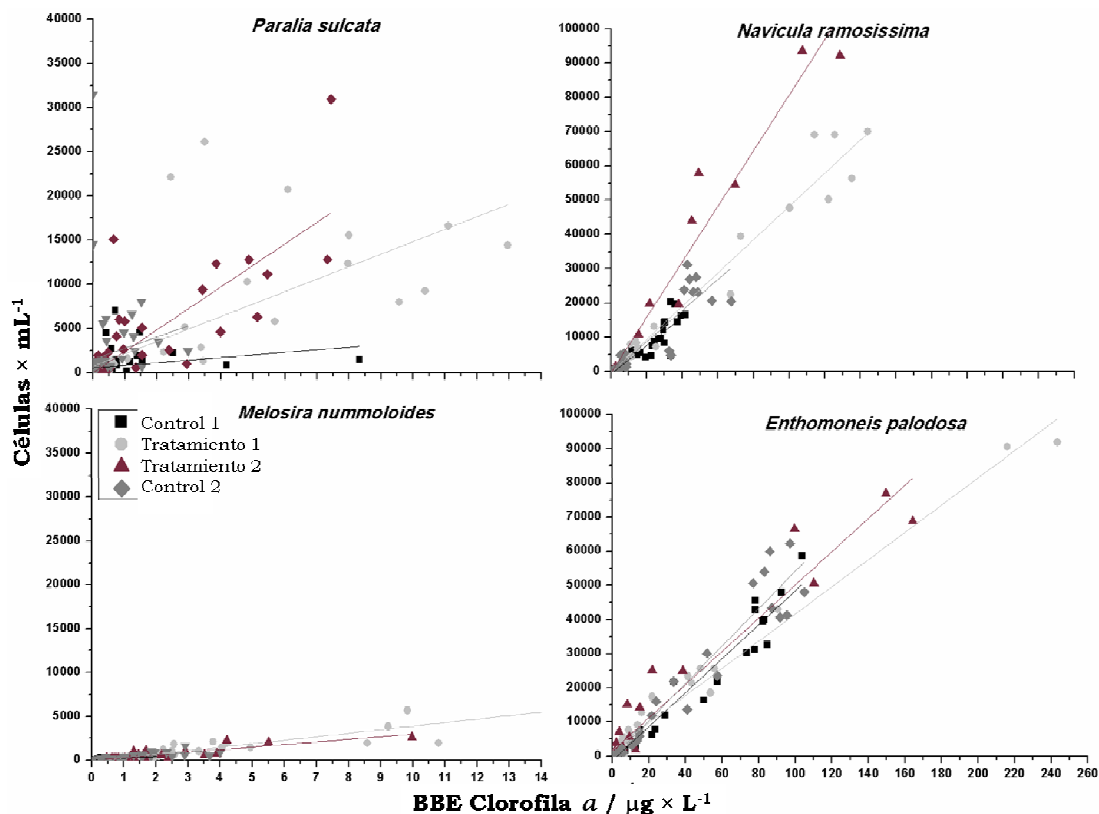
fluorescencia *in situ* (en su mayoría en torno a cero) lo que implica un alto error en ambos tipos de medidas.

6.2.3.- Cuantificación de pigmentos por HPLC.

En concordancia con los resultados de fluorescencia, las mayores concentraciones de clorofila *a* (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,05$) determinadas por HPLC durante la fase estacionaria para las cuatro diatomeas también se alcanzaron en

el tratamiento 1 (tabla 6.1). Al igual que para la clorofila *a* los mayores valores de concentración del resto de pigmentos (fucoxantina, diadionoxantina y β -caroteno) determinados por HPLC se obtuvieron para el tratamiento 1. Curiosamente, para *P. sulcata* la concentración de clorofila *a* en el tratamiento 2 fue menor que la esperada, a pesar de que la tasa de crecimiento dentro de este tratamiento fue significativamente más alta que en los controles 1 y 2. Del mismo modo para *E. paludosa* la

