

**Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada**



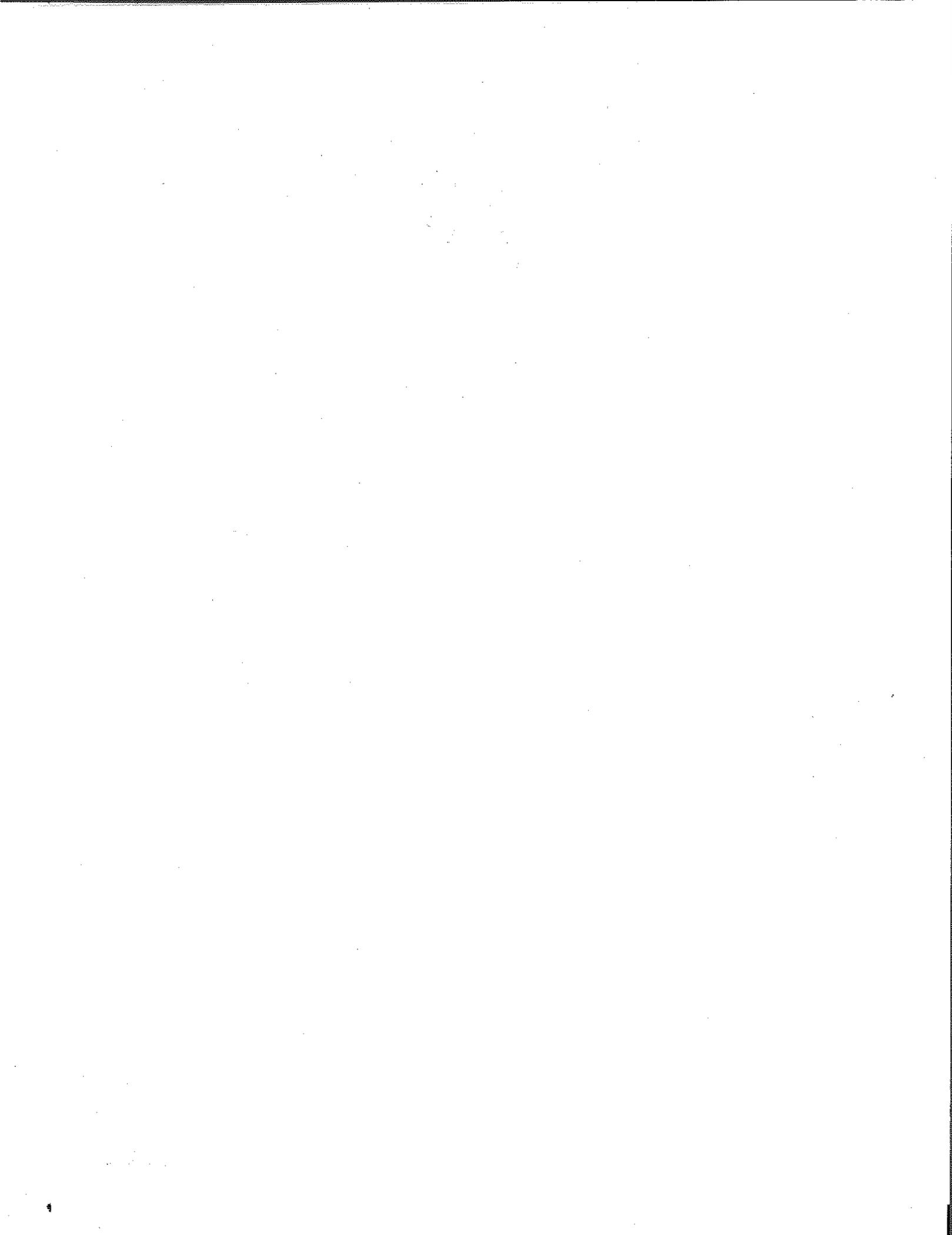
**DISTRIBUCION DE CLOROPLASTOS EN CELULAS  
FITOPLANCTONICAS Y SU RELACION  
CON LA IRRADIANCIA**

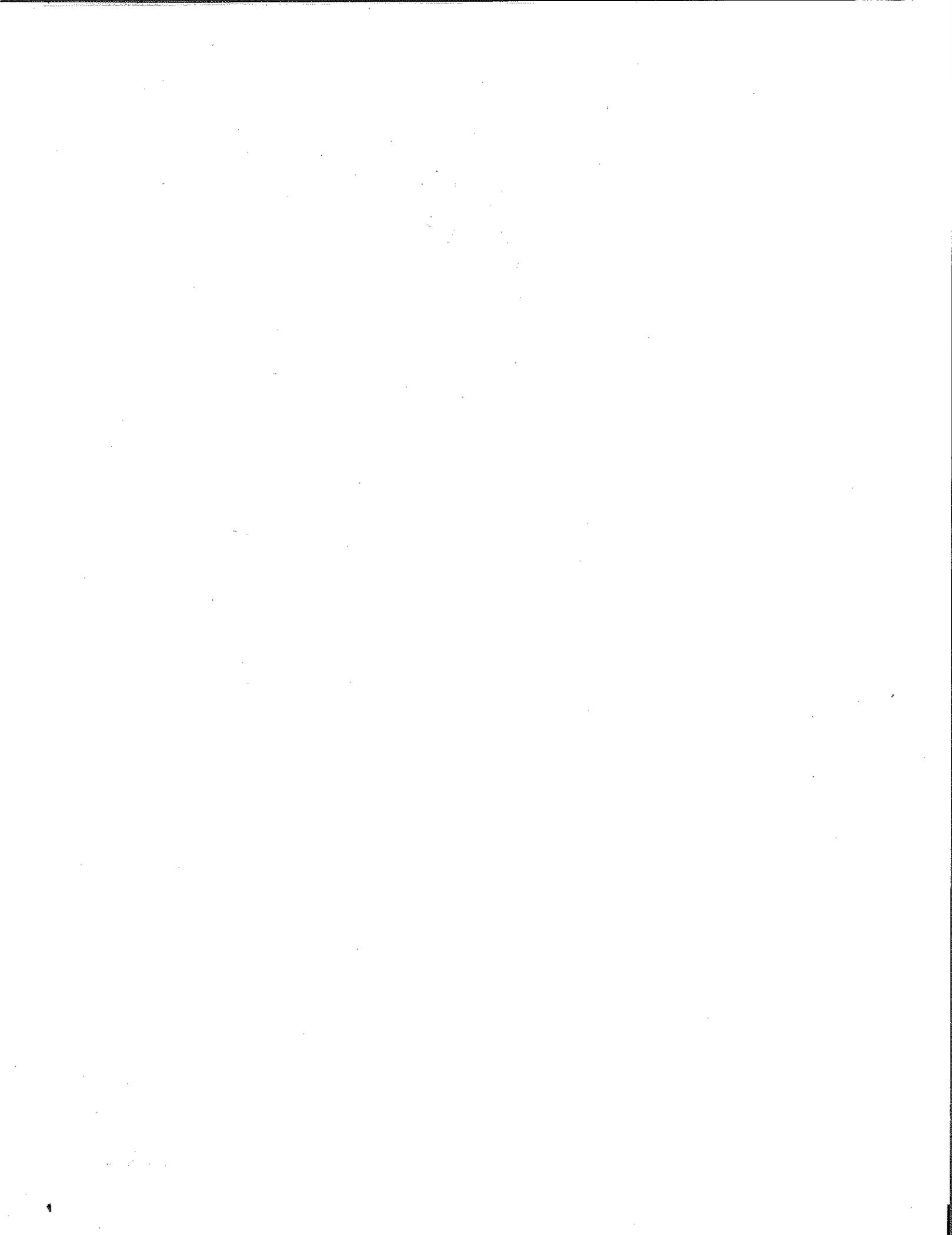
**TESIS  
MAESTRIA EN CIENCIAS**

**OSCAR ANGELES REYES**

Ensenada, B. Cfa. Mexico.

Febrero de 2000.





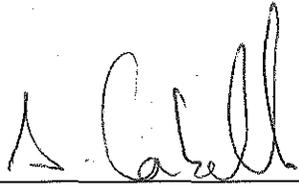
TESIS DEFENDIDA POR  
**Oscar Angeles Reyes**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



---

**Dr. Helmut Maske Rubach**

*Director del Comité*



---

**Dr. Alejandro Cabello Pasini**

*Miembro del Comité*



---

**Dr. Saúl Alvarez Borrego**

*Miembro del Comité*



---

**Dr. Jorge Olmos Soto**

*Miembro del Comité*



---

**Dr. Jaime Färber Lorda**

*Jefe del Departamento de Ecología*



---

**Dr. Federico Graef Ziehl**

*Director de Estudios de Posgrado*

17 de febrero del 2000

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA

División de Oceanología

Departamento de Ecología

**DISTRIBUCIÓN DE CLOROPLASTOS EN CÉLULAS  
FITOPLANCTÓNICAS Y SU RELACIÓN CON LA IRRADIANCIA.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener  
el grado de MAESTRO EN CIENCIAS presenta:

*Óscar Ángeles Reyes*

Ensenada, B. C. México, febrero del año 2000

**RESUMEN** de la tesis de **Óscar Ángeles Reyes** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** en **ECOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Febrero del año 2000.

## **DISTRIBUCIÓN DE CLOROPLASTOS EN CÉLULAS FITOPLANCTÓNICAS Y SU RELACIÓN CON LA IRRADIANCIA.**

Resumen aprobado por:



Dr. Helmut Maske Rubach  
Director de tesis

En células fitoplanctónicas, los cloroplastos pueden cambiar su distribución o forma dentro de las células como respuesta a condiciones ambientales. Diferentes autores han mostrado que cultivos unialgales pueden experimentar decremento en la fluorescencia y absorción de luz, en escalas de tiempo similares a movimientos de cloroplastos (< 1 hora), causados por cambios en iluminación. Se realizaron experimentos con cultivos unialgales de *Thalassiosira weissflogii* y muestras naturales, sometiendo las muestras a altas intensidades luminosas y observando su estructura interna con microscopía de luz de transmisión, además de tratar de conocer el impacto de estos cambios en la absorción de luz en los cultivos utilizando el modelo de eficiencia de absorción específica de Morel y Bricaud. En *Thalassiosira weissflogii* la distribución celular de los cloroplastos no mostró cambios obvios según lo reportado en otras especies, sin embargo, el análisis detallado de las células fitoplanctónicas mostró que en los experimentos 1 y 2 (en incubaciones de 30 minutos) hubo menos cloroplastos por célula visibles estadísticamente de tiempo 0 a 30 minutos, lo que puede indicar un traslape geométrico de los mismos. En el experimento 3 no hubo diferencias estadísticas. Otro parámetro tomado en cuenta para la cuantificación de la distribución celular, fue el cálculo del área de proyección de los cloroplastos en las células (en un plano), en el que se presentaron diferencias estadísticas en los experimentos 1 y 2, en tiempo 0 y después de 30 minutos de alta irradiancia, y en el experimento 3 hubo diferencias estadísticamente significativas entre tiempo 0 y 40 minutos. Entre muestras control y 40 minutos no se encontró diferencia, lo que puede mostrar un factor de control fisiológico no tomado en cuenta. Los datos que generan los experimentos 1 y 2, exhiben una eficiencia de absorción específica que va de 0.13 a 0.87, evidenciándose cambios en absorción debidos a los cambios en las áreas de los cloroplastos y el número de ellos. En muestras naturales tomadas del Golfo de California, se encontraron posibles indicios de migración en especies como *Asterionellopsis glacialis*, *Skeletonema costatum*, y otra diatomea central no identificada. No es posible confirmar estadísticamente lo anterior, ya que haría falta un mayor número de estos organismos.

Palabras clave: fitoplancton, migración de cloroplastos, *Thalassiosira weissflogii*, eficiencia de absorción.

**ABSTRACT** of the Thesis of **Óscar Ángeles Reyes** presented as partial requirement to obtain the **MASTER IN SCIENCES** grade in **MARINE ECOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. February 2000.

## **THE SPATIAL DISTRIBUTION OF CHLOROPLASTS IN PHYTOPLANKTON CELLS AND THE RELATIONSHIPS WITH IRRADIANCE**

### **ABSTRACT**

In phytoplankton the chloroplasts can change their spatial distribution and their form within the cells as a result of ambient conditions. Some authors have used uni-algal cultures to demonstrate a decrease in *in vivo* fluorescence and light absorption induced by changes in irradiance on time scales similar to the movement of chloroplasts (<hour). In this work cultures of *Thalassiosira weissflogii* and natural phytoplankton samples were used in experiments, exposing the samples to high irradiance and observing the intracellular structure under a light microscope. To evaluate the resulting changes of the cellular light absorption efficiency the model by Morel and Bricaud was used. In *Thalassiosira weissflogii* the cellular distribution of the chloroplasts showed no easily detectable changes similar to those reported in the literature. Nevertheless a more detailed analysis showed that in the experiments 1 and 2 (under high light exposure of 30 minutes duration) statistically less chloroplasts were visible in the cells. This might be due to a geometric overlap of chloroplasts. In experiment 3 no significant changes were observed. Another parameter used to document intracellular changes in the distribution was the chloroplast - area of projection. Significant changes were found within 30 minutes in the experiments 1 and 2. In experiment 3 the sample at 0 and 40 minutes showed significant differences but no difference was found between the control sample and the sample at 40 minutes. This latter result might indicate a driving factor not yet considered. Using the data from experiments 1 and 2 as a basis, the model calculations resulting in changes in relative absorption efficiency between 0.13 and 0.87, thus indicating significant changes in the absorption properties of the phytoplankton cells due to changes in the area of projection and number of chloroplasts visible. In natural samples from the Gulf of California the microscopic samples point to irradiance-induced changes in the chloroplast distribution in the diatom species *Asterionellopsis glacialis*, *Skeltonema costatum*, and other unidentified species. Because of the low cell numbers of each species in the samples the changes in distribution could not be confirmed statistically.

**Keywords:** phytoplankton, migration of chloroplasts, *Thalassiosira weissflogii*, relative absorption efficiency.

## DEDICATORIA

*Al buen Helmut Maske*

*A Mary, en los buenos y los malos tiempos*

*A mis padres y hermanos, porque el trabajo es de todos*

## AGRADECIMIENTOS

De manera particular a al director de este trabajo, Dr. Helmut Maske Rubach, por su ayuda en todo momento.

Por sus comentarios, críticas y sugerencias, a los miembros de mi comité de tesis: Dr. Saúl Álvarez Borrego, Dr. Jorge Olmos Soto y Dr. Alejandro Cabello Pasini.

A mis amigos y compañeros, siempre dispuestos a ayudar. Especialmente a Cesar Almeda, Enrique Rivero, Fernando Escoto y Adriana Lucía Romero.

A Ramón Cajal, por su apoyo y comentarios.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## CONTENIDO

	Página
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	1
I.1 Fitoplancton	1
I.2 Morfología celular (cloroplastos)	1
I.3 Ambiente luminoso	2
I.4 Respuestas adaptativas del fitoplancton a diferentes condiciones luminosas	3
I.5 Migración de cloroplastos en las células de tejidos de macroalgas y plantas superiores ante diferentes intensidades luminosas	6
I.6 Mecanismos de transporte celular de cloroplastos	10
I.7 Migración de cloroplastos en células fitoplanctónicas como mecanismo de aclimatación a los cambios en iluminación	13
I.8 Mecanismos de migración de cloroplastos en fitoplancton	17
I.9 Función del arreglo de cloroplastos	18
I.10 Absorción de células en suspensión	20
I.10.1 Absorción y densidad óptica	20
I.11 Modelo para cuantificar la absorción de luz del fitoplancton con cambios en su arreglo de cloroplastos	22
I.11.1 Antecedentes	22
I.12 Eficiencia de absorción específica	26
<b>II JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	27
II.1 Objetivos generales	27
II.2 Objetivos específicos	28
II.3 Hipótesis	28
<b>III MÉTODOS</b>	30
III.1 Cultivos	30
III.2 Eficiencia de absorción específica (Morel y Bricaud, 1981)	32
III.3 Muestras naturales	34
<b>IV RESULTADOS</b>	40
IV.1 Orientación de los cloroplastos en <i>Thalassiosira weissflogii</i>	40
IV.2 Áreas de los cloroplastos en <i>Thalassiosira weissflogii</i>	41
IV.3 Impacto de los fijadores	50
IV.4 Eficiencia de absorción	50
IV.5 Muestras naturales	55
<b>V DISCUSIÓN</b>	66

<b>VI CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>VII RECOMENDACIONES</b>	<b>82</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>83</b>

Figura	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	Página
1	Posición de los cloroplastos en células de tejidos de plantas y macroalgas ante diferentes irradiancias. La flecha indica flujo de fotones.	9
2	Arreglo de cloroplastos en fitoplancton con diferentes condiciones luminosas en los experimentos de Kiefer (1973). La flecha indica flujo de fotones.	14
3	A) Proyección de una sombra por las diferentes interacciones de la luz y una partícula absorbente, con índice de refracción real de la partícula igual al del medio. B) Interacciones ópticas de la luz con una partícula absorbente con índice de refracción real de la partícula diferente al del índice de refracción del medio.	24
4	"Efecto de paquete" y volumen celular. La densidad de las líneas en los círculos es proporcional a la concentración de pigmentos, los círculos indican la periferia del protoplasma que contiene los cloroplastos; se presentan los siguientes casos: 1) migración de cloroplastos (el tamaño de célula es constante), 2) división celular (el tamaño celular cambia proporcionalmente a los círculos) y 3) aclimatación (el tamaño de las células no cambia).	25
5	Eficiencia de absorción específica ( $Q^*a$ ) de <i>Thalassiosira eccentrica</i> para el pico de absorción en el rojo, con cambios en su tamaño, suponiendo un contenido celular igual de pigmentos y el volumen pigmentado como esférico. Las especificaciones teóricas son: 32.3 $\mu\text{m}$ de diámetro promedio de la célula, concentración de celular clorofila de 41.2 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ), absorción específica de la suspensión ( $a^*(\text{cm})$ ) de 0.017 a 675 nm (Haardt y Maske, 1987).	29
6	Esquema de la iluminación en experimentos con cultivos unialgales.	36
7	Diagrama de flujo típico de los experimentos 1, 2 y 3 con cultivos unialgales.	37
8	Esquema para cuantificar el área de la distribución de los cloroplastos en muestras unialgales. Vista en un plano de células en diferentes tiempos (A y B), y el "largo" y "ancho" que cubren los cloroplastos en ella, que se midieron para posteriormente determinar el área	38

Figura	<b>LISTA DE FIGURAS</b> (continuación)	Página
9	Esquema para el cálculo del efecto óptico que puede inducir la migración de cloroplastos. Célula esférica con diferente posición de cloroplastos (A y C), y diferentes áreas de absorción correspondientes (área gris) (B y D).	39
10	Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en <i>Thalassiosira weissflogii</i> en el experimento 2, tiempo 0 (A) y después de 30 minutos en alta irradiancia (B). La barra es de 10 mm en ambas figuras.	43
11	Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en <i>Thalassiosira weissflogii</i> en el experimento 3, tiempo 0 (A) y después de 40 minutos en alta irradiancia (B). La barra es de 10 mm en ambas figuras.	44
12	Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en <i>Thalassiosira weissflogii</i> en tiempo 0 (A), después de 60 (B) y de 120 minutos en alta irradiancia (C). La barra es de 10 mm en las figuras.	45
13	Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en <i>Thalassiosira weissflogii</i> en tiempo 0 (A), después de 60 (B) y de 120 minutos en oscuridad (C). La barra es de 10 mm en ambas figuras.	46
14	Figura A, número de cloroplastos visibles. Figura B, áreas de cloroplastos en células. Experimento 1 con <i>Thalassiosira weissflogii</i> , en muestras fijadas con glutaraldehído.	47
15	Figura A, número de cloroplastos visibles. Figura B, áreas de cloroplastos en células. Experimento 2 con <i>Thalassiosira weissflogii</i> , en muestras fijadas con glutaraldehído.	48

Figura	<b>LISTA DE FIGURAS</b> (continuación)	Página
16	Figura A, número de cloroplastos visibles. Figura B, áreas de cloroplastos en células. Experimento 3 con <i>Thalassiosira weissflogii</i> .	49
17	Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en <i>Thalassiosira weissflogii</i> <i>in vivo</i> en tiempo 0 (A) y después de 40 minutos en alta irradiancia (C). La barra es de 10 mm en las figuras.	52
18	Eficiencia de absorción específica ( $Q^*a$ ) versus diámetro del volumen celular pigmentado para el pico de absorción en el rojo (se supone que $a^*_{sol} = 0.02 \text{ (m}^2/\text{mg)}$ ). El ejemplo está calculado con la geometría y concentración celular presentados en los experimentos 1 y 2 con <i>Talassiosira weissflogii</i> . La concentración de clorofila en el cultivo fue de $243.5 \text{ mg/m}^3$ (el contenido celular de clorofila de $1.17 \times 10^{-9} \text{ mg/m}^3$ ), y el número de células $2.08 \times 10^{11} \text{ cel/m}^3$ .	53
19	Eficiencia de absorción específica ( $Q^*a$ ) versus diámetro del volumen celular pigmentado para el pico de absorción en el rojo (se supone que $a^*_{sol} = 0.02 \text{ (m}^2/\text{mg)}$ ). El ejemplo está calculado con la geometría y concentración celular presentados en el experimento 3 con <i>Talassiosira weissflogii</i> . La concentración de clorofila en el cultivo fue de $407.84 \text{ mg/m}^3$ (el contenido celular de clorofila de $1.75 \times 10^{-9} \text{ mg/m}^3$ ), y el número de células $2.33 \times 10^{11} \text{ cel/m}^3$ .	54
20	<i>Eucampia cornuta</i> . Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figura A, tiempo 0 fijada con formol. Figura B muestra después de tratamiento experimental fijada con formol. Figura C, muestra después de tratamiento experimental fijada con glutaraldehído. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.	57

Figura	<b>LISTA DE FIGURAS</b> (continuación)	Página
21	<i>Asterionellopsis glacialis</i> . Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figuras A y B tiempo 0; C, D, E y F, después tratamiento experimental. La figura F corresponde a una muestra fijada con glutaraldehído, el resto con formol. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto; los cloroplastos se señalan en los rectángulos.	58
22	<i>Ceratium furca</i> . Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figuras A y B (sección de A) en tiempo 0, fijadas con formol. Figuras C y D, después de tratamiento experimental, fijadas con glutaraldehído. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.	59
23	<i>Chaetoceros costatus</i> . Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figura A, tiempo 0, muestra fijada con formol. Figura B, después de tratamiento experimental, mismo fijador. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.	62
24	<i>Leptocylindrus minimus</i> . Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figura A, tiempo 0; figura B después de tratamiento experimental. Ambas muestras fijadas con formol. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.	63
25	<i>Skeletonema costatum</i> . Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figura A, tiempo 0 fijada con formol. Figura B y C después de tratamiento experimental, fijadas con glutaraldehído y formol, respectivamente. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.	64

Figura	<b>LISTA DE FIGURAS</b> (continuación)	Página
26	Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Diatomea central en tiempo 0 (figuras A y B), y después de la irradiancia experimental (C y D), estas últimas son el mismo organismo con diferente enfoque en el microscopio. Todas fijadas con formol. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.	65
27	Distribución aleatoria de cloroplastos en el volumen celular. 1 a, observación en el microscopio, donde cada círculo representa la misma célula observada en diferentes niveles de enfoque; 1b, arreglo de los cloroplastos real en la misma célula, no observado en un nivel de enfoque poco profundo; 1 c, vista en perspectiva de la ubicación de los cloroplastos en esa célula. 2 a y b, ubicación real de los cloroplastos en una célula; 2 c, efecto de sombreado de los cloroplastos, que se notan como dos o tres en el microscopio, siendo cinco en realidad.	76
28	Curvas P vs. E con diferente posición de los cloroplastos. Caso I: se espera que la curva alcance más rápidamente $P_{\text{max}}$ (fotosíntesis máxima) por la óptima captación de luz por los cloroplastos (a), y una mayor inclinación de la pendiente inicial por el reacomodo de cloroplastos ante una alta intensidad luminosa (b). En el caso II, los cloroplastos en acomodo de alta irradiancia regulan la cantidad de luz que llega a los fotosistemas, con una pendiente muy inclinada (a); posteriormente, ante la reducción de la intensidad los cloroplastos se acomodan optimizando la absorción, y esto es evidente en la pendiente, que alcanza más rápidamente $P_{\text{max}}$ (b)	79

Tabla	LISTA DE TABLAS	Página
I	Respuestas de aclimatación del fitoplancton a la irradiancia y su tiempo de respuesta.	5
II	Especies de macroalgas y plantas superiores reportadas con migración de cloroplastos.	8
III	Especies fitoplanctónicas reportadas con migración de cloroplastos.	15

# I INTRODUCCIÓN

## I.1 Fitoplancton

Los organismos fotosintéticos unicelulares que flotan libremente en el agua son llamados fitoplancton, y en ambientes marinos y dulceacuícolas representan principalmente la base de cualquier cadena trófica. El tamaño de las células fitoplanctónicas es muy variado, y va de menos de 1 hasta 200  $\mu\text{m}$ . Las clases más comunes del fitoplancton eucarionte en el océano son la Bacillariophyceae, Dinophyceae, Prymnesiophyceae y Cryptophyceae; de éstas, las dos primeras son los más comunes en aguas oceánicas y costeras (Parsons *et al.*, 1995). El fitoplancton procarionte está representado por la clase Cyanophyceae (Falkowski y Raven, 1997).