Figura 6.5.- Rango de correlación de Spearman entre la concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$) y células $\times \text{mL}^{-1}$. Los coeficientes para la correlación de Spearman para *P. Sulcata*: R = 0,63 (Control 1, Tratamiento 2), R = 0,69 (Tratamiento 1) y R = 0,67 (Control 2); para *M. nummoloides*: R = 0,79 (Control 1), R = 0,89 (Tratamiento 1), R = 0,67 (Tratamiento 2) y R = 0,93 (Control 2); para *N. ramosissima*: R = 0,94 (Control 1), R = 0,97 (Tratamiento 1, 2) y R = 0,91 (Control 2) y para *E. palodosa*: R = 0,98 (Control 1, Tratamiento 1), R = 0,93 (Tratamiento 2) y R = 0,96 (Control 2).



concentración de clorofila *a* detectada en el tratamiento 2 tuvo un valor significativamente bajo (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,04$).

Otro pigmento que se encuentra en altas concentraciones en las diatomeas es la fucoxantina, un pigmento secundario que a menudo es

utilizado como marcador de algas. Para *P. sulcata* y *M. nummoloides* la concentración de fucoxantina en todos los tratamientos fue significativamente mayor que todos los otros pigmentos (ANOVA, LSD post-hoc test, $p < 0,04$). Para *N. ramosissima* y *E. palodosa* la concentración de clorofila *a* fue en

Tabla 6.1: Concentraciones de los principales pigmentos ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$) de las diatomeas determinados al final de los experimentos de crecimiento.

Pigmentos	Control 1	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Control 2
<i>Paralia sulcata</i>				
Fucoxantina	29 ± 4	61 ± 16	34 ± 4	24 ± 11
Diadinoxantina	2 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
Clorofila <i>a</i>	23 ± 7	55 ± 23	6 ± 5	19 ± 12
β - Caroteno	3 ± 1	a	2.25 ± 0.01	a
<i>Melosira nummoloidea</i>				
Fucoxantina	4 ± 1	42 ± 39	a	5 ± 1
Diadinoxantina	2 ± 1	a	a	2 ± 1
Clorofila <i>a</i>	1 ± 1	30 ± 30	10 ± 9	3 ± 1
β - Caroteno	a	a	a	a
<i>Navicula ramosissima</i>				
Fucoxantina	93 ± 14	188 ± 99	149 ± 82	70 ± 35
Diadinoxantina	9 ± 2	16 ± 7	18 ± 8	6 ± 2
Clorofila <i>a</i>	122 ± 36	303 ± 161	209 ± 121	112 ± 59
β - Caroteno	7 ± 1	15 ± 7	20 ± 1	4 ± 1
<i>Enthomoneis palodosa</i>				
Fucoxantina	203 ± 20	268 ± 120	192 ± 68	217 ± 24
Diadinoxantina	35 ± 4	31 ± 13	18 ± 6	43 ± 3
Clorofila <i>a</i>	341 ± 34	448 ± 208	255 ± 92	414 ± 32
β - Caroteno	13 ± 2	24 ± 9	14 ± 5	15 ± 1

a. Menor al límite de detección

general significativamente más alta que los otros pigmentos (ANOVA, LSD post- hoc test, $p < 0,05$) (tabla 6.1).

Los pigmentos determinados en concentraciones más bajas fueron diadinoxantina y β-caroteno.

Tal como sería de esperar por las elevadas velocidades de crecimiento

para *N. ramosissima* y *E. palodosa*, las concentraciones de pigmentos (fucoxantina, diadinoxantina, clorofila *a* y β-caroteno) fueron mayores que para *P. sulcata* y *M. nummoloidea* (ANOVA, LSD post- hoc test, $p < 0,001$).

- Nutrientes

Además, las concentraciones de nutrientes presentan diferencias significativas entre los distintos tratamientos (figura 6.6). Un resultado interesante se detecta al tener en cuenta que los medios de cultivo enriquecidos con las diferentes concentraciones de SH (tratamiento 1 y 2) contienen una menor concentración de nutrientes en comparación con el control 2. Sin embargo, la concentración de silicato fue significativamente mayor en el tratamiento 2 (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,05$), mientras que las concentraciones de fosfato fueron significativamente mayores para el tratamiento 2 y el control 2 (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,02$) en comparación a los otros tratamientos. Por otra parte, el nitrógeno inorgánico total disuelto (**NID**) fue significativamente mayor para los controles 1 y 2 (ANOVA, test LSD post-hoc, $p < 0,05$) (figura 6.6).

6.3.- DISCUSIÓN

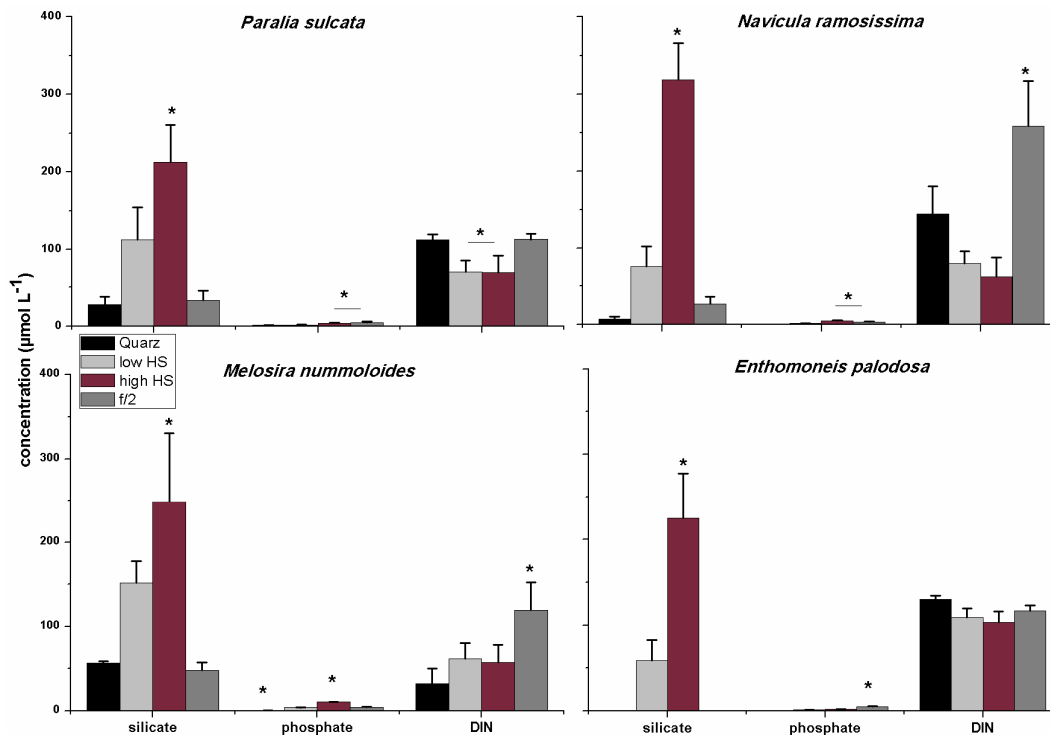
Se conoce muy poco acerca de la influencia de las SH sobre organismos que se encuentran en columnas de agua y en sedimentos. Se sabe que las SH influyen en el régimen de luz en la columna de agua lo cual tiene un efecto en los organismos fotosintéticos

que se encuentran en la misma, especialmente en aquellos que viven en el sedimento. Además, las SH afectan las condiciones biogeoquímicas del entorno debido a su capacidad para formar complejos con compuestos de alto peso molecular y cationes inorgánicos [7].