## I.2 Morfología celular (cloroplastos)

La fotosíntesis es la conversión de energía luminosa en energía química, que es almacenada en forma de compuestos orgánicos de carbono; el proceso implica la absorción de los fotones por moléculas de pigmentos fotosintéticos y la conversión de las moléculas excitadas en potencial electroquímico. En células eucarióticas, el aparato fotosintético (incluidos las antenas fotosintéticas y los fotosistemas I y II) está organizado en organelos especiales, los cloroplastos. Los cloroplastos son organelos semiautónomos cerrados por revestimientos que tienen

capas alternadas de membranas lipoprotéicas (tilacoides) formando bolsas con el lumen dentro, y la fase acuosa (el estroma) fuera de los tilacoides, que contiene ADN funcional, los diferentes tipos de ARN (para hacer transcripción y traducción) y las enzimas del ciclo de Benson-Calvin para la reacción oscura de la fotosíntesis (Falkowski y Raven, 1997). En algas multicelulares y unicelulares, puede haber sólo 1 cloroplasto por célula, en pares o más de 100, en tamaños de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y formas diversas: de estrella, helicoidal, de plato, rectangular, alargados o irregulares (Kirk, 1994), y con un arreglo geométrico muy diverso (en el centro de la célula, a lo largo de ella, en los extremos o agrupados, dependiendo en cierta medida de la forma de la célula).

### **1.3 Ambiente luminoso**

En el ambiente natural, la radiación solar (*luz*) puede mostrar cambios en su magnitud debido a factores temporales (ciclos diurnos, estacionales o anuales) y espaciales (diferente localización en la tierra o profundidad). La luz, como recurso para organismos fotosintéticos, existe sólo en la capa superficial del mar y tiene una disminución exponencial con la profundidad debido a la absorción y esparcimiento del agua en sí, y de la materia disuelta y suspendida en ella. Los factores más importantes que afectan la disponibilidad de la luz en la columna de agua son los ciclos diurnos de luz solar y la nubosidad, con periodos entre  $10^0$  y  $10^4$  segundos (Falkowski, 1984), lo cual caracteriza un ambiente dinámico en

escalas cortas de tiempo. Además de esto, los organismos no tienen una distribución uniforme en el espacio y tal heterogeneidad ocurre en todas las escalas espaciales e incluso temporales: en condiciones marinas, el movimiento de la columna de agua (mezcla turbulenta, celdas de Langmuir), es uno de los mecanismos más importantes que afectan la distribución espacial del fitoplancton y su exposición a diferentes niveles de luz. Esta exposición del fitoplancton a diferentes niveles de irradiancia en diferentes períodos, hacen necesarios sistemas efectivos para adaptar su aparato fotosintético.

#### **I.4 Respuestas adaptativas del fitoplancton a diferentes condiciones luminosas**

Las células fitoplanctónicas tratan de optimar el uso de la irradiancia disponible con diferentes respuestas de aclimatación, que incluyen variaciones morfológicas y bioquímicas expresadas en los siguientes parámetros: 1) el contenido celular de pigmentos fotosintéticos, 2) la relación entre concentraciones de los diferentes pigmentos, 3) el cambio de la función de algunos de los pigmentos (e.g. ciclo de las xantofilas), 4) el tamaño y número de las unidades fotosintéticas (composición relativa), 5) la concentración y actividad específica de enzimas para la reacción oscura de la fotosíntesis, 6) y el arreglo geométrico de las membranas tilacoidales y los cloroplastos dentro de la célula (Brown y Richardson, 1968; Falkowski y Owens, 1980; Falkowski y Raven, 1997; Parsons *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 1983; Steemann-Nielsen y Park, 1964). Los diferentes

l), que cubren períodos en cambios de luz. Por ejemplo, en el caso de la estratificación hidrográfica, las células cerca de la termoclina probablemente tienen un contenido celular de pigmentos más altos que las células cerca de la superficie. En el caso de un paso temporal de nubes, el ciclo de las xantofilas permite ajustar en cierto margen el flujo de excitones (la energía de los fotones después de ser capturados por las antenas) recibido por los centros de reacción de los fotosistemas.

El ciclo de las xantofilas y otros procesos de reducción no fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila *a* (non-photochemical quenching, por su nombre en inglés), son, por escalas de tiempo, el único fenómeno de aclimatación del fitoplancton que se da en un tiempo similar a la migración de cloroplastos. El ciclo de las xantofilas se define como la conversión reversible, dependiente de la luz, de una xantofila en otra en la antena fotosintética (Demming-Adams, 1990) mediante la pérdida de oxígeno en un ciclopropano (Loudon, 1984); en el caso de la diadinoxantina, ésta pierde oxígeno para formar la diatoxantina en alta luz, convirtiéndose de un pigmento accesorio a un sumidero de excitones.

Tabla I. Respuestas de aclimatación del fitoplancton a la irradiancia y su tiempo de respuesta.

Respuesta de aclimatación a la irradiancia del fitoplancton	Tiempo aproximado de Respuesta ( $\Delta t_{1/2}$ )*
Cambio en el contenido total de pigmentos fotosintéticos (1)	.5 a 3 días, o un tiempo de generación**
Relación de concentración entre los diferentes pigmentos (1)	.5 a 3 días, o un tiempo de generación
Cambio en el tamaño y número de unidades fotosintéticas (2)	Respuesta de largo plazo (> 0.01 día)
Síntesis y activación de enzimas para la reacción oscura	Respuesta de largo plazo (> 0.01 día)
Fotofosforilación (2)	< 10 minutos
Ciclo de las xantofilas (2):	
a) Violaxantina a antenaxantina, y ésta a zeaxantina (en plantas superiores y algas verdes).	1 a 10 minutos: de epoxidación 1 minutos, epoxidación 10***
b) Diadinoxantina a diatoxantina (algas cromofitas, diatomeas)	5 a 10 minutos****
Arreglo geométrico de los cloroplastos dentro de la célula	< 1 hora*****

\*Período medio para llegar al ajuste fisiológico.

\*\*Falkowski y Raven, 1997; Post *et al.*, 1984.

\*\*\*Porra *et al.*, 1997;

\*\*\*\*Olaizola y Yamamoto, 1994.

\*\*\*\*\*Kiefer, 1973; Mann, 1996; Stephens, 1995.

(1) Considerando que no hay síntesis de Chl*a* en la oscuridad.

(2) Procesos de reducción no fotoquímica.

## **I.5 Migración de cloroplastos en las células de tejidos de macroalgas y plantas superiores ante diferentes intensidades luminosas**

Existe mucha información sobre migración de cloroplastos en macroalgas y plantas superiores, para aprovechar esta información y poner en perspectiva el fenómeno, se discute primero el reposicionamiento de cloroplastos en tejidos.

En muchas plantas o macroalgas, como regla general la distribución geométrica de los cloroplastos dentro de la célula varía típicamente con la intensidad de luz. En baja irradiancia, los cloroplastos se encuentran distribuidos cerca de las paredes, en una posición perpendicular al flujo de fotones, lo que habilita al cloroplasto para absorber más luz; caso contrario del arreglo ante una alta irradiancia (por ejemplo el medio día solar), donde el fin parece la protección ante la posibilidad de un daño causado por la cantidad de luz (Haupt, 1973; Wagner y Grolig, 1992) (Fig. 1). En la tabla II se presentan una lista no completa de especies reportadas en la literatura con migración de cloroplastos, que da un buen indicio de que la migración de cloroplastos es un fenómeno común en macroalgas.

Cambios en la distribución de cloroplastos inducidos por la irradiancia han sido observados en algas multicelulares pardas y rojas. Nultsch y Pfau (1979) investigaron 42 especies de algas multicelulares: 16 pardas, 20 rojas y 6 verdes, y encontraron desplazamiento de cromatóforos bien definidos en las primeras y las segundas, y en una especie de algas verdes (aunque el desplazamiento de

cloroplastos fue siguiendo ritmos circadianos). En tres especies de algas pardas hubo cambios simultáneos en la transmitancia de luz por el tejido, sin embargo, en el resto de las especies, y las algas rojas, no hubo una clara correlación. Larkum y Barret (1983) deducen en una revisión de la literatura, que la evidencia en el movimiento de cloroplastos y el cambio conformacional no apoyan la idea de que las migraciones afecten grandemente las propiedades de dispersión y absorción de la luz en las algas multicelulares. Parece ser, por otro lado, que en organismos compuestos por diversas capas de células los cambios en absorción debidas al desplazamiento de cromatóforos son muy pequeños (Nultsch y Pfau, 1979). En un trabajo posterior, Nultsch *et al.* (1981) buscaron correlación entre el arreglo de cromatóforos y la actividad fotosintética en algas, y cambios en la transmitancia con luz blanca y azul, y llegaron a la conclusión de que la tasa fotosintética fue independiente del arreglo de cromatóforos correspondiente; aluden, también, que el movimiento en alta intensidad luminosa, y el consecuente decremento de la absorción, puede ser un mecanismo del alga contra el foto daño, misma conclusión a la que llegan Halnet y Nultsch (1991).

Tabla II. Especies de macroalgas y plantas superiores reportadas con migración de cloroplastos.

Especie	Causa de la migración	Fuente
<b>Algas pardas</b>		
<i>Laminaria</i> spp.	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Dictyota dichotoma</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979; 1981.
<i>Fucus</i> spp.	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Ascopillum nodosum</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Fucus spiralis</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Fucus vesiculosus</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Fucus serratus</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Halidrys siliquosa</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Laminaria digitata</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Laminaria saccharina</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Laminaria hyperborea</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Petalonia zosterifolia</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Punctaria plantaginea</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<i>Petalonia fascia</i>	Irradiancia PAR*	Nultsch y Pfau, 1979.
<b>Algas verdes-amarillas</b>		
<i>Vaucheria sessilis</i>	Irradiancia azul	Williamson, 1993.
<i>Vaucheria</i> spp.	Irradiancia PAR*	Haupt, 1973.
<b>Algas verdes</b>		
<i>Ulva lactuca</i> L.	Ritmos circadianos	Nultsch <i>et al</i> , 1981.
<i>Ernodesmis verticillata</i>	No definido	Williamson, 1993.
<i>Bryopsis</i> spp.	Irradiancia PAR	Williamson, 1993.
<i>Dichotomisiphon</i> spp.	Irradiancia PAR	Williamson, 1993.
<i>Mougeotia</i> spp.	Irradiancia azul, UV-A y UV-B	Kraml, 1999; Smith, 1989; Haupt, 1973.
<i>Acetabularia mediterranea</i>	No definido	Williamson, 1993.
<b>Plantas superiores</b>		
<i>Lemna trisulca</i>	Presencia de calcio e irradiancia azul	Tlalka y Gabry's, 1993; Smith, 1989.
<i>Vallisneria spiralis</i>	Irradiancia azul (440-480nm)	Smith, 1989.
<i>Mesotaenium</i>	Irradiancia azul (440-480nm)	Smith, 1989.
<i>Oxalis oregana</i>	Irradiancia azul	Brugnoli y Bjökman, 1992
<i>Helianthus annuus</i>	Irradiancia azul	Brugnoli y Bjökman, 1992
<i>Marah fabaceus</i>	Irradiancia azul	Brugnoli y Bjökman, 1992
<i>Cyrtomium falcatum</i>	Irradiancia azul	Brugnoli y Bjökman, 1992

\* El arreglo es de cromatóforos (cloroplastos en algas cromofitas).

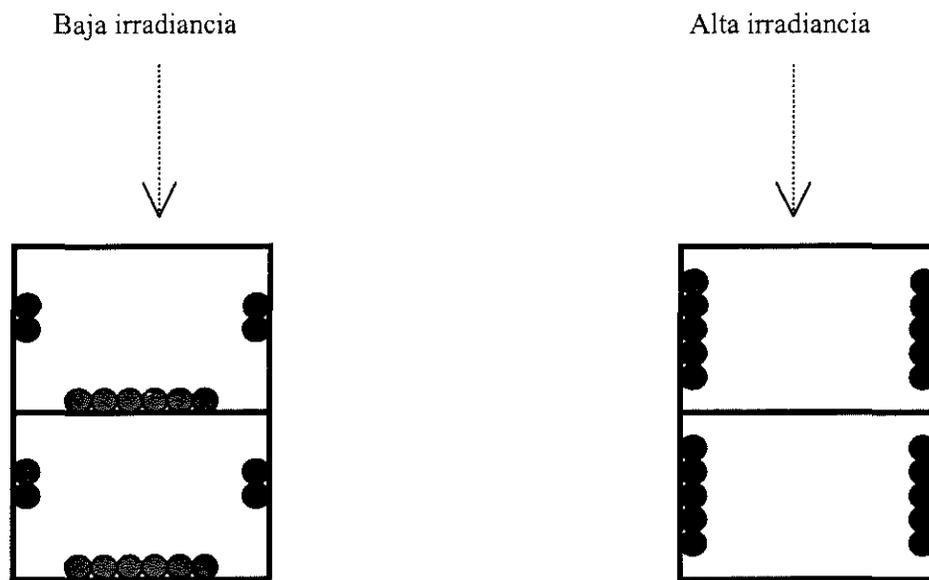


Figura 1. Posición de los cloroplastos en células de tejidos de plantas y macroalgas ante diferentes irradiancias. La flecha indica flujo de fotones.

En otro trabajo, Brugnoli y Björkman (1992) encontraron en plantas superiores que la inducción del movimiento de cloroplastos por luz azul (< 500nm) causó cambios en la emisión de fluorescencia de la clorofila y absorptancia de diferentes especies de plantas, y demostraron que el movimiento de cloroplastos puede tener un efecto significativo en la eficiencia de la utilización de la luz en la fotosíntesis. También examinaron el impacto de la migración de cloroplastos inducida por la luz en mediciones de absorción, y la depoxidación de violaxantina a zeaxantina, y encontraron que los cambios en la transmitancia de estos dos fenómenos son parecidos en principio, pero finalmente exhiben una cinética diferente.

Se concluye en general, que no está claramente establecida la funcionalidad de la migración de cloroplastos en macroalgas y plantas superiores.

### **1.6 Mecanismos de transporte celular de cloroplastos**

En una revisión reciente, Wagner y Grolig (1992) refieren dos sistemas de movilidad celular de cloroplastos: el basado en microtúbulos no relacionado directamente con la luz, siguiendo ritmos circadianos, y el basado en los filamentos de actina, dependiendo de la calidad y dirección de la luz, definido este último en un orden secuencial de acción:

- 1) Un receptor (pigmento fitocromo) recibe la señal de luz diferenciando en

orientación e intensidad.

- 2) Un sensor-traductor convierte la señal en un mensaje químico.
- 3) Un efector que responde de acuerdo a la información recibida.

De acuerdo a esto, según sea la fotoseñal, los cloroplastos comienzan a acomodarse en una nueva posición con respecto a la dirección de la luz (información escalar vs. información vectorial). En adición, algunas plantas tienen un arreglo diferente de cloroplastos en la oscuridad por la relajación del citoplasma, el cual es una distribución aleatoria.

El pigmento fotomorfogénico y fotomodulador, fitocromo, induce en plantas diversas foto respuestas, tales como la germinación y el florecimiento, pero también el movimiento de cloroplastos en *Meugeotia*, *Mesotaenium* y *Adiantum*. Por iluminación parcial del alga *Meugeotia* y la evaluación en la respuesta de los cloroplastos, el fitocromo ha mostrado dar información de la calidad y dirección de la luz viable para la fotosíntesis, de tal manera que, por ejemplo, un fotón de luz roja ( $\lambda$  max = 660nm), convierte a  $P_r$  en cuestión de milisegundos en  $P_{fr}$  (fitocromos: I y II respectivamente), y gradientes de concentración en la célula, dependiendo de la luz incidente. El  $P_{fr}$  es reversible con un fotón de luz infra roja ( $\lambda$  max = 730nm) o en oscuridad; entonces, el fitocromo es considerado un interruptor, que puede activar foto-respuestas (Wagner y Grolig, 1992). En *Meugeotia*, después de cambiar el gradiente de fitocromo por cambios en la

dirección o calidad de la luz incidente, los cloroplastos, que están conectados con el citoplasma, se mueven en dirección de  $P_r$ , y la reordenación de cloroplastos finalmente se da.

Wagner y Grolig (1992) concluyen que el "aparato-motor" de la migración de cloroplastos son los filamentos de la actina y miosina. La alineación de los filamentos de actina en sitios donde el extremo de los cloroplastos y citoplasma están unidos, muestra que la actin-miosina genera la fuerza para la orientación en una dirección radial en células cilíndricas, sin embargo el movimiento también es tangencial, lo que indica la existencia de filamentos de actina de forma lateral. Consecuentemente, la velocidad de la migración de cloroplastos en *Meugeotia* y *Mesotaenium* no resulta meramente de la velocidad de la interacción de la actina y la miosina, como es el caso de los movimientos traslacionales (por ejemplo el flujo citoplasmático), sino de los movimientos laterales también.

En el fitoplancton no existe el sistema de fitocromo. Debe de existir otro sistema receptor (por ejemplo de "luz azul") y otro sistema para controlar la distribución de los cloroplastos dentro de la célula.

## **I.7 Migración de cloroplastos en células fitoplanctónicas como mecanismo de aclimatación a los cambios en iluminación**

Senn, en 1919, observó desplazamiento de cloroplastos en las diatomeas mediados por la luz (citado por Chen y Li, 1991), y un patrón conocido es: a) en *bajas intensidades luminosas*, cloroplastos distribuidos en toda la célula, y una agrupación en los extremos en altas intensidades (Fig. 2), y b) un cambio en la forma y distribución de un solo cloroplasto en la célula (en la clase *Clorophyceae*); las especies reportadas con migración de cloroplastos se enlistan en la tabla III. Kiefer (1973) mostró que cultivos unialgales exhibieron un decremento en la fluorescencia paralelo a movimientos de cloroplastos causados por cambios en iluminación. Graham y Piccinin (1977) refieren la agrupación de cloroplastos en lugares específicos de la célula ante diferentes intensidades luminosas, y sugieren cambios en el espacio de los tilacoides que pueden ser relacionados con variaciones de la fluorescencia. Graham (1980) señala efectos de esparcimiento a nivel tilacoidal y relaciona la absorbancia con el tamaño de la célula y el efecto paquete, además sugiere evidencia no microscópica (no basada en la observación) de movimiento o arreglo de cloroplastos. Mann (1996) menciona una gran variedad de diatomeas que presentan éste mecanismo, aunque no define su función.

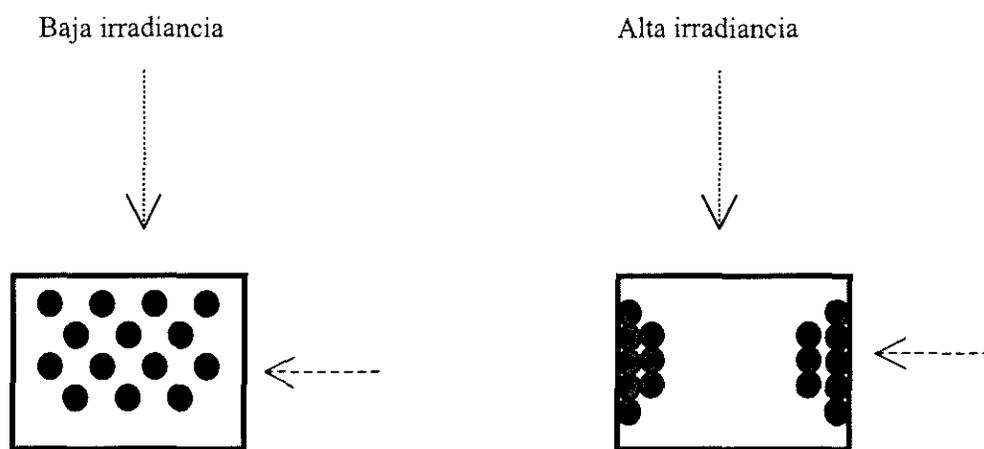


Figura 2. Arreglo de cloroplastos en fitoplancton con diferentes condiciones luminosas en los experimentos de Kiefer (1973). La flecha indica flujo de fotones.