Los resultados mostraron que para las diatomeas *P. sulcata*, *M. nummolooides*, *Entomoneis palodosa* y *N. ramosissima* el crecimiento fue ligeramente superior en los tratamientos en los que se adicionaron las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos en comparación con los controles.

Las tasas de crecimiento son uno de los parámetros más importantes para determinar si el estado de las diatomeas es el óptimo. Una característica común en las curvas de crecimiento obtenidas para *P. sulcata* y *M. nummolooides* es que la fase exponencial se prolonga por la adición de pequeñas cantidades de SH. Esta extensión se observa más claramente en la densidad de población alcanzada al final de la fase exponencial (figura 6.3). Con solo una pequeña extensión de la fase exponencial se logra un aumento considerable en la densidad celular final. Esta mayor abundancia de células indica la adaptación a condiciones de poca luz, lo que puede

Figura 6.6.- Concentración de nutrientes en el medio de cultivo utilizado para las cuatro diatomeas en los diferentes tratamientos determinada al final de los experimentos de crecimiento.* Indica diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$).



ser confirmado para el caso de *P. sulcata* del análisis de datos de campo realizados en el Mar del Norte, Helgoland, Alemania. Dicha base de datos se mantiene diariamente, a partir de 1962, desde un programa de monitoreo donde la abundancia mostró tener una correlación negativa con altas intensidades de luz durante los últimos 40 años [8,9,10].

P. sulcata es una especie de diatomeas cosmopolita, salobre y marina que se encuentra en zonas litorales y sublitorales de los sedimentos, como

así también en columnas de agua. Se describe a esta especie como una tychopelagic [11,12,13]. A menudo se asocia a hábitats de arena y de sedimentos de grano fino, ricos en materia orgánica [11,14]. También *M. nummuloides* se describe como una especie bentónica que se encuentra principalmente en aguas salobres con contaminación orgánica [15]. Hellebost y Guillaro [16] mostraron que *M. nummuloides* puede tomar y acumular aminoácidos en condiciones de luz, como así también de oscuridad. Por lo

tanto, *P. sulcata* y *M. nummuloides* como especies bentónicas son capaces de vivir en estrecho contacto con el sedimento y se encuentran en aguas turbias. Están adaptadas a medios ricos en materia orgánica y de baja intensidad de luz lo que es una ventaja para la producción ecológica en estos medios [14,17]. En estas condiciones, ambas algas pueden presentar un metabolismo heterótrofo [5]. Este comportamiento explica porqué el crecimiento es bueno en nuestros experimentos para aquellos tratamientos enriquecidos con las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos. El favorecimiento del crecimiento mediante la adición de SH del mismo origen natural que las algas puede ser explicado por el aumento de la biodisponibilidad de metales traza y otros nutrientes [18]. Adicionalmente, *N. ramosissima*, como especie bentónica, desempeña un rol importante en la estructura de los sedimentos. Esta alga mostró mayores tasas de crecimiento en todos los tratamientos respecto al resto de las diatomeas, especialmente en aquellos en los que se adicionaron las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos. Por el contrario, *E. paludosa* presentó una tasa de crecimiento ligeramente mayor en el control 2.

Prakash y col. [19] presentaron resultados contrastantes a los nuestros para el crecimiento de diatomeas en presencia de diferentes concentraciones de SH. Los autores utilizaron especies de diatomeas pelágica (*Skeletonema costatum*, *Thalassiosira nordenskiöldii* y *Phaeodactylum tricornutum*) y obtuvieron el mejor crecimiento a la concentración de $0,03 \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ de SH. Esta concentración fue de alrededor de 10 veces menor en comparación a las utilizadas en nuestros ensayos. Sin embargo, Prakash y col. [19] obtuvieron resultados similares a los nuestros, para ensayos a diferentes concentraciones de SH donde monitorearon el crecimiento de *S. costatum* y observaron un aumento en el crecimiento al incrementar las concentraciones, en el rango de $(0,003-0,018) \text{ g}\times\text{L}^{-1}$ en comparación con el medio de cultivo f/2. El valor de concentración de las SH en el cual comienzan a ejercer un efecto de inhibición del crecimiento parece depender de la naturaleza de las SH y de las especies utilizadas en los ensayos.