Tabla III. Especies fitoplanctónicas reportadas con migración de cloroplastos.

Espece fitoplanctónica	Causa de la migración de cloroplastos	Referencia
<b>Dinoflagelados</b>		
<i>Pyrocystis Murray Ex Haeckel</i>		Seo y Fritz, 1999.
<i>Pyrocystis lunula</i>	Luz intensa	Sthephens, 1995.
<b>Diatomeas</b>		
<i>Biddulphiopsis titiana</i>	Migración de cloroplastos en fase oscura (12:12 h luz-oscuridad) y acidificación del medio	Mann, 1996.
<i>Ditylum brightwellii</i>	Luz intensa; flujo neto de iones en ciclos de luz-oscuridad*	Mann, 1996; Chen y Li, 1991.
<i>Striatella unipunctata</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Triceratium</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Amphitetras</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Licmophora</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Actinocyclus</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Chaetoceros</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Cordehron</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Dactylosolen</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Rhizosolenia</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Stephanopyxis</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Thalassiosira</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Thalassiothrix</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Trichotoxon</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Pleurosigma</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Nitzschia</i>	Irradiancia PAR	Mann, 1996.
<i>Lauderia borealis</i>	Irradiancia PAR **	Kiefer, 1973.
<i>Pleurosira laevis</i>	Estimulación eléctrica	Makita y Shihira-Ishikawa, 1997.
<i>Cymatopleura solea</i>	Migración después de la mitosis	Williamson, 1993.

\* Fijado en glutaraldehído al 1% por 30 minutos, y posteriormente en OsO<sub>4</sub> al 0.2% por 30 minutos.

\*\* Fijado con solución Altmann (partes iguales de 2% (w/v) OsO<sub>4</sub> y 5% (w/v) K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, por una hora.

Kiefer (1973), en su trabajo realizó cultivos unialgales de diatomeas, midiendo después de 30 minutos de oscuridad (y en el transcurso de una fuerte iluminación), la fluorescencia *in vivo*, concentración de clorofila *a* y absorción de células en suspensión (con fluorimetría y espectrofotometría, respectivamente), utilizando la microscopía de contraste de fase para definir visualmente la migración de cloroplastos. Los resultados mostraron que después de 20 minutos, la fluorescencia de la clorofila *a* fue la mitad de la que al inicio del experimento, necesitando treinta minutos para recobrar sus valores preliminares. Este experimento y posteriores, indicaron que el decaimiento de la fluorescencia consistía de un componente rápido y uno lento: el primero se daba en los dos primeros minutos de exposición, mientras que el segundo se hacía presente entre los cinco y diez minutos, requiriendo de hasta una hora para completarse. Kiefer (1973) observó que los componentes lento y rápido de la fluorescencia coincidieron con la redistribución de los cloroplastos dentro de la célula. En la oscuridad o en irradiancia moderada, los cloroplastos se distribuyeron en toda la célula, mientras que ante una intensa irradiancia éstos se movieron a los extremos, formando agregados de igual tamaño. Es importante mencionar que esto último estuvo correlacionado con una reducción de hasta un 40% en la absorción de células en suspensión. Es probable, sin embargo, que los cambios en la fluorescencia *in vivo*, reportados por Kiefer, sean producto de la reducción no fotoquímica, *i.e.* el ciclo de las xantofilas o la fotofosforilación (mecanismos que afectan la eficiencia de la migración de excitones hacia los centros de reacción), ya que los datos no permiten interpretar claramente qué efecto fisiológico tenía el

movimiento de cloroplastos.

En poblaciones naturales de fitoplancton, Graham (1980) encuentra patrones muy complejos en mediciones de fluorescencia, claramente variables en períodos cortos, correlacionados con cambios pequeños en la irradiancia, así como cambios en la irradiancia ascendente transmitida por suspensiones algales. También da evidencia no microscópica de movimiento o arreglo de cloroplastos con la relación inversa de un *parámetro de autosombreado* y cambios en la fluorescencia en cultivos de fitoplancton. Más aún, estudios realizados con microfotografía en un dinoflagelado, señalan cambios en la eficiencia de la absorción espectral con la migración, y que los espectros de absorción específica, para los grupos mayores de fitoplancton, no pueden ser siempre supuestas como *constantes* (Stephens, 1995).

De todo lo anterior se sabe que la migración de cloroplastos es un fenómeno común en el fitoplancton, sin embargo hasta ahora no hay evidencias directas experimentales de cómo afecta la migración en la fisiología celular.

### **1.8 Mecanismos de migración de cloroplastos en fitoplancton**

Actualmente se han estudiado los mecanismos del movimiento de cloroplastos en las diatomeas, el cual es similar al de plantas superiores y algas, que consiste en citoesqueletos formados por microfilamentos y microtúbulos de tubulina y actina, que forman una red y soportan la movilidad de los organelos

fotosintéticos en algunas especies, y que tienen velocidades de  $0.1$  a  $0.3 \mu\text{m min}^{-1}$  (Chen y Li, 1991; Mann, 1996). Un ejemplo de la organización intracelular y el movimiento de cloroplastos lo dan Wagner y Grolig (1992), donde las diatomeas céntricas *Biddulphia* y *Striatella*, y la alga unicelular *Eremosphaera*, tienen un núcleo suspendido por hebras citoplasmáticas en el centro de una larga vacuola, y a lo largo de estas hebras están los cloroplastos que se mueven a lo largo de ellas, de las paredes al núcleo, dependiendo de las condiciones luminosas.

### **1.9 Función del arreglo de cloroplastos**

Existen diferentes interpretaciones de la función del arreglo de cloroplastos, Mann (1996) sugiere que puede ser un mecanismo para proteger al núcleo de daños causados por la luz visible o ultravioleta, aunque hay evidencias de que el mecanismo migratorio se da también en oscuridad; o bien, que pueda ser un medio de protección para los mismos cloroplastos a través del autosombreado. Sin embargo, el mismo autor reporta que experimentos realizados con una gran variedad de diatomeas no mostraron respuesta ante exposición de UV-B.

Si tomamos en cuenta la disminución de la absorción de luz disponible para la fotosíntesis, es posible pensar que esta se verá afectada. En trabajos con macroalgas, como se mencionó anteriormente, Nultsch *et al.* (1981) concluyeron que la tasa fotosintética fue independiente del arreglo de cromatóforos correspondiente. Sin embargo, las órdenes de magnitud de tiempo (de hasta 8

horas en su experimentación), no corresponden con la velocidad del movimiento de los cloroplastos (de minutos a una hora) reportados para la diatomea *Lauderia borealis* por Kiefer (1973). En otro trabajo mencionado anteriormente, Brugnoli y Björkman (1992) encontraron en plantas superiores que la inducción del movimiento de cloroplastos por luz azul causó cambios en la absorptancia de diferentes especies de plantas, demostrando que puede haber un efecto significativo en la eficiencia de la utilización de la luz en la fotosíntesis. En fitoplancton, Stephens (1995) señala cambios en la eficiencia de la absorción espectral con la migración.

Alternativamente al cambio del arreglo de cloroplastos, se puede también estudiar el arreglo de los tilacoides dentro de los cloroplastos como mecanismo para cambiar el área transversal de los pigmentos fotosintéticos. Considerando así al desplazamiento de cloroplastos desde la perspectiva del "aglomeramiento" de membranas tilacoidales, *i.e.* un cloroplasto y sus membranas más otros y las propias (un "amontonamiento" de cloroplastos) crean un efecto de autosombreado o de "paquete" dentro de la célula (Falkowski y Raven, 1997). Berner *et al.* (1989) consideran que el "amontonamiento" de cloroplastos es el responsable del 40% del efecto "paquete" que contribuye a los cambios en  $a^*$  (absorción específica) *in vivo* durante la fotoadaptación en *Dunaliella tertiolecta*, pudiendo ser esto definido como el mecanismo de protección contra altas intensidades luminosas.

## I.10 Absorción de células en suspensión

### I.10.1 Absorción y densidad óptica

Considerando a un haz de luz monocromática pasando a través de una capa delgada de solución con material absorbente, perpendicular al haz, la intensidad de luz es atenuada exponencialmente de  $I_0$  a  $I_x$ , de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$I_x = I_0 10^{(-OD)}$$

por eso

$$-OD = \log(I_x/I_0)$$

El logaritmo negativo (base 10) de  $I_0/I_x$  es llamado densidad óptica o absorptancia. La OD es proporcional al producto de la concentración de la sustancia absorbente dada y la trayectoria efectiva de la luz por la muestra (Clayton, 1971; Kirk, 1994). Aquí se supone que la muestra no produce esparcimiento y toda la atenuación del haz de luz es por absorción.

La medición de la absorción de las muestras que tienen esparcimiento, por ejemplo células en suspensión, no es sencillo, partiendo del hecho de que la absorción de partículas pigmentadas en suspensión es diferente que la absorción

de los pigmentos en un cierto volumen; aunado a esto, las células vivientes tienen variabilidad en su tamaño, forma y composición, además de que responden a cambios en el ambiente en escalas de minutos a horas. Cuando se determina la OD de una suspensión, según Shibata *et al.* (1954), la luz transmitida es medida usualmente sin considerar que ésta puede representar toda o sólo una parte de la luz que sale de la suspensión, y los mismos autores consideran dos casos extremos: a) En el cual toda la luz transmitida que pasa a través de la suspensión es detectada por el detector, b) y en el cual sólo esa parte de la luz transmitida que procede de la luz incidente es medida.

Los autores nombran a estas dos clases de luz transmitida como “luz total transmitida” y “luz especular transmitida”, y “absorbancia total” y “absorbancia especular”, respectivamente. Con un espectrofotómetro convencional, la OD medida es intermedia entre la absorbancia total y especular, ya que los sensores de luz tienen una apertura para recibir fotones de únicamente pocos grados, y la luz esparcida de la muestra fuera de estos ángulos no es detectada (Kirk, 1994; Shibata *et al.*, 1954); tales espectrofotómetros miden la atenuancia (absorción más parte del esparcimiento).

El problema técnico que presenta el esparcimiento en mediciones de muestras biológicas, es en gran parte responsable de que no existan datos cuantitativos que permitan interpretar el efecto de la migración de cloroplastos o las propiedades ópticas celulares, y dada esta problemática, una alternativa es

utilizar la modelación para investigar el efecto de la migración de cloroplastos.

## **1.11 Modelo para cuantificar la absorción de luz del fitoplancton con cambios en su arreglo de cloroplastos**

### **I.11.1 Antecedentes**

Un haz de luz colimado, al pasar por el área transversal de una célula, proyecta una sombra por las diferentes interacciones de la luz y ella (Fig. 3, donde se considera el caso de una célula sin esparcimiento, con índice de refracción real igual al medio ambiental). Una vista más precisa de la interacción de los fotones con tal partícula absorbente (con índice de refracción real diferente del medio), implica diferentes fenómenos físicos (Fig. 3 B)), como la reflexión externa, la reflexión interna, la refracción y la absorción. Morel y Bricaud (1981), en su modelo basado en la parametrización de Duysens (1956), consideran al índice de refracción del agua y de la célula iguales, lo que implica la excluir la reflexión y la refracción (el modelo sólo se ocupa de la absorción) (Fig. 3 A).

Otros supuestos del modelo de Morel y Bricaud (1981), son la misma concentración de cromatóforos en toda la célula (y en las diferentes células de una suspensión), y células con forma esférica (geométricamente definidas como  $s = \pi d^2/4$ , o sección geométrica, donde  $d$  es el diámetro). En este sentido, existen

varios aspectos que tienen que ser tomados en cuenta para comprender la migración de cloroplastos y supuestos cambios en absorción. En la Fig. 4, se muestra que con la migración de cloroplastos, y una cantidad de clorofila constante, el "efecto de paquete" disminuye con el aumento del volumen celular (en el caso de la migración de cloroplastos, naturalmente no se da un aumento o disminución del volumen celular, pero sí un cambio en el volumen intracelular pigmentado, representado por la circunferencia de los cloroplastos). Igualmente, ante la posibilidad de una división celular, el "efecto de paquete" disminuye ante la reducción del área transversal de las células (o el volumen). Caso aparte es la aclimatación a diferentes irradiancias, donde una célula con menos pigmentos muestra menos efecto "paquete" que otra con el mismo volumen y más pigmentos.

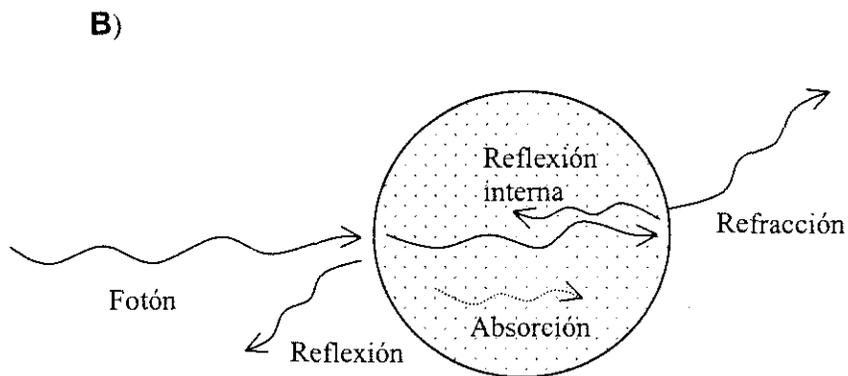
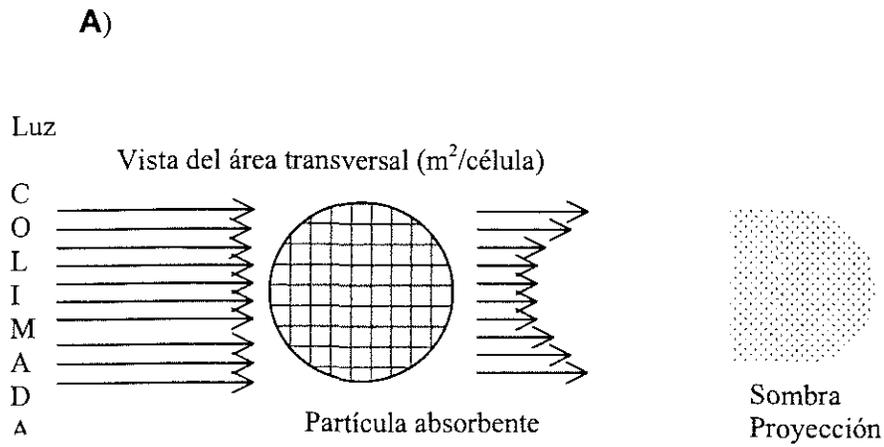
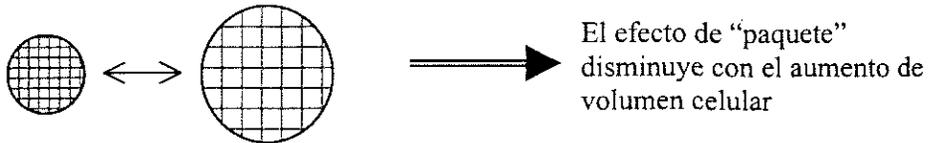
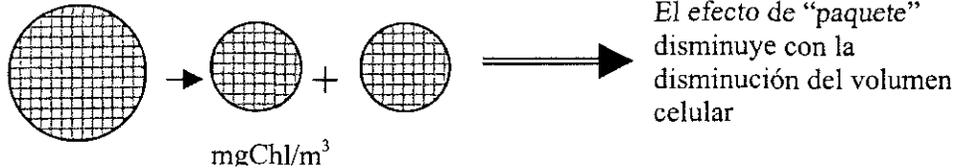


Figura 3. A) Proyección de una sombra por las diferentes interacciones de la luz y una partícula absorbente, con índice de refracción real de la partícula igual al del medio. B) Interacciones ópticas de la luz con una partícula absorbente con índice de refracción real de la partícula diferente al del índice de refracción del medio.

1) Migración de cloroplastos (cantidad de clorofila constante, mgChl/cel). La concentración celular de clorofila cambia.



2) División celular (concentración de clorofila celular constante), y el tamaño de las partículas disminuye.



3) Cambio en la concentración de pigmentos. La distribución de los cloroplastos no cambia.

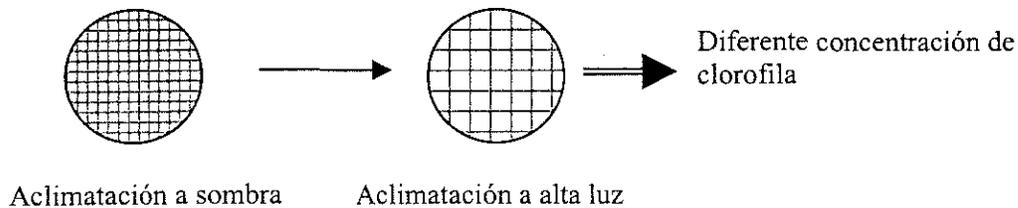


Figura 4. "Efecto de paquete" y volumen celular. La densidad de las líneas en los círculos son proporcionales a la concentración de pigmentos, los círculos indican la periferia del protoplasma que contiene los cloroplastos; se presentan los siguientes casos: 1) migración de cloroplastos (el tamaño de célula es constante), 2) división celular (el tamaño celular cambia proporcionalmente a los círculos) y 3) aclimatación (el tamaño de las células no cambia).

## I.12 Eficiencia de absorción específica

La eficiencia relativa de absorción específica ( $Q^*_a$ ) (Morel y Bricaud, 1981), es definida como la razón de la absorción del volumen de una suspensión por la absorción del volumen de una solución con las mismas concentraciones de cromóforos. Incluye a  $\rho'$ , un parámetro de tamaño y el coeficiente de absorción sin "efecto de paquete" de una solución que toma en cuenta la concentración celular de clorofila. Así, las propiedades de la función  $Q^*_a(\rho')$ , son que  $Q^*_a \rightarrow 1$  cuando  $\rho' \rightarrow \infty$ , es decir, para grandes y/o esferas fuertemente absorbentes; y  $Q^*_a \rightarrow 0$  cuando  $\rho' \rightarrow 0$ , o para esferas pequeñas y/o pobremente absorbentes (para detalles ver página 32). Un ejemplo con *Thalassiosira eccentrica*, reportada por Haardt y Maske (1987) con un diámetro promedio de 32.3  $\mu\text{m}$ , una concentración de clorofila de 41.2 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ), y absorción específica de la suspensión ( $a^*$ ) de 0.017. Si se suponen dos casos en la posición de cloroplastos: en la pared celular de una célula con 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, y en el caso de una distribución de los cloroplastos en el centro de la célula, reduciendo el volumen pigmentado de la célula a la mitad, con 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, el modelo de Morel y Bricaud (1981), indica una disminución en la eficiencia relativa de absorción, de 0.8 a 0.47 para el pico de absorción de clorofila en el rojo (Fig. 5). Este ejemplo demuestra que un cambio en el arreglo geométrico de los cloroplastos, puede variar significativamente el coeficiente de absorción de una suspensión de fitoplancton.

## II JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

De manera general, el traslado de cloroplastos en cultivos es reportado en lapsos de tiempo inferiores a una hora, e incluso en pocos minutos, sin embargo, en la práctica, los métodos conocidos para su observación son poco claros y aparentemente específicos para cada especie y su particular estructura interna. Entonces, es necesario desarrollar los métodos, y así entender los efectos del acomodo de los mismos. Por otro lado, faltaría definir el mecanismo de la migración de cloroplastos en muestras naturales, ya que cambios en la estructura interna del fitoplancton pueden alterar significativamente las propiedades ópticas de la columna de agua, y a su vez tener importantes repercusiones en los métodos fisiológicos que están afectados por la absorción *in vivo*.

### II.1 Objetivos generales

Observar y caracterizar la migración de cloroplastos en cultivos unialgales monoespecíficos y muestras naturales, como una respuesta de aclimatación de las comunidades fitoplanctónicas a diferentes condiciones de irradiancia.

Intentar cuantificar teóricamente la tasa de cambio en la absorción de cultivos unialgales monoespecíficos.

## II.2 Objetivos específicos

Someter cultivos de *Thalassiosira weissflogii* a diferentes intensidades luminosas, buscando cambios en el arreglo de los cloroplastos, tomando como parámetros el número de cloroplastos visibles en las células y las áreas de proyección que forman éstos en las células.

Utilizar el modelo de eficiencia de absorción específica de Morel y Bricaud (1981) para evaluar cambios en la absorción de células en suspensión, basados en la posición de cloroplastos en *Thalassiosira weissflogii*.

Utilizar muestras de fitoplancton recolectadas en campo para intentar observar migración de cloroplastos con cambios en iluminación.

## II.3 Hipótesis

Se puede demostrar que la absorción de una suspensión de fitoplancton puede cambiar con la distribución intracelular de cloroplastos, utilizando la microscopía para observar la ordenación geométrica de los cloroplastos.

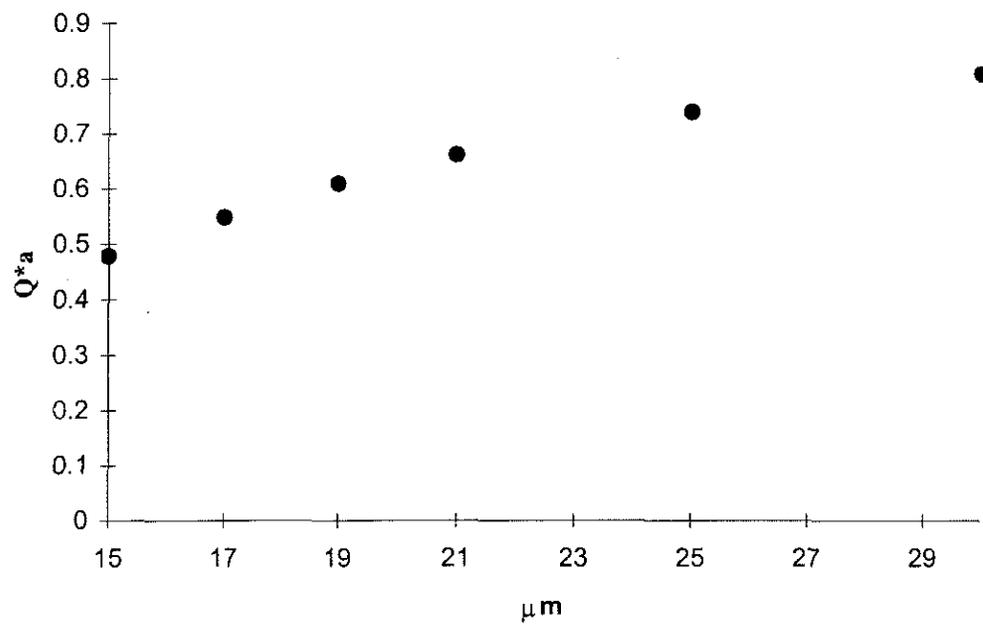


Figura 5. Eficiencia de absorción específica ( $Q^*a$ ) de *Thalassiosira eccentrica* para el pico de absorción en el rojo, con cambios en su tamaño, suponiendo un contenido celular igual de pigmentos y el volumen pigmentado como esférico. Las especificaciones teóricas son: 32.3  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio de la célula, concentración de celular clorofila de 41.2 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ), absorción específica de la suspensión ( $a^*(\text{cm})$ ) de 0.017 a 675 nm (Haardt y Maske, 1987).

### III MÉTODOS

#### III.1 Cultivos

Para los experimentos 1, 2 y 3 con cultivos unialgales monoespecíficos se utilizó *Thalassiosira weissflogii*, que fue cultivada en agua de mar enriquecida con fosfatos, silicatos, nitratos y vitaminas, en una concentración de f/10 (González, *et al.*, 1995). Antes de la experimentación, las muestras fueron colocadas en oscuridad total por al menos 8 horas, de lo que se obtuvo el tiempo 0 de la posición de cloroplastos (previa fijación de la muestra y montaje). Después se expusieron a la luz de un proyector Kodak Ektagraphic con foco de 300w (**Phillips E L H**) con un filtro de agua de 10.9 cm para minimizar la luz infrarroja (Fig. 6), hasta por 40 minutos (experimentos 1 y 2 por 30 minutos), para tener la referencia de los cambios ocurridos en la posición de cloroplastos. Para la fijación de las muestras en los tres experimentos se utilizó glutaraldehído. La irradiancia durante la exposición fue arriba de  $3 \times 10^{17}$  quanta  $s^{-1} cm^{-2}$  (medición con sensor escalar QLS-100, Biospherical Instruments Inc).

Otros experimentos con cultivos unialgales consistieron observar muestras sin fijadores (*in vivo*) después de la corrida experimental de 40 minutos en alta irradiancia, o colocándolas en alta irradiancia y en oscuridad total por 120 minutos (un experimento cada uno), con glutaraldehído como fijador. El diagrama de flujo de la experimentación se muestra en la Figura 7.



La fijación por duplicado de las muestras microscópicas, en el caso de los cultivos unialgales, se realizó con glutaraldehído (concentración final 0.05 %, y en caso de las muestras naturales se utilizó además formol (concentración final 4%), tratando de observar el funcionamiento de este fijador, no reportado en la literatura. El impacto de los fijadores en la geometría de los cloroplastos dentro de la célula, fue probado en una corrida experimental con *Thalassiosira weissflogii*, donde se evitó el uso de fijadores. Después de fijar las muestras, éstas se filtraron en membranas de policarbonato de 8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, y los filtros se ubicaron en un portaobjetos con una gota de aceite de inmersión bajo y sobre ellos, y protegidos con un cubreobjetos. La observación y tomado de imágenes se hizo en los 10 minutos posteriores al montaje de las muestras en los filtros.

El microscopio utilizado en el análisis, fue un microscopio de epifluorescencia y luz de transmisión (**Jenalumar**), y las imágenes se obtuvieron con una cámara de vídeo tricromática, de 768H x 494V pixeles de resolución (**MTI**, modelo DC330). En los experimentos con cultivos unialgales, se procedió a contar en el microscopio los cloroplastos visibles en las células en tiempo 0 y después de la incubación, además de medir el largo y ancho, en un plano, de éstos en las células (Fig. 8), para posteriormente calcular el área de distribución intracelular.

Para la aplicación del modelo de absorción específica ( $Q^*_a$ ), el número de células fue contado con un hematocímetro de 0.2 ml de volumen, y la

concentración de clorofila *a* fue medida utilizando filtros GF/F extrayendo el pigmento en acetona al 90%, según el método de Jeffrey y Humphrey (1975) (Jeffrey y Welschmeyer, 1997). La filtración se realizó con un equipo de succión tradicional, con un volumen filtrado para todos los experimentos de 10 ml de cultivo, en un volumen de acetona de 5 ml. Para las lecturas de absorción, fue utilizado el espectrofotómetro Shimadzu (Spectronic, 210UV), en modo transmitancia, para después pasar a OD con la siguiente fórmula:

$$OD = \log(T\%/100)$$

### III.2 Eficiencia de absorción específica (Morel y Bricaud, 1981)

Para la cuantificación teórica de la tasa de cambio en la absorción, se utilizó el modelo de eficiencia relativa de absorción específica ( $Q_a^*$ ), que para una célula esférica se expresa como:

$$Q_a^* = (3/2) Q_a / \rho'$$

Donde:

$Q_a$  es la eficiencia relativa de absorción, definida por  $\rho' = 4da_{cm}/3\pi$ , y  $d$  es el diámetro de una esfera con un volumen equivalente a la célula.  $a_{cm}$  es el coeficiente de absorción sin efecto paquete de una solución ( $a_{cm} = a_{sol}^* \times Chl_{cel}$ ),

$a^*_{sol}$  es el coeficiente de absorción específico ( $m^2/mg$ ) igual a 0.02 (este es el valor aproximado para la clorofila **a** en el pico del rojo),  $Chl_{cel}$  la concentración celular de clorofila ( $mg/m^3$ ), que está calculada por la razón de la concentración de clorofila (**Chl**) del volumen de la suspensión ( $mg/m^3$ ) entre el número de células **N** (células/ $m^3$ ) multiplicado por el volumen celular ( $Chl / N/V V_{cel}$ ).

Si las fórmulas suponen una célula esférica con pigmentos distribuidos uniformemente, podemos definir que con la migración de cloroplastos cambia el diámetro de la célula, y sus propiedades de absorción (Fig. 9), y por sustitución de los tamaños de las células y los cloroplastos (definidos por sus áreas) en el modelo, podemos clarificar los valores de absorción específica de una especie fitoplanctónica en suspensión. Las células de *Thalassiosira weissflogii* son cilíndricas, el aproximamiento a una célula esférica para determinar el diámetro que se utilizó en el modelo se hizo estableciendo el volumen de la célula (con el largo y ancho de las células (Fig.8)):

$$VCel = l_0 \times \pi (d_0 / 2)^2$$

Donde:

$l_0$  es el largo de la célula, y  $d_0$  es el ancho de la misma.

Y sustituyendo en:

$$D = \sqrt[3]{V_{\text{Cel}} \times 6 / \pi}$$

Donde:

**D** es el diámetro de una esfera y **VCel** el volumen de la célula. El diámetro de la esfera fue el que se tomo en cuenta para los "cambios de tamaño" de las células.

### III.3 Muestras naturales

El trabajo en el crucero (abril de 1999, Golfo de California), constó de tres experimentos, que se realizaron con muestras de fitoplancton obtenidas en la superficie (100% de irradiancia), y en profundidades con 3% de irradiancia (donde no se encontraron especies para la investigación).

Las muestras con 100 % de irradiancia PAR fueron recolectadas de la superficie con una cubeta, mientras que para las muestras provenientes del 3% de la irradiancia PAR superficial, se determinó el coeficiente de atenuación de la luz, que consiste en definir la profundidad de visibilidad con el disco de Secchi (factor 1.6 para convertir la profundidad Secchi al coeficiente de atenuación de luz). La toma de muestras se hizo con botellas tipo Niskin con ligas y empaques de silicón. El agua recolectada se tamizó con malla de 130  $\mu\text{m}$ , para evitar la existencia de zooplancton que pudiera perjudicar la muestra, y se repartió en botellas de

policarbonato de 100 ml, donde se realizó el experimento. La preiluminación con luz *in situ* (irradiancia original) tuvo una duración de 30 minutos, consistiendo en envolver los recipientes de policarbonato con tela negra (para 3 % de irradiancia), y exponerlos a la luz en un incubador con fondo negro y flujo continuo de agua del mar para mantener la temperatura constante.

En el experimento se tomaron muestras para determinar la concentración de clorofila de la fracción de más de 8  $\mu\text{m}$  (con filtro de policarbonato y filtro GF/F). En todos los casos se utilizó como fijadores glutaraldehído al 0.05% y formaldehído al 4% (concentraciones finales). Después de la preiluminación, se tomó muestra por duplicado para tiempo 0 en la posición de cloroplastos, y después se realizó el tratamiento simultáneo de dos submuestras de la muestra original, con la irradiancia opuesta a la que está sometida normalmente (de luz a oscuridad, o de oscuridad a luz, por ejemplo), por diez y treinta minutos en el incubador. Después de diez y treinta minutos, se fijaron 50 ml de cada muestra para filtrar por succión con membranas de policarbonato de 2.5  $\mu\text{m}$  y poro de 8  $\mu\text{m}$ , siempre por duplicado, con formaldehído y glutaraldehído.

El montaje de las muestras fue similar a los experimentos con cultivos, y el análisis consistió en la búsqueda de especies con cloroplastos perfectamente visibles en los tiempos 0 de los experimentos, y darles un seguimiento en los tratamientos posteriores.

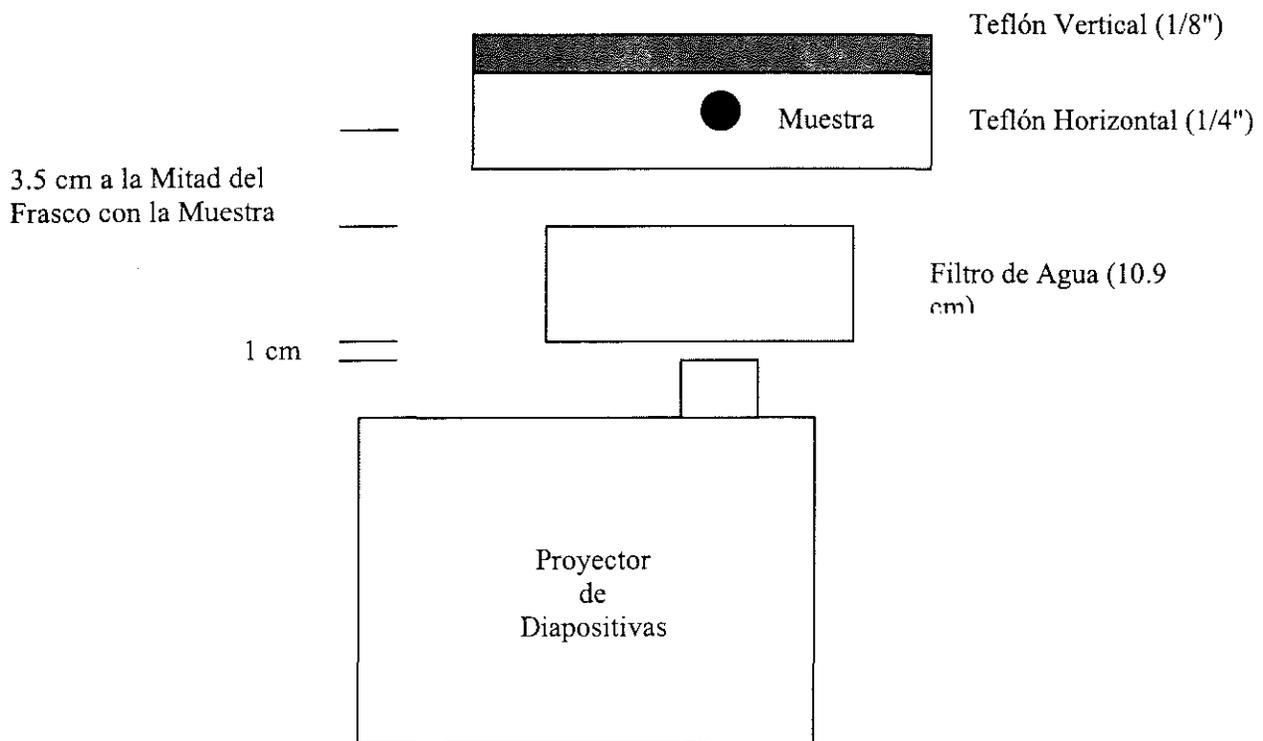


Figura 6. Esquema de la iluminación en experimentos con cultivos unialgales.

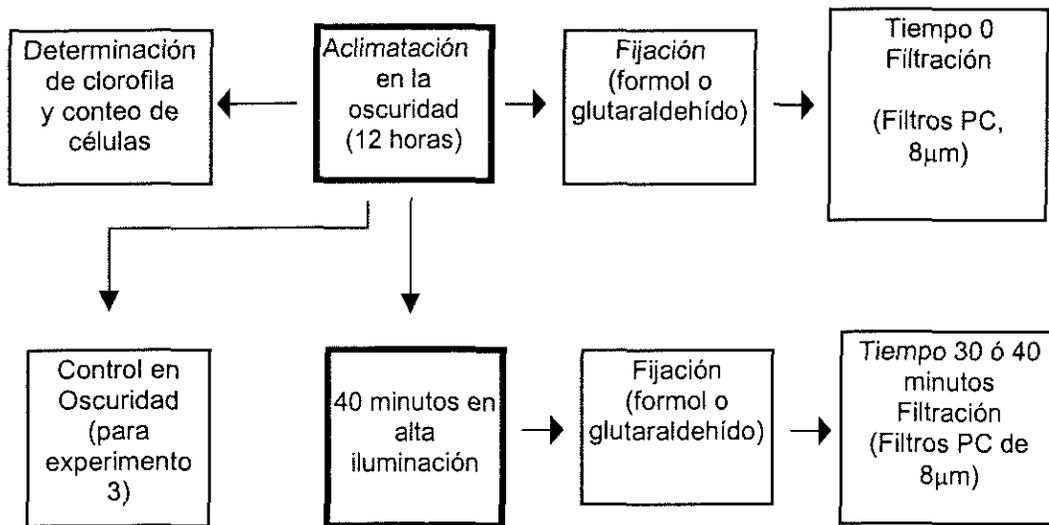


Figura 7. Diagrama de flujo típico de los experimentos 1, 2 y 3 con cultivos unialgales.

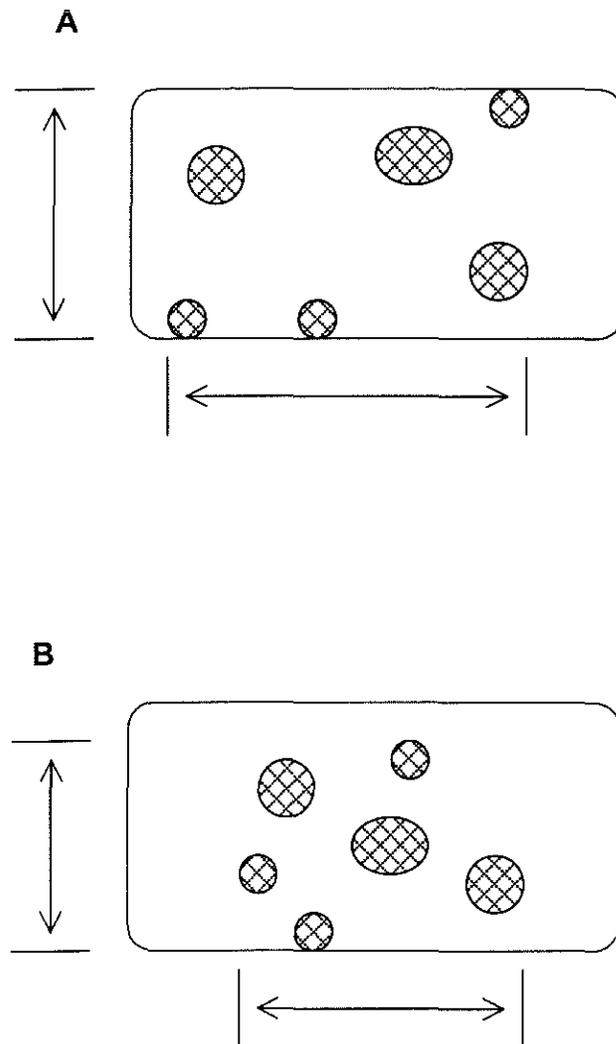


Figura 8. Esquema para cuantificar el área de la distribución de los cloroplastos en muestras unialgales. Vista en un plano de células en diferentes tiempos (A y B), y el "largo" y "ancho" que cubren los cloroplastos en ella, que se midieron para posteriormente determinar el área.

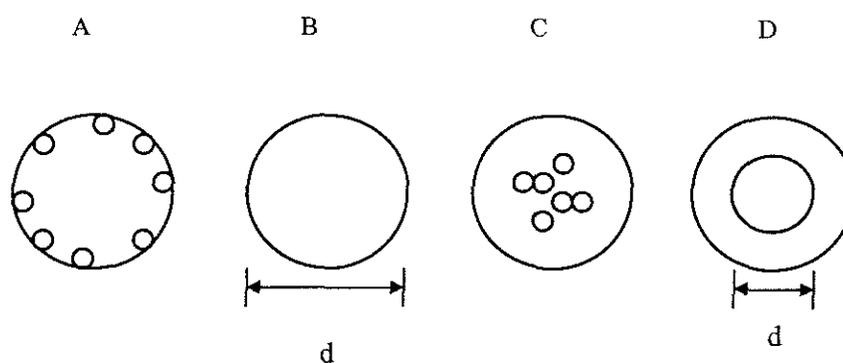


Figura 9. Esquema para el cálculo del efecto óptico que puede inducir la migración de cloroplastos. Célula esférica con diferente posición de cloroplastos (A y C), y diferentes áreas de absorción correspondientes (área gris) (B y D).

## IV RESULTADOS

### IV.1 Orientación de los cloroplastos en *Thalassiosira weissflogii*

En los experimentos con *Thalassiosira weissflogii*, después de una aclimatación en la oscuridad e incubación de 30 y 40 minutos en alta irradiancia, la orientación de los cloroplastos no mostró cambios notables (Figs. 10 y 11) según lo reportado en otras especies, ni aún en experimentos de mayor duración (120 minutos) (Fig. 12), ni en 120 minutos de oscuridad (Fig. 13). Los cloroplastos siempre se ubicaron en las orillas de las células (cerca de la pared celular), sin embargo, se encontraron diferencias en el número de cloroplastos observados por célula, y las áreas formadas por ellos.

El análisis detallado de las células fitoplanctónicas mostró que en los experimentos 1 y 2 (en incubaciones de 30 minutos) hubo menos cloroplastos visibles. En el experimento 1, las células con sólo dos cloroplastos variaron de 5 observadas en el tiempo 0 a 24 después de 30 minutos (Fig. 14 A), y de 23 a 30 en las células con tres cloroplastos; inversamente, las células con 4 y 5 cloroplastos visibles fueron mayores en tiempo 0 que después de 30 minutos. Estadísticamente, se encontraron diferencias significativas en el número de cloroplastos en tiempo 0 y 30 minutos (95 % de confiabilidad en una prueba  $t$ ,  $p=0.000275$ ).

En el experimento 2 sucedió lo mismo, sin embargo, el número de cloroplastos visibles que más varió fue el de 3, donde en el tiempo 0 se observaron 10 células, mientras que después de 30 minutos hubieron alrededor de 27 células con tres cloroplastos visibles (Fig. 15 A); también hubo un decremento en las células con 5 ó 6 cloroplastos, y estadísticamente hubo diferencias significativas entre ambas muestras (95 % de confiabilidad, prueba  $t$ ,  $p=0.000370$ ).

En el experimento 3 no se confirmó la tendencia anterior, a pesar de ser menor el número de células con 2 cloroplastos visibles en la muestra de 40 minutos (de 5 en tiempo 0 a 1 después de 40 minutos) (Fig. 16 A); en este experimento se utilizó un control que fue ubicado en oscuridad, y después de 40 minutos mostró, a diferencia del tiempo 0 y cuarenta minutos, más células con 2 y 3 cloroplastos visibles. En general, en el experimento 3 no hubo diferencias estadísticas significativas (95 % de confiabilidad, prueba  $t$ ;  $p=0.057595$  para número de cloroplastos 40 minutos vs. número de cloroplastos control, y  $p=0.180394$  para número de cloroplastos T0 vs. número de cloroplastos 40 minutos).

#### **IV.2 Áreas de los cloroplastos en *Thalassiosira weissflogii***

Diferencias significativas (95 % de confiabilidad,  $p=0.027382$ ) fueron encontradas en total de las áreas que forman los cloroplastos en tiempo 0 y 30

minutos en el experimento 1; en los intervalos de 0-9 y 10-19  $\mu\text{m}^2$  (en los tamaños de áreas) sólo hubo 1 célula de tiempo 0, por 10 de 30 minutos, y en el intervalo de 40-49  $\mu\text{m}^2$  la reducción en el número de células con esas áreas de cloroplastos fue de 45 a 21, de tiempo 0 a 30 minutos, respectivamente (Fig. 14 B). En el experimento 2, también hubo diferencias significativas en las pruebas estadísticas ( $p=0.000251$ ), y en los intervalos de 0-9 y 10-19  $\mu\text{m}^2$  se dio la mayor reducción, mientras que en el intervalo de 30-39  $\mu\text{m}^2$  en 30 minutos se contaron, con respecto a tiempo 0, menor número de células con ese tamaño en las áreas que forman los cloroplastos (Fig. 15 B). El experimento 3, presenta en el intervalo de 10-19  $\mu\text{m}^2$  un número mayor de células en tiempo 0, y en el intervalo de 20-29  $\mu\text{m}^2$  en el control, sin marcar una tendencia específica (Fig. 16 B); estadísticamente hubo diferencias significativas (con la prueba  $t$ ) en tiempo 0 y 40 minutos ( $p=0.030467$ ), mientras que entre el control y 40 minutos no se encontró diferencia ( $P=0.206344$ ), lo que puede mostrar un factor de control fisiológico no tomado en cuenta.