La razón por la cual en general en nuestros experimentos el tratamiento 1 ejerce un mayor efecto estimulante del crecimiento que el tratamiento 2 (con mayor concentración de SH) se ha atribuido a la absorción selectiva

de la luz, al impartirle un mayor color amarillento a la solución, lo que resulta en la reducción de la fotosíntesis [20]. Por otro lado, la inhibición del crecimiento por la adición de húmicos en altas concentraciones se puede explicar también por un efecto de quelación, ya que el exceso de quelante puede hacer que los iones esenciales para las algas no estén disponibles [21].

Otros estudios mostraron que principalmente las cianobacterias son más sensibles a la adición de SH, las que reducen su crecimiento debido a la formación de compuestos complejos entre las SH acuáticas con hierro [18] y a la reducción de la disponibilidad del Fe y el desarrollo de H_2O_2 intracelular [7]. Imai y col. [22] mostraron un crecimiento significativamente menor para *Microcystis aeruginosa* cuando una concentración (2 mg de peso seco $\times L^{-1}$) de AF extraídos de una laguna se añadió al medio de cultivo. Esta concentración es similar a la concentración de sustancias del tipo ácido húmico de sedimentos marinos empleada en nuestros experimentos (tratamiento 1). Los autores propusieron que la inhibición del crecimiento se debió a la formación de complejos de hierro con los AF. En tanto, concluyeron que las SH, en general, juegan un papel importante

en la formación de poblaciones de *M. aeruginosa* en lagos.

En contraste con estos resultados, el crecimiento de las diatomeas bentónicas utilizadas en nuestros experimentos no se vio afectado negativamente por la adición de SH. Además, nuestros resultados podrían indicar que especialmente las especies bentónicas, se adaptan mejor a altos contenidos de materia orgánica (por ejemplo, SH) en el sedimento. Mientras que, las especies pelágicas no se adaptan fácilmente al aumento de concentración de SH en la columna de agua.

Las concentraciones más altas de fucoxantina y clorofila *a* se alcanzaron para las cuatro diatomeas en ambos tratamientos con SH. La fucoxantina es un pigmento antena que tiene un rol importante en condiciones de poca luz. Esto concuerda con las altas concentraciones detectadas en este trabajo para las diatomeas bentónicas, especialmente en los tratamientos con SH.

Otro efecto en la estimulación del crecimiento de las diatomeas puede deberse al aumento en la producción de bacterias en los tratamientos con SH. Es posible que las bacterias descompongan a las moléculas de SH [23] conduciendo a una liberación de nutrientes en el medio de cultivo. Por lo tanto, los nutrientes se encuentran

más disponibles para los productores primarios, lo que en nuestros experimentos se ve reflejado en un aumento en las concentraciones de nutrientes en los tratamientos con SH. Especialmente para el caso de *P. sulcata* se esperaba que al final del experimento de crecimiento se encontraran concentraciones más bajas de silicatos debido a la alta demanda de Si para la formación de la valva de esta diatomea. Esto no se correlaciona bien con nuestras expectativas debido a que el mayor crecimiento se muestra en los tratamientos con SH. También sería posible que el Si se encuentre como contaminante en las muestras de las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos. Una caracterización detallada de las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos de Helgoland se presentó en el capítulo 3, donde se discutió que estas muestras estaban formadas principalmente por moléculas de bajo peso molecular. El grado relativamente alto de estimulación del crecimiento de diatomeas por SH de bajo peso molecular puede estar asociado a una respuesta de sensibilización directa de las células, a una respuesta de quelación indirecta, o a ambos factores. Las SH pueden penetrar en la célula vegetal y el grado de

penetración depende del tamaño molecular de las distintas entidades [24]. Las fracciones húmicas de bajo peso molecular tienen alta acidez total y un gran número de grupos carboxílicos responsables de su capacidad de retención de metales. De acuerdo a lo observado por Rashid [25], la fracción de menor peso molecular tiene una capacidad de formación de complejos metálicos de 2 a 6 veces mayor que cualquier otra y la capacidad quelante disminuye con el aumento del peso molecular.

Chen y Wang [26] determinaron la absorción de Fe por la diatomea costera *Thalassiosira pseudonana* y las cianobacterias *Synechococcus sp.*, utilizando entre otros los HA como ligandos modelo. Ellos demostraron que una alta biodisponibilidad de HA-ligados al Fe (III) implica que las SH no sólo son importantes para controlar el comportamiento geoquímico del Fe, sino que también pueden proporcionar Fe al fitoplancton marino, especialmente en los estuarios y aguas costeras. Por otro lado, de los medios de absorción del fitoplancton, se demostró que el Fe enlazado a compuestos orgánicos fue absorbido primero en la superficie celular y luego se dio lugar al intercambio de Fe en los sitios específicos de la superficie antes de la internalización Fe. El alto contenido de grupos carboxílicos

determinados en nuestro trabajo para las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos apoya la posibilidad de este tipo de mecanismo, proporcionando una buena explicación de la abundancia de las diatomeas en nuestros experimentos y a su vez en los sedimentos de Helgoland.

6.4.- CONCLUSIONES

En resumen, a partir de nuestros resultados podemos decir que; la adición de las sustancias del tipo ácido húmico extraídas de los sedimentos marinos al medio de cultivo promueve ligeramente el crecimiento de *Navicula ramosissima*, *Entomoneis palodosa*, *Melosira nummolooides* y *Paralia sulcata*, como

quedó demostrado principalmente por el aumento de la concentración de clorofila *a* y fucoxantina.

Por otro lado, la razón por la cual en general en nuestros experimentos el tratamiento 1 ejerce un mayor efecto estimulante del crecimiento que el tratamiento 2 (con mayor concentración de sustancias húmicas) se ha atribuido a: (i) la absorción selectiva de la luz, que al impartirle un mayor color amarillento a la solución resulta en la reducción de la fotosíntesis [27]; (ii) un efecto de quelación, ya que el exceso de quelante (sustancias húmicas) puede hacer que los iones esenciales para las algas no estén disponibles [28].



Referencias

1. Daehnick, A.E., Sullivan, M.J., Moncreiff, C.A. Primary production of the sand microflora in seagrass beds of Mississippi Sound. *Botanica Marina* **35** (1992) 131–139
2. Pinckney JL, Zingmark RG (1993) Modelling the annual production of intertidal benthic microalgae in estuarine ecosystems. *Journal of Phycology* **29**, 396–407
3. Wolff, W.J. (1979). 'Flora and vegetation of the Wadden Sea'. Report 3 (Final Report of the Section Marine Biology of the Wadden Sea; published by A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands), pp. 206
4. MacIntyre HL, Geider RJ, Miller DC Microphytobenthos: The ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats. 1. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* **19** (1996) 186–201
5. Graham, L. E. & L. W. Wilcox. 2000. Algae. Capítulo 12. Ochrophytes. Part 2. Diatoms.
6. Armbrust, E.V. et al. The genome of the diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* **306** (2004) 79–86
7. Bährs, H. & Steinberg, C.E.W. (2011). Impact of two different humic substances on selected coccal green algae and Cyanobacteria—changes in growth and photosynthetic performance. *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-011-0564-7
8. Wiltshire, K.H., Manly, B.F.J. The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. *Helgoland Marine Research* **58** (2004) 269–273
9. Franke, H-D, Bucholz, F., Wiltshire, K.H. Ecological long-term research at Helgoland (German Bight, North Sea): retrospect and prospect—an introduction. *Helgoland Marine Research* **58** (2004) 223–229
10. Gebühr, C., Wiltshire, K.H., Aberle, N., van Beusekom, J.E.E., Gerdt, G. Influence of nutrients, temperature, light and salinity on the occurrence of *Paralia sulcata* at Helgoland Roads, North Sea. *Aquatic Biology* **7** (2009) 185–197
11. Roelofs, A.K. Distributional patterns and variation of valve diameter of *Paralia sulcata* in surface sediments of Southern British Columbia Inlets. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **18** (1984) 165–176
12. Zong, Y. Implications of *Paralia sulcata* abundance in Scottish isolation basins. *Diatom Research* **12** (1997) 125–150
13. McQuoid, M.R., Nordberg, K. The diatom *Paralia sulcata* as an environmental indicator species in coastal sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **56** (2003) 339–354
14. McQuoid MR, Hobson LA Assessment of palaeoenvironmental conditions on Southern Vancouver Island, British Columbia, Canada, using the marine tychopankter *Paralia sulcata*. *Diatom Research* **13** (1998) 311–321
15. Wilkinson, M., Henderson, A. R. & Wilkinson, C. Distribution of attached algae in estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* **7** (1976) 183
16. Hellebost, J. A. & Guillard, R. R. L. Uptake specificity for organic substrates by the marine diatom *Melosira nummuloides*. *Journal of Phycology*. **3** (1967) 132–136