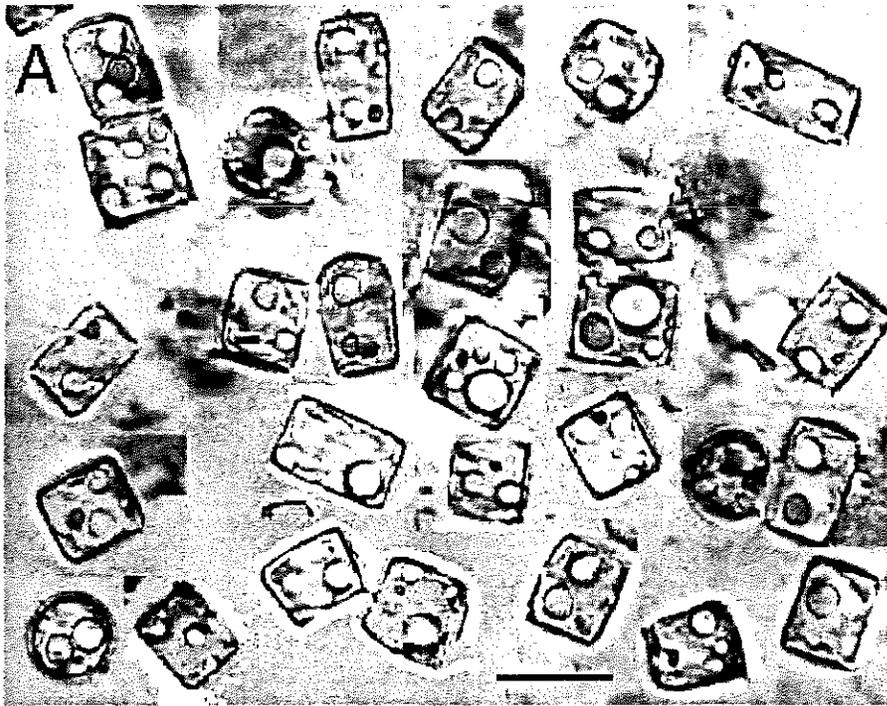


Figura 10. Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en *Thalassiosira weissfloguii* en el experimento 2, tiempo 0 (A) y después de 30 minutos en alta irradiancia (B). La barra es de 10  $\mu\text{m}$  en ambas figuras.

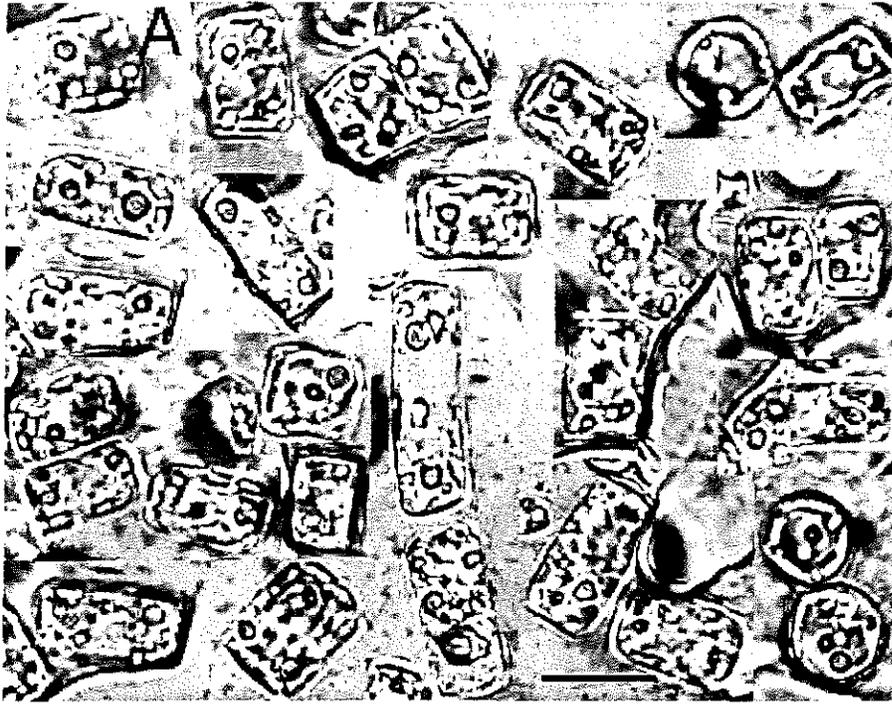


Figura 11. Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en *Thalassiosira weissflogii* en el experimento 3, tiempo 0 (A) y después de 40 minutos en alta irradiancia (B). La barra es de 10  $\mu\text{m}$  en ambas figuras.

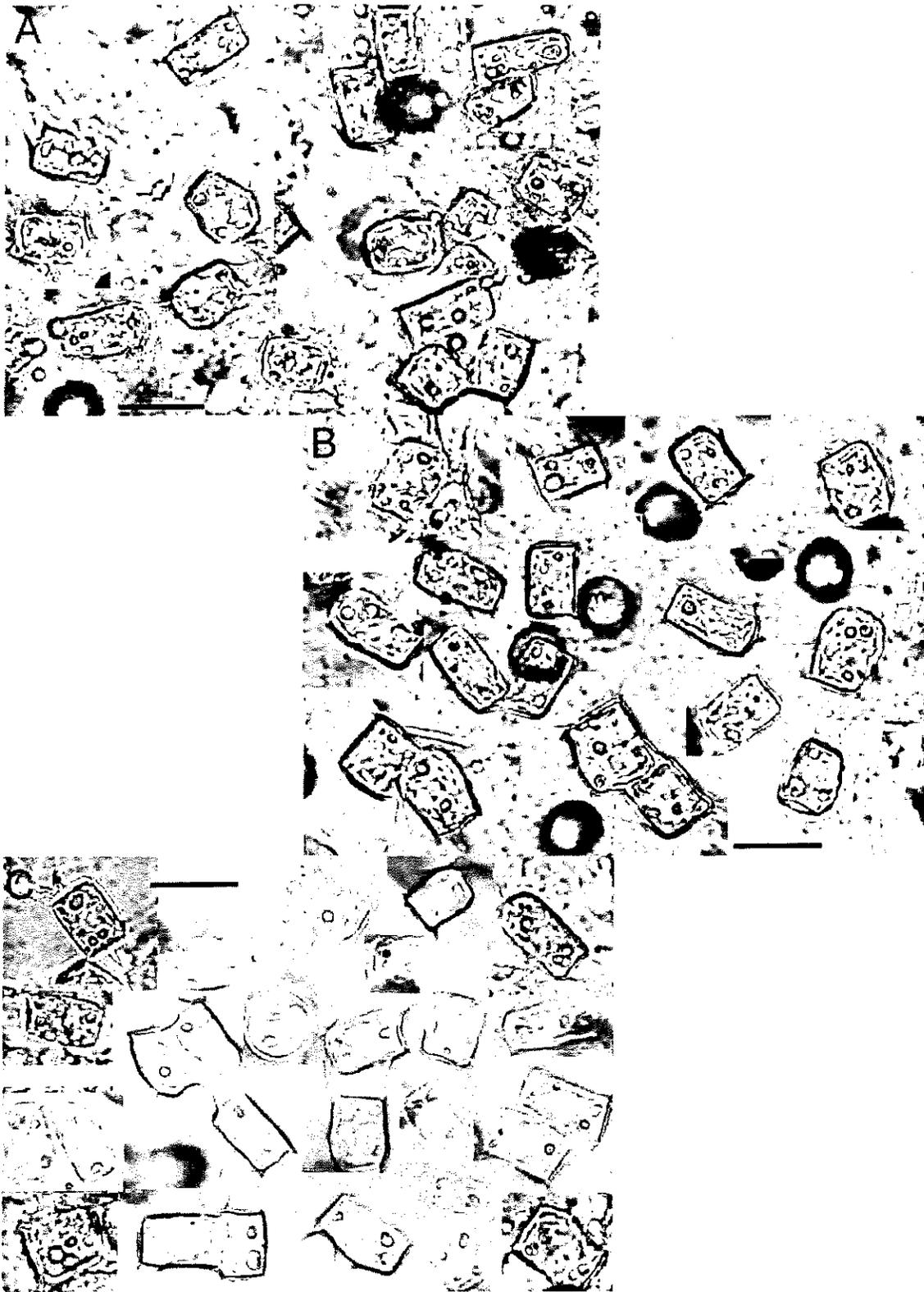


Figura 12. Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en *Thalassiosira weissflogii* en tiempo 0 (A), después de 60 (B) y de 120 minutos en alta irradiancia (C). La barra es de 10  $\mu\text{m}$  en las figuras

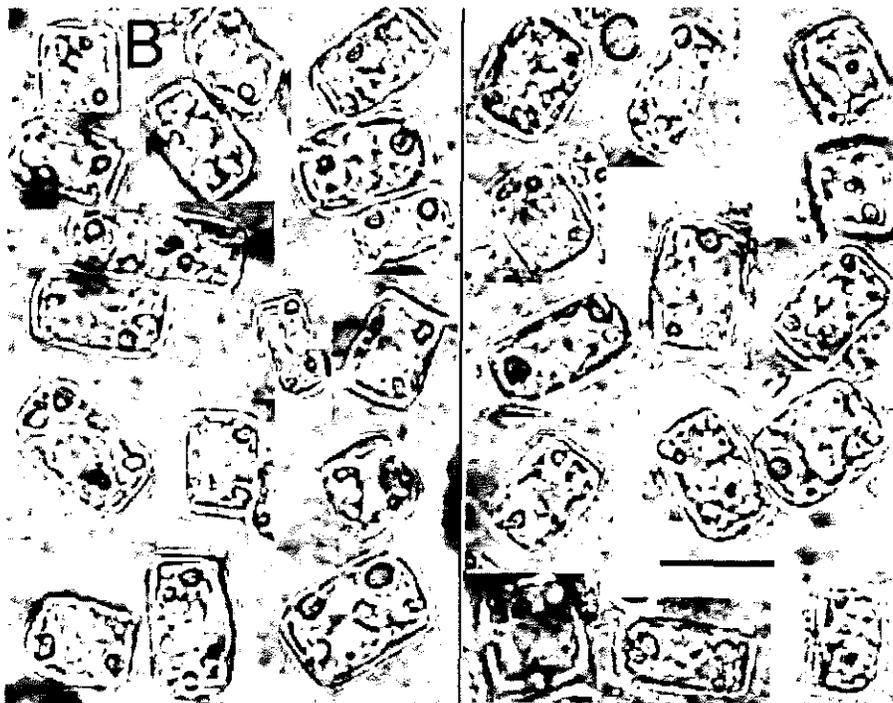
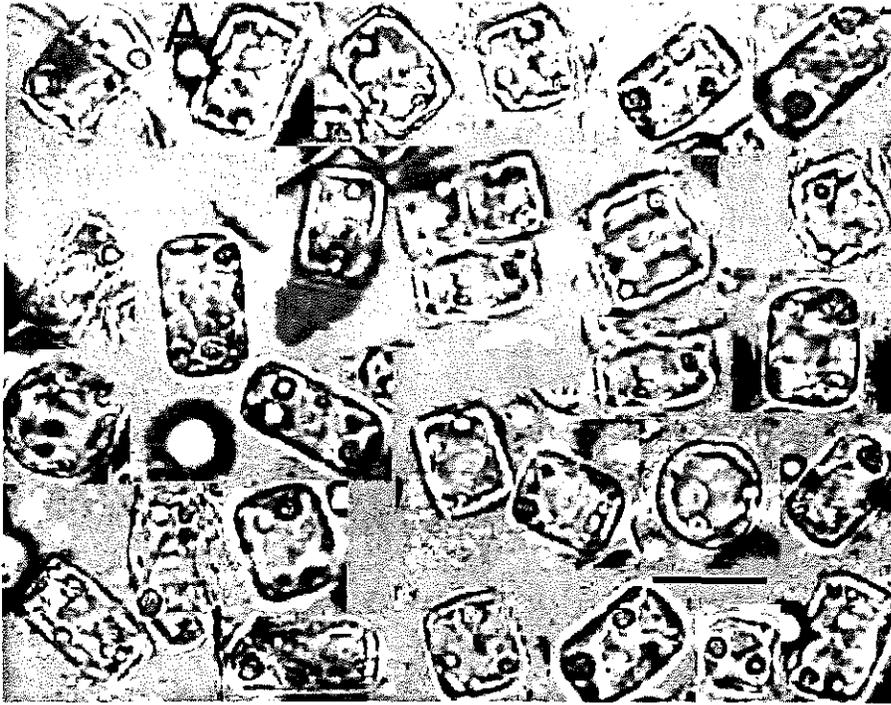


Figura 13. Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en *Thalassiosira weissflogii* en tiempo 0 (A), después de 60 (B) y de 120 minutos en oscuridad (C). La barra es de 10  $\mu$ m en ambas figuras.

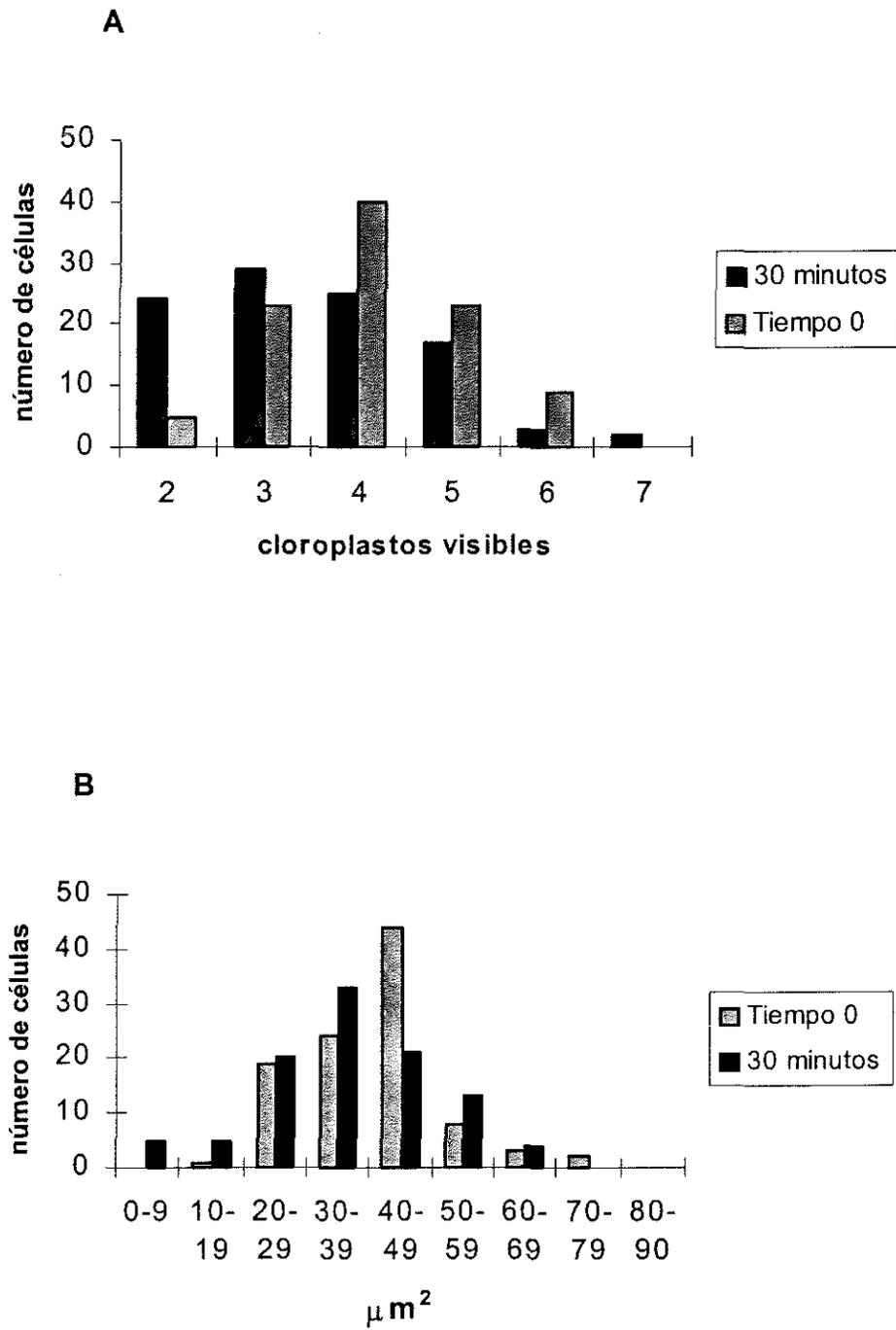


Figura 14. Figura A, número de cloroplastos visibles. Figura B, áreas de cloroplastos en células. Experimento 1 con *Thalassiosira weissflogii*, en muestras fijadas con glutaraldehído.

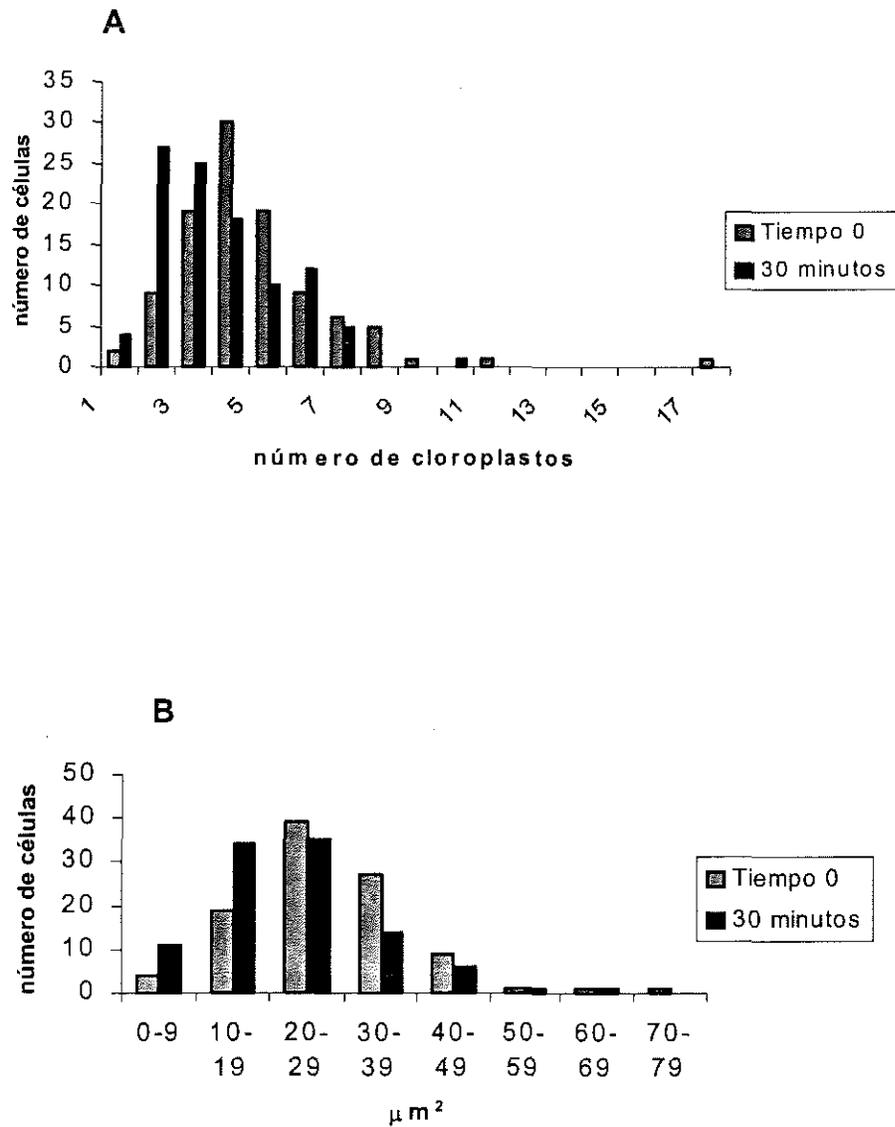


Figura 15. Figura A, número de cloroplastos visibles. Figura B, áreas de cloroplastos en células. Experimento 2 con *Thalassiosira weissflogii*, en muestras fijadas con glutaraldehído.

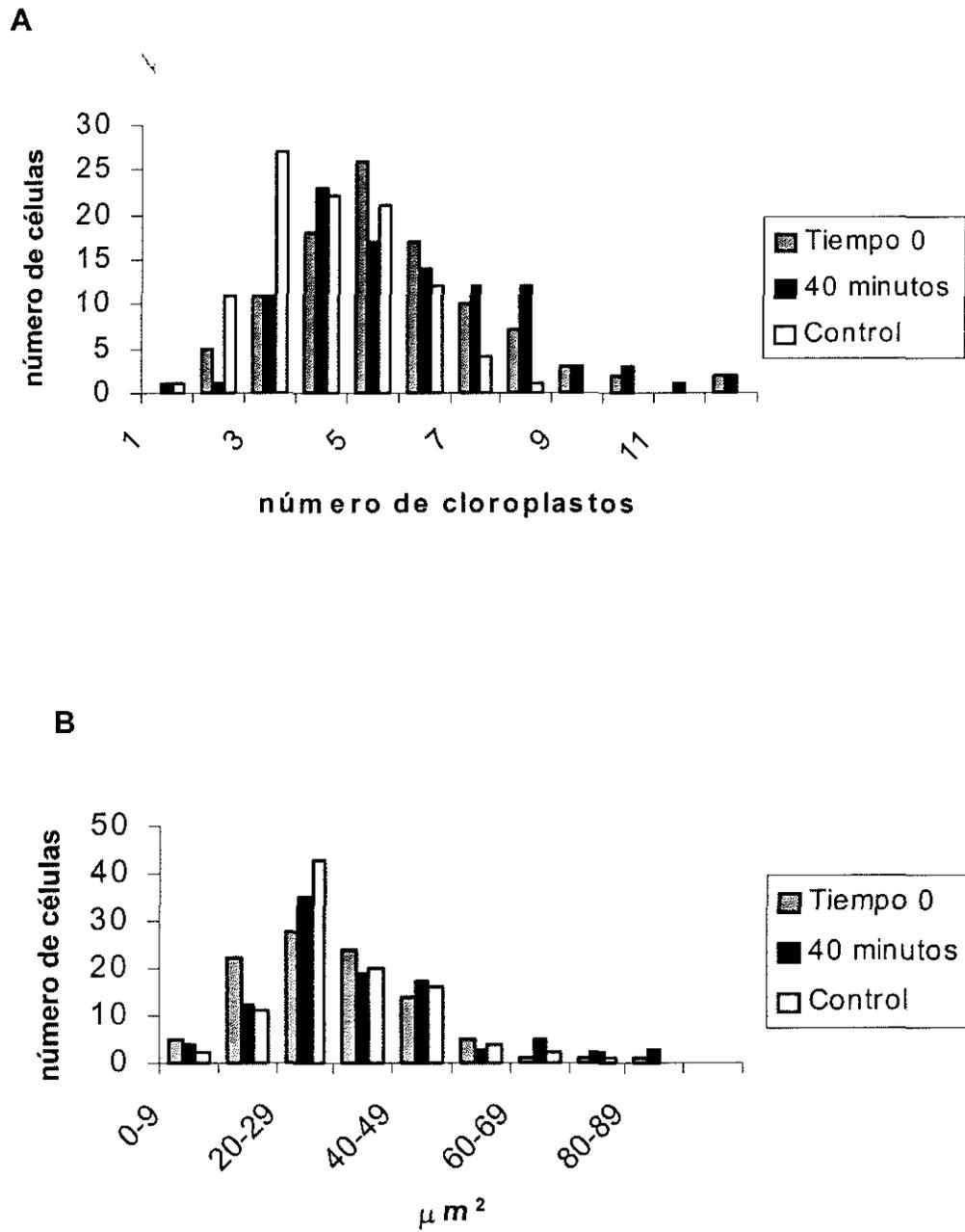


Figura 16. Figura A, número de cloroplastos visibles. Figura B, áreas de cloroplastos en células. Experimento 3 con *Thalassiosira weissflogii*, en muestras fijadas con glutaraldehído.

### IV.3 Impacto de los fijadores

Se buscó conocer el impacto de los fijadores en la estructura interna de *Thalassiosira weissflogii*, por ello se realizó un experimento con células sin fijar. Por la naturaleza del experimento, fue imposible hacer un análisis cuantitativo, de tal manera, las imágenes no exhiben cambios evidentes de tiempo 0 a 40 minutos (Fig. 17). En ninguno de los tres experimentos previos a la prueba *in vivo* existió una evidencia de la expulsión de material celular (no existen imágenes del experimento 1 porque en la filtración se dejó demasiada agua en el filtro, y al montarla en aceite de inmersión, hizo difícil la observación de las células, lo que, sin embargo, no imposibilitó, aunque dificultó, el tratamiento cuantitativo), y en esta última no se observa una diferencia evidente a las pruebas anteriores, con lo que damos por sentado que no hubo daño en *T. weissflogii* debido a la fijación con glutaraldehído.

En muestras naturales no hubo experimentos *in vivo*, sólo se buscó ver el funcionamiento del formaldehído en comparación con el glutaraldehído.

### IV.4 Eficiencia de absorción

Al definir en tiempo 0 a una célula entera con cloroplastos en todo su volumen, o cubriendo una área similar al área de la célula, y una reducción del tamaño de esta célula por la reducción del área que cubren los cloroplastos en 30

minutos, como sucedió en los experimentos 1 y 2 con *Thalassiosira weissflogii*, encontramos tamaños de células que van de 2 a 15  $\mu\text{m}$  (entre células completas y su reducción de tamaño tomando en cuenta sólo a sus cloroplastos). Estos datos generan una eficiencia de absorción que va de 0.13 en 2  $\mu\text{m}$ , a 0.87 en 11  $\mu\text{m}$  (en el máximo y mínimo valor que se presentó), evidenciándose cambios en absorción debidos a los cambios en las áreas de los cloroplastos y el número de ellos (Fig. 18). En el experimento 3, se genera un resultado similar, con una eficiencia de absorción de 0.09 en 2  $\mu\text{m}$  a 0.89 en 15  $\mu\text{m}$  (Fig.19). Estos cálculos suponen que el contenido de pigmentos (mg/célula) no varía entre células. El resultado numérico es sólo válido para el pico rojo de la clorofila *a*, se espera que afecte el coeficiente promedio de las longitudes de onda fotosintéticamente activas.



Figura 17. Imagen con luz de transmisión, muestra sobre filtro de policarbonato. Las imágenes son composiciones de imágenes con la misma magnificación (100 x). Posición de los cloroplastos (círculos en las células de diferentes tamaños) en *Thalassiosira weissflogii* *in vivo* en tiempo 0 (A) y después de 40 minutos en alta irradiancia (C). La barra es de 10  $\mu\text{m}$  en las figuras.

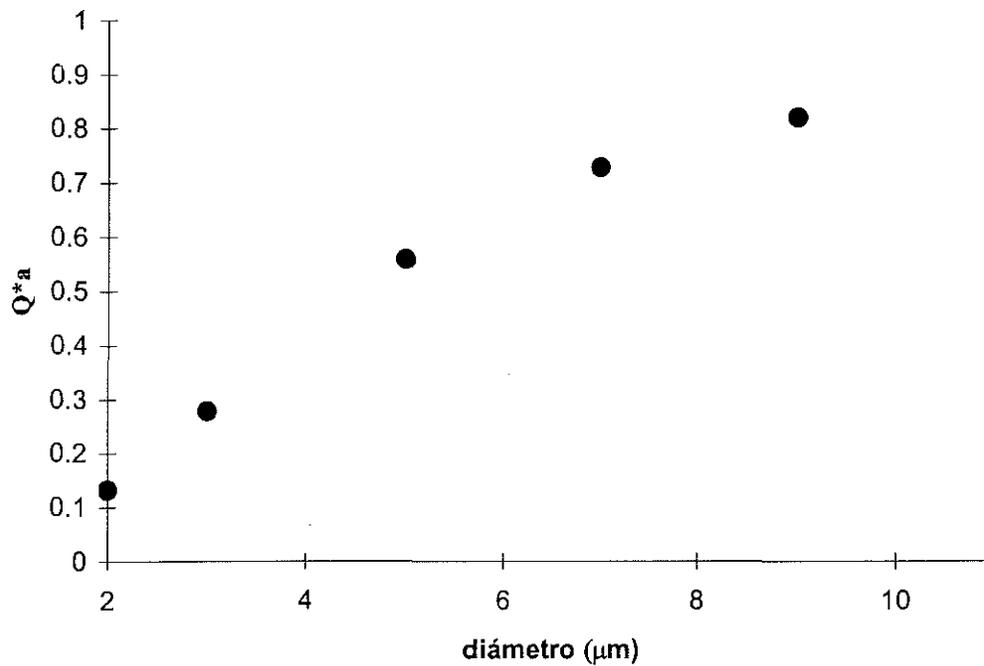


Figura 18. Eficiencia de absorción específica ( $Q^*a$ ) versus diámetro del volumen celular pigmentado para el pico de absorción en el rojo (se supone que  $a^*_{\text{sol}} = 0.02 \text{ (m}^2/\text{mg)}$ ). El ejemplo está calculado con la geometría y concentración celular presentados en los experimentos 1 y 2 con *Talassiosira weissflogii*. La concentración de clorofila en el cultivo fue de  $243.5 \text{ mg/m}^3$  (el contenido celular de clorofila de  $1.17 \times 10^{-9} \text{ mg/m}^3$ ), y el número de células  $2.08 \times 10^{11} \text{ cel/m}^3$ .

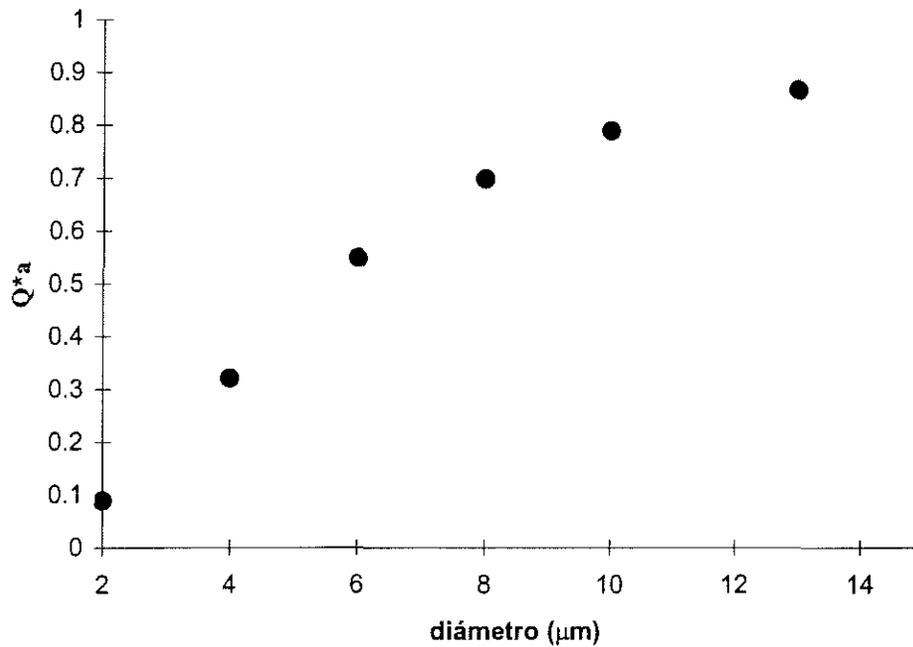


Figura 19. Eficiencia de absorción específica ( $Q^*a$ ) versus diámetro del volumen celular pigmentado para el pico de absorción en el rojo (se supone que  $a^*_{\text{sol}} = 0.02 \text{ (m}^2/\text{mg)}$ ). El ejemplo está calculado con la geometría y concentración celular presentados en el experimento 3 con *Talassiosira weissflogii*. La concentración de clorofila en el cultivo fue de  $407.84 \text{ mg/m}^3$  (el contenido celular de clorofila de  $1.75 \times 10^{-9} \text{ mg/m}^3$ ), y el número de células  $2.33 \times 10^{11} \text{ cel/m}^3$ .

#### IV.5 Muestras naturales

Diversas especies pudieron ser observadas en las muestras naturales analizadas, sin embargo, muchas de ellas no tenían cloroplastos visibles, ya sea por el tamaño de estas especies o por dificultades técnicas. Finalmente, las especies analizadas fueron *Eucampia cornuta*, *Asterionellopsis glacialis*, *Ceratium furca*, *Chaetoceros costatus*, *Leptocylindrus minimus*, *Skeletonema costatum*, y una especie no identificada de diatomea central. Todas estas especies fueron recolectadas de la superficie (con 100% de irradiancia) y puestas en irradiancia experimental de 3%, ya que en muestras de 3% de irradiancia (y puestas en 100%) no hubo organismos para analizar, por los problemas comentados arriba.

##### *Eucampia cornuta*

Recolectada de la superficie, y puesta en irradiancia de 3%, expone en tiempo 0, fijada con formol, una distribución de cloroplastos agrupada ligeramente cerca de la pared lateral exterior (Fig. 20A) (tomando en cuenta que forma una curva en su agregación con otros individuos de su especie). Después de treinta minutos de incubación, los cloroplastos parecen agrupados en el centro de las células (Fig. 20 B y C), en muestras fijadas con formol y glutaraldehído, respectivamente. Existe la posibilidad de que esta especie fuera dañada por los fijadores.

### *Asterionellopsis glacialis*

Recolectada de la superficie, y puesta en irradiancia de 3%, en tiempo 0, fijada con formol, presenta un solo cloroplasto grande en su sección más ancha (Fig. 21 A y B), y después de 30 minutos son notorios dos cloroplastos (Fig. 21 C, D y E), de lo que se deduce que podría existir un agrupamiento anterior (en tiempo 0) que impedía que se vieran ambos. En una muestra de 30 minutos fijada con glutaraldehído, son notorios también dos cloroplastos (Fig. 21 F), con lo que se prueba la eficacia de los dos fijadores, o el impacto similar en ambos en esta especie.

### *Ceratium furca*

Recolectada de la superficie, y puesta en irradiancia de 3%. Existe una mala visión de los cloroplastos en esta especie, especialmente en las imágenes obtenidas con la cámara digital. La observación en el microscopio, en una muestra fijada con formol, define una posible posición de los cloroplastos en tiempo 0 en el cuerpo principal del organismo, no así en sus largas extremidades (Fig. 22 A y B). Después de treinta minutos en muestra fijada con glutaraldehído, la distribución de los cloroplastos es aparentemente igual (Fig. 22 C y D).

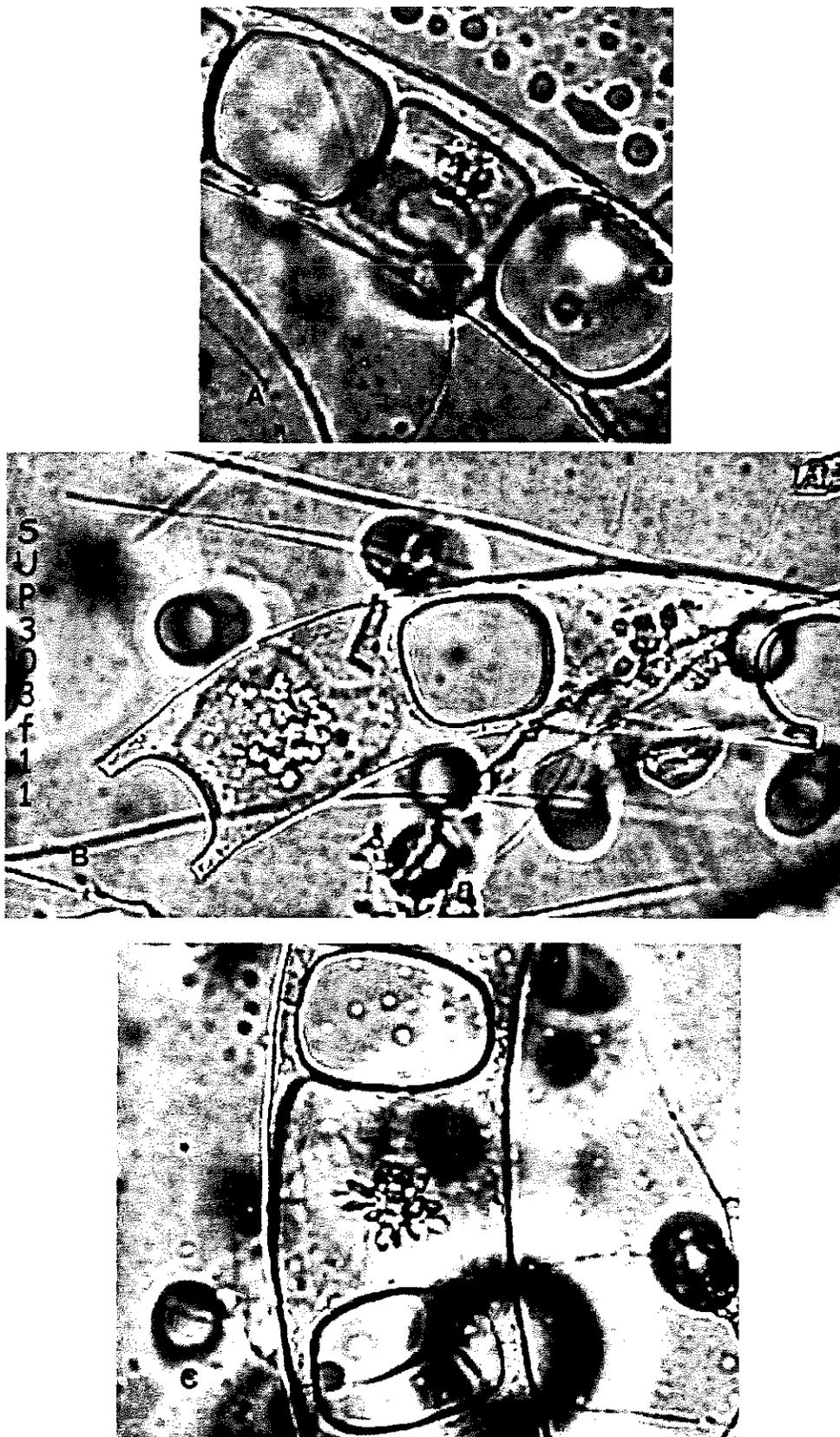


Figura 20. *Eucampia cornuta*. Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figura A, tiempo 0 fijada con formol. Figura B muestra después de tratamiento experimental fijada con formol. Figura C, muestra después de tratamiento experimental fijada con glutaraldehído. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.

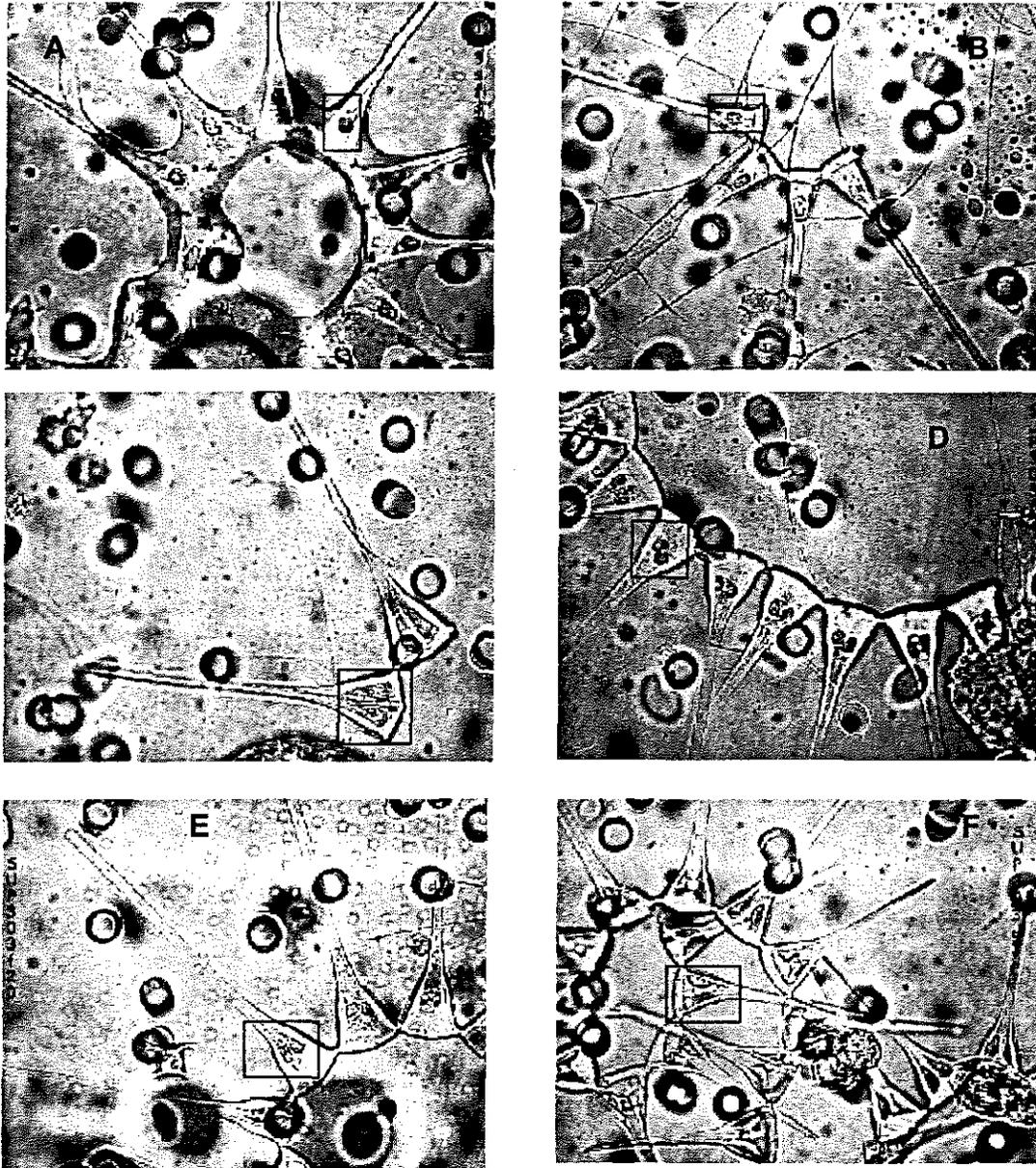


Figura 21. *Asterionellopsis glacialis*. Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figuras A y B tiempo 0; C, D, E y F, después tratamiento experimental. La figura F corresponde a una muestra fijada con glutaraldehído, el resto con formol. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto; los cloroplastos se señalan en los rectángulos.

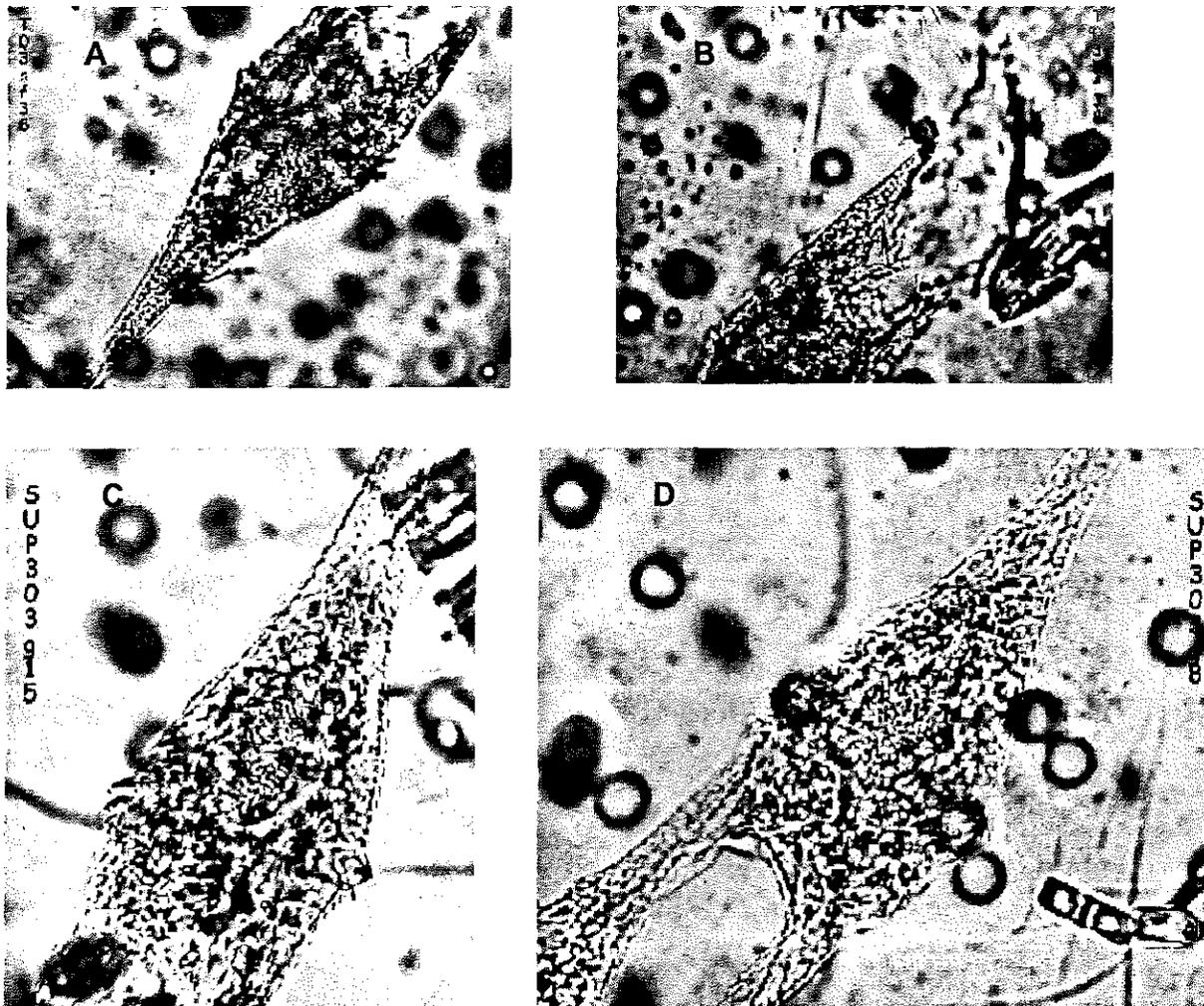


Figura 22. *Ceratium furca*. Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figuras A y B (sección de A) en tiempo 0, fijadas con formol. Figuras C y D, después de tratamiento experimental, fijadas con glutaraldehído. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.