-
- 17.** McLean, Roger O. , Corrigan, John and Webster, Joan 'Heterotrophic nutrition in *Melosira nummuloides*, a possible role in affecting distribution in the Clyde Estuary', *European Journal of Phycology* **16** (1981) 95–106
- 18.** Prokhotskaya VYu, Steinberg CEW: Differential Sensitivity of a Coccal Green Algal and a Cyanobacterial Species to Dissolved Natural Organic Matter (NOM). *Env Sci Pollut Res* 14, Special Issue **1** (2007) 11–18
- 19.** Prakash A, Rashid MA, Jensen A, Subbarao DV. Influence of Humic Substances on Growth of Marine Phytoplankton - Diatoms. *Limnology and Oceanography* **18** (1973) 516–524
- 20.** Prakash, A., Rashid, M.A. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limnology and Oceanography*. **13** (1968) 598–606
- 21.** Siegel, A. 1971. Metal-organic interactions in the marine environment, p. 265-295. In S. D. Faust and J. V. Hunder [eds.], Organic compounds in aquatic environment. Marcel Dekker.
- 22.** Imai, A., Fukushima, T. & Matsushige, K. Effects of iron limitation and aquatic humic substances on the growth of *Microcystis. aeruginosa*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56** (1999) 1929–1937
- 23.** Bosio, G. N., Gara, P. D., García Einschlag, F. S., Gonzalez, M.C., del Panno, M. T. and Mártire, D. O. Photodegradation of Soil Organic Matter and its Effect on Gram (-) Bacterial Growth. *Photochemistry & Photobiology* **84** (2008) 1126–1132
- 24.** Aso, S., and Sakai, I. Studies on the physiological effects of humic acid. 1. Up-take of humic acid by crop plants and its physiological effects. *Soil Sci. Plant Nutr.* **9** (3) (1963) 1
- 25.** Rashid, M. A. Role of humic acids of marine origin and their different molecular weight fractions in complexing di- and trivalent metals. *Soil Sci.* **111** (1971) 298–306
- 26.** Chen, M., Wang, W-X. Accelerated uptake by phytoplankton of iron bound to humic acids. *Aquat Biol* **3** (2008) 155–166
- 27.** Prakash, A., Rashid, M.A. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limnology and Oceanography*. **13** (1968) 598–606
- 28.** Siegel, A. 1971. Metal-organic interactions in the marine environment, p. 265-295. In S. D. Faust and J. V. Hunder [eds.], Organic compounds in aquatic environment. Marcel Dekker.

Conclusiones Generales