### *Chaetoceros costatus*

Recolectada de la superficie, y puesta en irradiancia de 3%. En muestras con diferentes fijadores, parece tener una distribución de cloroplastos uniforme, sin diferencias aparentes (Fig. 23 A y B). No se localizaron más individuos de esta especie que pudieran confirmar el reposicionamiento.

### *Leptocylindrus minimus*

Recolectada de la superficie, y puesta en irradiancia de 3%. Se trata de células alargadas (fijadas con formol), con 2 o más cloroplastos agrupados en el centro de la célula en tiempo 0 (Fig. 24 A). Después de 30 minutos, con el mismo fijador, enseñan similar posición de los cloroplastos (Fig. 24 B).

### *Skeletonema costatum*

Recolectada de la superficie, y puesta en irradiancia de 3%. En imágenes escasas y de mala calidad, esta especie parece tener en tiempo 0, fijada con formol, cloroplastos en el extremo de la célula (Fig. 25 A). Después del tratamiento experimental, con glutaraldehído y formol, presenta cloroplastos agrupados en el centro de la célula o hacia un extremo (Fig. 25 B y C, respectivamente).

### Diatomea central

Recolectada de la superficie, y puesta en irradiancia de 3%, se trata posiblemente de una especie de *Coscinodiscus*. En tiempo 0, fijada con formol,

exhibe una agrupación de cloroplastos en el centro de la célula (Fig. 26 A y B). Después de la irradiación experimental, también en muestras fijadas con formol, tiene una distribución de cloroplastos en la periferia de la célula y muy posiblemente en toda su extensión (Fig. 26 C y D, de una misma célula con diferente enfoque).

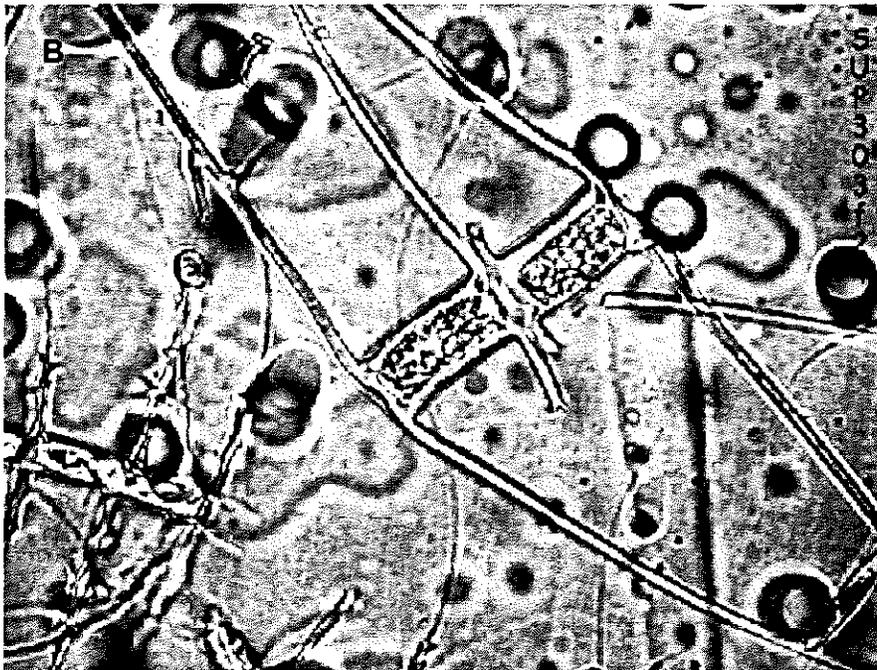
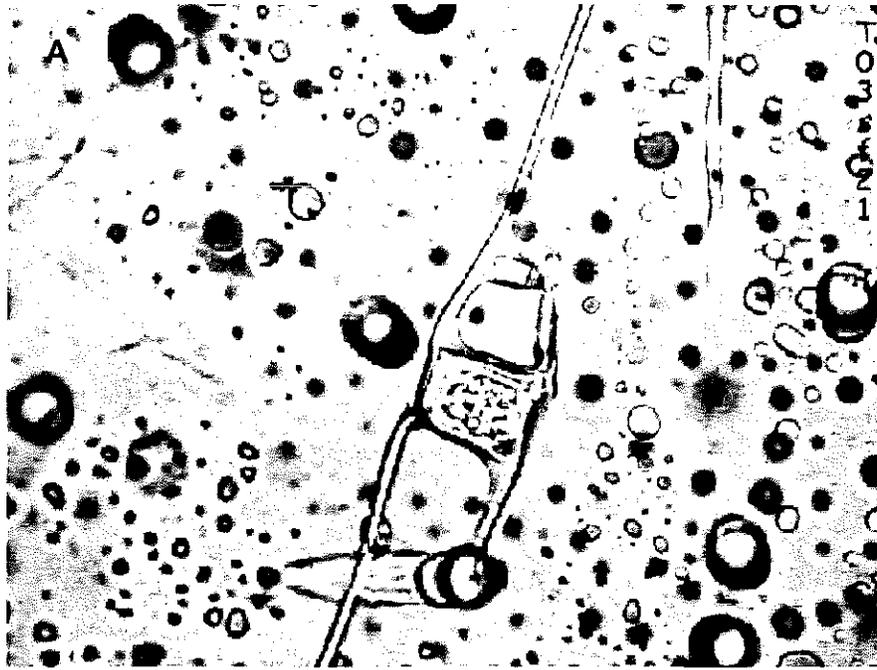


Figura 23. *Chaetoceros costatus*. Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figura A, tiempo 0, muestra fijada con formol. Figura B, después de tratamiento experimental, mismo fijador. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.



Figura 24. *Leptocylindrus minimus*. Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Figura A, tiempo 0; figura B después de tratamiento experimental. Ambas muestras fijadas con formol. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.

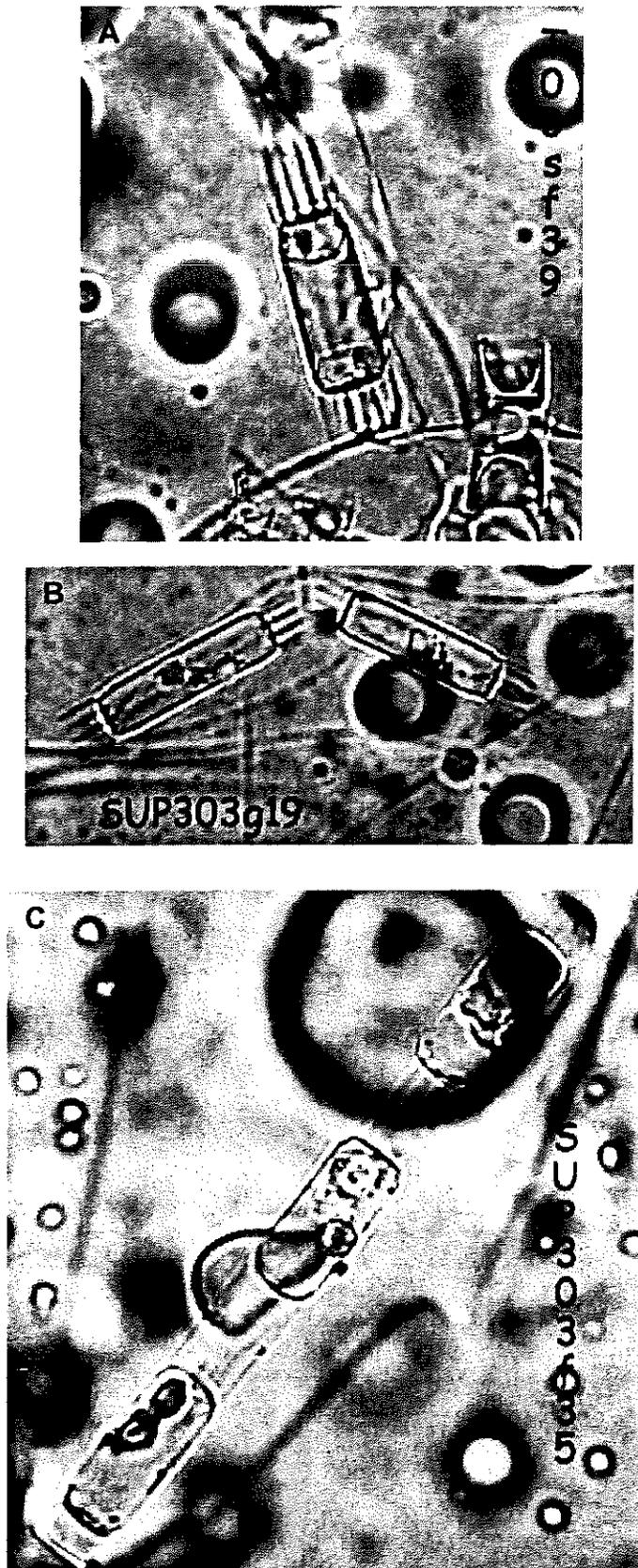


Figura 25. *Skeletonema costatum*. Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x Figura A, tiempo 0 fijada con formol. Figura B y C después de tratamiento experimental, fijadas con glutaraldehído y formol, respectivamente. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.

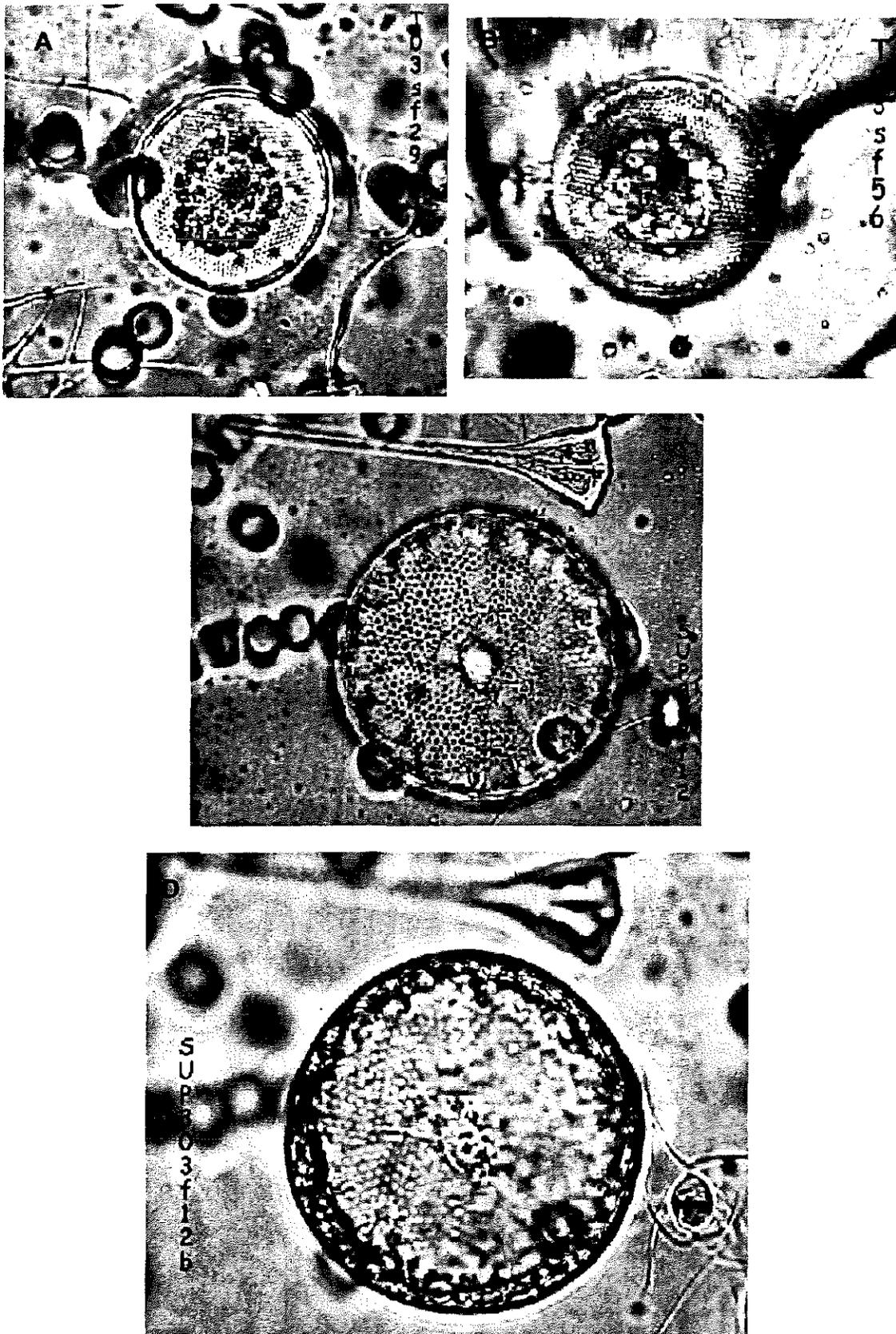


Figura 26. Imagen con luz de transmisión, muestra recolectada en superficie y montada en filtro de policarbonato, magnificación 100x. Diatomea central en tiempo 0 (figuras A y B), y después de la irradiación experimental (C y D), estas últimas son el mismo organismo con diferente enfoque en el microscopio. Todas fijadas con formol. Se puede observar el poro de los filtros ( $d = 8 \mu\text{m}$ ). Ver explicación en el texto.

## V DISCUSIÓN

El reposicionamiento de cloroplastos ha sido reportado en células fitoplanctónicas como respuesta a cambios en intensidades luminosas, con patrones que exhiben a los cloroplastos agrupados en los extremos de las células en baja irradiancia o distribuidos en toda la célula en alta irradiancia (Kiefer, 1973). Los reportes de migración de cloroplastos en el género *Thalassiosira* datan de 1905 (Mann, 1996), pero no se dan detalles de los géneros, aunque sí que se da como respuesta a la intensidad luminosa. En *Thalassiosira weissflogii*, no se presentó migración de cloroplastos ante el estímulo de cambios en iluminación de acuerdo a los patrones conocidos en fitoplancton. Las diferencias que se presentaron en los experimentos en el número de cloroplastos visibles y las áreas formadas por ellos podría resultar de la migración de cloroplastos inducida por la luz, o es posible que otro factor induzca cambios en la estructura interna de las células, ya que el control en el experimento 3 es similar al tratamiento. No se puede dejar la posibilidad de que el cultivo utilizado para el experimento 3 presentara un estado fisiológico diferente a los cultivos de los anteriores experimentos.

La mayor dificultad encontrada en la investigación está relacionada con el montaje de las muestras y la observación en el microscopio. En células pequeñas como *T. weissflogii*, menor de 15  $\mu\text{m}$ , la observación se dificulta por tratarse de una

célula pequeña, con cloroplastos de tamaños variables y algunas veces escasos y grandes. Sin embargo, algunos aspectos indican que existe un cambio intracelular, caracterizado por cambios en las áreas que cubren los cloroplastos y en el número de los mismos. En los experimentos 1 y 2, las pruebas cuantitativas mostraron una reducción en el número de los cloroplastos visibles, de tiempo 0 a 30 minutos en irradiación experimental, al igual que las áreas que formaron los cloroplastos. En el primer caso existe la posibilidad de un autosombreado de los cloroplastos, es decir, que vista una célula en tercera dimensión, se acomoden cloroplastos debajo de otros, y esto imposibilite su observación en un plano, como nosotros lo hicimos (Fig. 27), sin embargo, ninguna de las vistas de *T. weisflogii* (en su forma circular o rectangular) da aspectos alguna agrupación, o reposicionamiento en especial. Este asunto puede ser importante, así como que visiblemente los cloroplastos de los experimentos 1 y 2 son más grandes que los del experimento 3 (Figs. 10 y 11, respectivamente), sin embargo, no se cuantificó el tamaño de los cloroplastos. La información con microscopía de epifluorescencia no da información adicional, y el experimento que podría haber sido confirmativo, el número 3, no mostró cambios significativos en el número de cloroplastos visibles, no así en el área que cubrieron en la célula: en todos los experimentos hubo cambios significativos en las áreas que formaban los cloroplastos en tiempo 0 y después del tratamiento.

En el aspecto citológico, el cambio en las áreas que forman los cloroplastos en los tres experimentos puede ser indicio de un movimiento parcial, y esto debido a la morfología interna de las células. En su trabajo con la diatomea *Pleurosira*

*laevis*, Makita y Shihira-Ishikawa (1997), encuentran a los cloroplastos localizados entre las hebras citoplasmáticas que atraviesan la vacuola, que forman puentes por donde se da la migración de cloroplastos. En células vegetales, el tamaño de estas vacuolas puede variar, y adelgazar las hebras en células grandes, o engrosarlas en células pequeñas (Alberts, *et al.*, 1983), suponiendo que algo similar ocurriera en células fitoplanctónicas, sería posible que en células sin estos puentes bien definidos el reposicionamiento de cloroplastos pudiera no ser notorio. Los diámetros de algunas especies reportadas con migración son los siguientes: *Lauderia borealis*, 24-75  $\mu\text{m}$ ; *Pleurosira laevis*, 100  $\mu\text{m}$  aproximadamente; *Ditylum brightwelli*, 25-100  $\mu\text{m}$ ; *Actinocyclus*, eje apical 35-125  $\mu\text{m}$ ; *Pyrocystis lunula*, que tiene una forma que se sale del patrón general (no cilíndrica),  $\sim 20$   $\mu\text{m}$ . *T. weisflogii*, en la cepa con la que se trabajó, no tiene más de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio, sin embargo, algunas otras especies son mucho más grandes: *T. sackettii*, 43-53  $\mu\text{m}$ , *T. anguste-lineata*, 14-78  $\mu\text{m}$ ; *T. endoseriata*, 20-60  $\mu\text{m}$ , o *T. poro-irregulata*, 21-30  $\mu\text{m}$ . Con lo que es evidente que el movimiento de cloroplastos se ha reportado en especies grandes, y que alguna especie de *Thalassiosira* podría tener migración notoria de cloroplastos, como lo reportado; es posible también, que se reporten especies grandes con migración de cloroplastos por que es más sencilla su observación, pero Wagner y Grolig (1992), dan como un hecho que en células grandes el movimiento intracelular es más extensivo.

La funcionalidad y los mecanismos de la migración de cloroplastos no son

definidos claramente, especialmente lo primero. Inicialmente no parece haber un arreglo típico de los cloroplastos en las células, ni aún en macroalgas y plantas superiores, esto dependerá de la estructura de la célula misma, de las condiciones de irradiancia ("arreglos" de baja o alta irradiancia), y del mecanismo del reposicionamiento que exhiba la especie. Inicialmente, la migración de cloroplastos se funda en organismos inmóviles, adaptando su arreglo intracelular de acuerdo a las condiciones ambientales (Wagner y Grolig, 1992), y puede haber dos posibilidades: 1) El cloroplasto como participante en el flujo citoplasmático con distribución aleatoria, 2) o estrictamente como la migración de los cloroplastos mientras el citoplasma se mueve gracias a este movimiento.

En adición a lo precedente, algunas plantas tienen distintos arreglos de cloroplastos en la luz y en la oscuridad, en donde la distribución es aleatoria en el citoplasma, como resultado del control activo en condiciones con alta irradiancia, tratándose de una relajación, más no de una orientación específica a la luz (Wagner y Grolig, 1992). De acuerdo con lo anterior, el movimiento de cloroplastos puede basarse mecánicamente en microtúbulos, no relacionado directamente con la luz (siguiendo ritmos circadianos), y en los filamentos de actina, dependiendo de la calidad y dirección de la luz, definido este último en un orden secuencial basado en la presencia de fitocromo (no presente en el fitoplancton), sin embargo, se han estudiado los mecanismos del movimiento de cloroplastos en las diatomeas, el cual es muy similar al de plantas superiores y algas, que consiste igualmente en citoesqueletos formados por microfilamentos de actina y

microtúbulos de tubulina, que forman una red y soportan la movilidad de los organelos (Chen y Li, 1991; Mann, 1996). Un ejemplo de la organización intracelular y el movimiento de cloroplastos lo dan Wagner y Grolig (1992), donde las diatomeas céntricas *Biddulphia* y *Striatella*, y la alga unicelular *Eremosphaera*, tienen un núcleo suspendido por hebras citoplasmáticas en el centro de una larga vacuola, y a lo largo de estas hebras están los cloroplastos que se mueven a lo largo de ellas, de las paredes al núcleo, dependiendo de las condiciones luminosas. El fitoplancton tiene por definición orientación geométrica al azar, la célula no puede orientar los cloroplastos para maximizar la absorción de luz, lo mejor que puede lograr la célula es una distribución aleatoria de los cloroplastos cerca de la pared celular. En el caso de un agrupamiento de los cloroplastos, el beneficio aparente es la fotoprotección por autosombreado.

Algunos de los arreglos conocidos en fitoplancton son los siguientes: En *Lauderia borealis*, con alta irradiancia los cloroplastos migran a los extremos de la célula, mientras que en baja irradiancia se encuentran en toda la célula; en *Pleurosira laevis*, los cloroplastos están en las paredes de la célula, y después de un contacto eléctrico rodean al núcleo; en *Pyrocystis lunula*, los cloroplastos se agrupan al centro de la célula en alta intensidad, y en toda su extensión en baja intensidad. Entonces, la posición de los cloroplastos variará de especie en especie, y dependiendo de los mecanismos de movimiento intracelular (flujo citoplasmático, migración de cloroplastos basado en filamentos de actina o microtúbulos, o ambos), la organización intracelular en la célula y la forma de esta

misma (teóricamente, en una célula esférica, simétrica por tanto, el acomodo de los cloroplastos en las "paredes más cercanas" los ubicaría en todas direcciones en la pared de la célula, mientras que en una célula alargada, también simétrica, se trataría de una migración a los extremos).

Se intentaron observar cambios morfológicos causados por los fijadores comparando muestras *in vivo*, pero el supuesto cambio en la estructura interna de las células en lapsos cortos de tiempo, hizo difícil técnicamente contar los cloroplastos y medir las áreas que forman, ya que el análisis cuantitativo de las muestras llevaría horas, y la posición de los cloroplastos teóricamente podría cambiar. Kiefer (1973), utilizó un fijador basado en  $\text{OsO}_4$  y  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y no reporta influencia del fijador en la organización intracelular; Chen y Li (1991), utilizan glutaraldehído al 1% y hacen una pos fijación con  $\text{OsO}_4$  y para la preservación del citoesqueleto incuban sus muestras en ácido tánico. En términos generales, el glutaraldehído es un buen fijador de estructuras intracelulares y especialmente recomendado en la fijación de microtúbulos (Cáseres, 1995); es de esperarse que penetre rápidamente en las células (como es el caso de los aldehídos, por su bajo peso molecular), y la inmovilización del protoplasma por el entrecruzamiento de las proteínas y los ácidos nucleicos por el fijador (Navaluna, *et al.*, 1989). Entre los problemas que son reportados para el glutaraldehído, están la mala estabilización de las membranas, que pueden permanecer osmóticamente activas generando una deformación potencial después de la fijación (Boltovskoy, 1995), pero no se hace énfasis sobre grupos de fitoplancton especialmente afectados; en especies

sin estructuras silíceas, Verity *et al.* (1992) reportan una reducción del 29% ( $\pm$  14%) en el tamaño, en muestras fijadas con glutaraldehído. Las muestras naturales fueron fijadas con dos fijadores por separado: glutaraldehído y formaldehído (que presentan características similares, excepto porque este último penetra más rápidamente en las membranas), y es notable que *Asterionellopsis glacialis* parece exhibir cambios en la morfología o posición de los cloroplastos con ambos fijadores. Sin embargo, es posible que especies con paredes delgadas no sólo sean perforadas, sino que fácilmente se degraden como resultado de la fijación.

En el caso de las muestras naturales, los ejemplos que podrían evidenciar el movimiento de cloroplastos se dan en la diatomea central *Coscinodiscus* (?), *Asterionellopsis glacialis* y *Skeletonema costatum*, que son especies grandes (más de 20  $\mu\text{m}$ , y hasta 150) y de formas variadas. En la diatomea central, el arreglo de alta irradiancia (pues fueron recolectadas de la superficie) presenta a los cloroplastos en el centro de la célula, y posiblemente en la periferia, y después de 30 minutos con 3% de irradiancia los cloroplastos parecen distribuidos en toda la célula, pero preferentemente en las periferias. *A. glacialis*, presenta cambio en el número de cloroplastos visibles; de cuerpo alargado y poca área para sustentar cambios notables, en arreglo de alta irradiancia presenta un cloroplasto pequeño, y en arreglo de baja irradiancia presenta 2; sin embargo, este organismo es reportado con uno o dos cloroplastos en la literatura (Hasle y Syvertsen, 1997),

habiendo la posibilidad de que se trate de individuos con diferente número de cloroplastos, o de que los organismos de esta especie observados por otros autores mostraran un arreglo especial al momento de su fijación. En *S. costatum*, los cloroplastos aparecen en arreglo de alta irradiancia en el extremo de la célula, y en arreglo de baja irradiancia se presentan preferentemente en el centro, en un arreglo que podría parecer de alta irradiancia también, lo que nos lleva a pensar que la geometría de los cloroplastos es más sencillamente observable en especies con muchos de ellos. En algunos casos, como *Ceratium furca*, se presentó un problema en la observación, por ser una especie de pared celular gruesa. En este caso, las imágenes de epifluorescencia podrían ser de gran ayuda para su análisis.

En muestras naturales también se encontraron especies con diversos tamaños y cantidad de cloroplastos y formas (algunas especies de *Chaetoceros*, *Hemidiscus cuneiformis*, *Nitzscia* sp., y algunas diatomeas centrales y penales no identificadas), que parecen no haber sido afectadas por el tratamiento experimental, pero para poder definir con seguridad cambios en la posición de cloroplastos, es necesario tener numerosos organismos para su observación y su tratamiento estadístico.

Con referencia en la absorción, en su estudio con la diatomea *Lauderia borealis*, Kiefer (1973) midió después de 30 minutos de oscuridad, y en el transcurso de una fuerte iluminación, la fluorescencia *in vivo* y la absorción de las

células en suspensión, y encontró que la fluorescencia en los primeros 20 minutos fue de la mitad de la que al inicio del experimento, mientras que la absorción declinó hasta en un 40%, paralelo al movimiento de los cloroplastos. En otra especie fitoplanctónica, Stephens (1995) señala cambios en la eficiencia de la absorción espectral con la migración de cloroplastos. En macroalgas y plantas superiores, Nultsch *et al.* (1981) concluyeron que la tasa fotosintética fue independiente del arreglo de cromatóforos correspondiente, pero las órdenes de magnitud de tiempo (de hasta 8 horas en su experimentación), no corresponden con la velocidad del movimiento de los cloroplastos (de minutos a una hora) reportados para la diatomea *Lauderia borealis* por Kiefer (1973); Brugnoli y Björkman (1992), por su parte, encontraron que la inducción del movimiento de cloroplastos por luz azul causó cambios en absorptancia de diferentes especies de plantas, demostrando que puede haber un efecto significativo en la eficiencia de la utilización de la luz para la fotosíntesis. En términos de absorción de luz, los cloroplastos distribuidos en toda la célula tienen más posibilidad de captarla, a diferencia de una agrupación en cualquier parte de ella; sin embargo, el fenómeno es más complejo si se toma en cuenta al efecto de paquete por el "acercamiento" de los cloroplastos y su autosombreado: en volúmenes celulares grandes, con una misma cantidad de pigmentos, disminuye este efecto y la eficiencia de absorción es más alta o mejor, a diferencia de volúmenes celulares pequeños, donde es más baja. Kirk (1992), da un ejemplo para entender bien esto: células intactas de *Euglena gracilis* tienen valores máximos de absorción alrededor de 0.8, mientras que células rotas sin efecto paquete tienen valores de hasta 1.8. La aplicación del

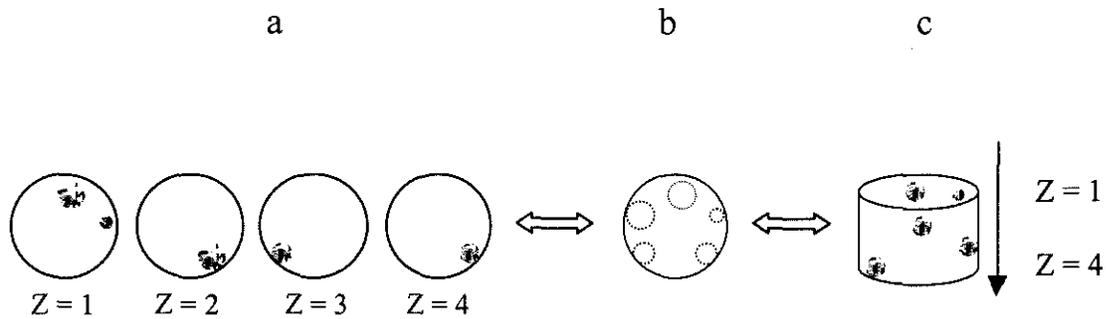
modelo de eficiencia de absorción con los cambios de las áreas que forman los cloroplastos en *Talassiosira weissflogii*, dan un cambio de 0.09 a 0.89 en la eficiencia de absorción con el aumento del tamaño de la célula, a pesar de no tratarse de agrupaciones notorias.

Analizando teóricamente las implicaciones del reposicionamiento de cloroplastos y los supuestos cambios en absorción, tenemos en primer plano que la luz provee de un flujo de fotones al aparato fotosintético (lugar donde se lleva a cabo la reacción fotoquímica para producir una molécula de oxígeno o reducir una molécula de bióxido de carbono; cada unidad fotosintética incluye el fotosistema I y II (PSI y PSII), que son los centros de reacción, además de los pigmentos accesorios que colectan la energía luminosa (fotones) para estos centros de reacción (Falkowski y Raven, 1997)), y este flujo está simplemente relacionado con la producción de O<sub>2</sub>, que a su vez da una medida de cuantos electrones son movidos del PSII al PSI. En un segundo plano existen varias posibilidades:

Caso I. Células con acomodo de cloroplastos de baja intensidad luminosa ante un aumento en intensidad luminosa.

Caso II. Células con acomodo de cloroplastos de alta intensidad luminosa ante un decremento de esa intensidad.

1)



2)

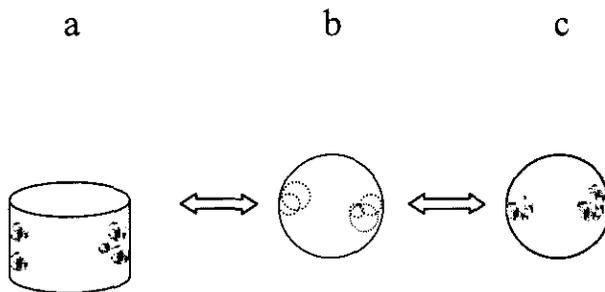


Figura 27. Distribución aleatoria de cloroplastos en el volumen celular. 1 a, observación en el microscopio, donde cada círculo representa la misma célula observada en diferentes niveles de enfoque; 1 b, arreglo de los cloroplastos real en la misma célula, no observado en un nivel de enfoque poco profundo; 1 c, vista en perspectiva de la ubicación de los cloroplastos en esa célula. 2 a y b, ubicación real de los cloroplastos en una célula; 2 c, efecto de sombreado de los cloroplastos, que se notan como dos o tres en el microscopio, siendo cinco en realidad.

En principio, esperamos que en todos los casos la respuesta del reacomodo de cloroplastos es más lenta que las respuestas fotoquímicas (separación de carga, transporte de electrones, reducción de la plastoquinona), además de que exista la posibilidad de activación de otras respuestas rápidas de aclimatación del fitoplancton (por ejemplo, el ciclo de las xantofilas). En el caso I, se suponen centros de reacción abiertos porque el flujo de fotones no sobreexcita al PSII y existe un flujo de electrones constante en el aparato fotosintético; ante el aumento de la intensidad luminosa podría darse una sobreexcitación del PSII, pero se espera que la migración de cloroplastos reduzca la absorción de luz (ya que se aminora el flujo de fotones) y actúe como un regulador. Si la luz es muy intensa, es muy posible que la inhibición de la fotosíntesis continúe. En el caso II, con un arreglo de cloroplastos para alta intensidad, y suponiendo a los centros de reacción cerrados, un cambio en la posición de los cloroplastos por la disminución de la irradiancia sería posterior a la apertura de los centros de reacción, pero finalmente adecuaría a la célula a absorber más luz en caso de que esta no fuera suficiente.

Siendo una curva fotosíntesis contra irradiancia ( $P$  vs.  $E$ ) la representación gráfica instantánea de la evolución del oxígeno con la intensidad luminosa, en el caso I se espera que la curva alcance más rápidamente  $P_{\max}$  (fotosíntesis máxima) por la óptima captación de luz por los cloroplastos (sin autosombreado), y una mayor inclinación de la pendiente inicial por el reacomodo de cloroplastos ante una alta intensidad luminosa. En el caso II, los cloroplastos en acomodo de alta

irradiancia regulan la cantidad de luz que llega a los fotosistemas, con una pendiente muy inclinada; posteriormente, ante la reducción de la intensidad los cloroplastos se acomodan optimizando la absorción, y esto es evidente en la pendiente, que alcanza más rápidamente  $P_{max}$ ; si la intensidad luminosa sigue en aumento es de esperarse en todos los casos fotoinhibición (Fig. 28).

En el futuro, hay que resolver la importancia de los ciclos endogénicos diurnos que puedan controlar la distribución de los cloroplastos (Wagner y Grolig, 1992); para tener datos más precisos ópticamente, hay que mejorar el montaje de las muestras microscópicas, en tal caso las primeras pruebas indican la posibilidad de utilizar el método de filtración/congelación/transferencia (filter-transfer-freeze (Hewes y Holm-Hansen, 1983)), que puede resolver el problema de la luz difusa que pasa por el filtro de policarbonato, que dificulta la visibilidad. En las muestras naturales se tuvo el problema específico de no encontrar suficientes células de la misma especie por el poco volumen filtrado para la preparación de las muestras microscópicas. Este problema se puede resolver con más volumen filtrado, y así tener un buen número de organismos, que den una respuesta estadística a la experimentación, y poder con seguridad afirmar o negar el reposicionamiento de los cloroplastos. Tenemos que los datos de áreas y número de cloroplastos con *T. weisflogii* sugieren cambios en la distribución interna, pero estos datos sólo se pueden comprobar con un análisis en tres dimensiones de la estructura de las células.

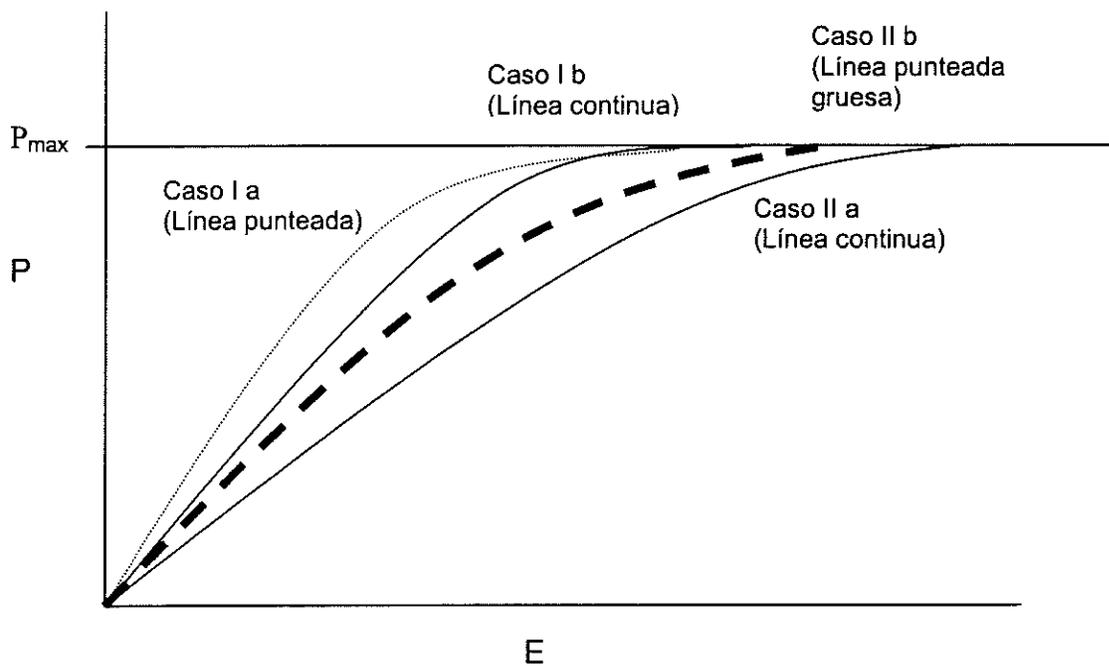


Figura 28. Curvas P vs. E con diferente posición de los cloroplastos. Caso I: se espera que la curva alcance más rápidamente  $P_{\max}$  (fotosíntesis máxima) por la óptima captación de luz por los cloroplastos (a), y una mayor inclinación de la pendiente inicial por el reacomodo de cloroplastos ante una alta intensidad luminosa (b). En el caso II, los cloroplastos en acomodo de alta irradiancia regulan la cantidad de luz que llega a los fotosistemas, con una pendiente muy inclinada (a); posteriormente, ante la reducción de la intensidad los cloroplastos se acomodan optimizando la absorción, y esto es evidente en la pendiente, que alcanza más rápidamente  $P_{\max}$  (b).

La migración de cloroplastos puede ser un factor importante en la absorción de fotones de luz natural, siendo un mecanismo de aclimatación, y tener influencia en la fotosíntesis natural y medida durante incubaciones. Además, puede ser importante en los métodos comúnmente usados en las mediciones de absorción *in vivo*, o en ensayos fluorométricos. La meta original de la tesis era establecer una relación entre el coeficiente de absorción específico de una suspensión de fitoplancton y la distribución intracelular de los cloroplastos; aún no se logra hacer mediciones de este tipo, y por eso se reduce la meta de la tesis en documentar cambios en la distribución intracelular de los cloroplastos, presentando las dificultades técnicas que esto supone. Esperamos resolver estos problemas, pues los cálculos muestran que la distribución de cloroplastos puede tener un papel fisiológico y ecológico importante.

## VI CONCLUSIONES

El reposicionamiento de cloroplastos en *Thalassiosira weissflogii* estuvo basado en el decremento del área de proyección que éstos cubren dentro de la célula y en la disminución de cloroplastos visibles de un tiempo a otro.

En *T. weissflogii* no se presenta una agrupación de cloroplastos típica para alta o baja irradiancia, y el reposicionamiento parece responder a otros factores, posiblemente endogénicos.

La reducción en el área transversal que cubren los cloroplastos con el aumento de irradiancia en *T. weissflogii* da como resultado un cambio probable en la eficiencia de absorción específica, como indican los cálculos.

Los resultados con muestras naturales no son concluyentes, sin embargo hay evidencias de posible migración de cloroplastos en algunas de las especies encontradas.

## VII RECOMENDACIONES

Para tener datos más precisos ópticamente hay que mejorar el montaje de las muestras microscópicas, evitando el uso de filtros y aceite de inmersión.

Igualmente, se recomienda el uso de la microscopía con deconvolución de imagen para tener imágenes en tres dimensiones de la distribución de los cloroplastos.

Resolver la importancia de los ciclos endogénicos que puedan controlar la distribución de los cloroplastos.

En muestras naturales, un mayor volumen filtrado resolvería el problema de la falta de especies para dar un respaldo estadístico a los resultados.

**LITERATURA CITADA**

ALBERTS, B.; BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M.; ROBERTS, K. y J. D. WATSON, 1983.

*Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Nueva York, 1046 p.

BERNER, T., DUBINSKY, Z., WYMAN, K. Y P.G. FALKOWSKI, 1989. Photoadaptation

and the "package" effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 25:

70-78.

BOLTOVSKOY, A., 1995. Técnicas de microscopía electrónica de barrido: aplicación a

las microalgas. En: Alveal, K., Ferrario, M. E., Oliveria E. C. y E. Sar (eds.).

*Manual de métodos ficológicos*, Universidad de Concepción, Chile, 825p.

BROWN T. E. y F. L. RICHARDSON, 1968. The effect of growth environment on the

physiology of algae: light intensity. *J. Phycol.*, 4: 38-54.

BRUGNOLI, E. y O. BJÖKMAN, 1992. Chloroplast movement in leaves: Influence on

chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance related to

$\Delta$ pH and zeaxantina formation. *Photosynthesis Research*, 32: 23-35.

CACERES, E. D., 1995. Métodos de preparación de algas para su observación con

microscopía electrónica de transmisión convencional (META). En: Alveal, K.,

Ferrario, M. E., Oliveria E. C. y E. Sar (eds.). *Manual de métodos ficológicos*, Universidad de Concepción, Chile, 825p.

CHEN, S. T. y C. W. LI, 1991. Relationships between the movements of chloroplasts and cytoskeletons in diatoms. *Botanica Marina*, 34: 505-511.

CLAYTON, R.K., 1970. *Light and living matter, the physical part*. McGraw-Hill, Nueva York, 148p.

DEMING-ADAMS, B., 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxantina. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1020: 1-24.

DUYSENS, L.M., 1956. The flattening of the absorption spectra of suspensions as compared to that of solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 19: 1-12.

FALKOWSKI, P. G. y T. G. OWENS, 1980. Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol*, 66: 592-595.

FALKOWSKI, P. G., 1984. Physiological responses of phytoplankton to natural light regimes. *Journal of Plankton Research*, 6 (2): 295-307.

FALKOWSKI, P. G. y J. A. RAVEN, 1997. *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Science, Massachusetts, 375p.

- GONZÁLEZ, M., PARRA O. y A. S. CIFUENTES, 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: Alveal, K., Ferrario, M. E., Oliveria E. C. y E. Sar (eds.). *Manual de métodos ficológicos*, Universidad de Concepción, Chile, 825p.
- GRAHAM, P. H. y B. B. PICCININ, 1977. Photosynthesis by natural phytoplankton populations. *Arch. Hidrobiol.*, 80 (4): 405-457.
- GRAHAM, P. H., 1980. The relationship between chlorophyll a fluorescence, diffuse attenuation changes and photosynthesis in natural phytoplankton populations. *Journal of Plankton Research*, 2 (2): 109-127.
- HALNET, D. y W. NULTSCH, 1991. The rôle of chromatophore arrangement in protecting the chromatophores of the brown alga *Dictyota dichotoma* against photodamage. *J. Plant Physiol.*, 138: 470-475.
- HAARDT, H y H. MASKE, 1987. Specific in vivo absorption coefficient of chlorophyll a at 675nm. *Limnol. Oceanogr.* 32(3): 608-619.
- HASLE, G. R. Y E.E. SYVERTSEN, 1997. *Marine diatoms*. En: Tomas, C.R. (ed.). *Identifying marine phytoplankton*, Academic Press, San Diego, 858p.
- HEWES, C.D. y G.F. HOLM\_HANSEN, 1983. A method for recovering nanoplankton from filters for identification with the microscope. The filter-transfer-freeze (FTF) technique. *Limnol. Oceanogr.* 28: 770-776.

HAUPT, W., 1973. Role of light in chloroplast movement. *Bioscience*, 23 (5): 289-296.

KIEFER, D. A., 1973. Chlorophyll *a* fluorescence in marine centric diatoms: responses of chloroplasts to light an nutrient stress. *Marine Biology*, 23: 39-46.

KIRK, J. T. O., 1994. *Ligth and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, Gran Bretaña, 509p.

KRAML, M., 1999. Induction of chloroplast movement in the green alga *Mougeotia* by blue and UV light. *Abstracts of papers scheduled for the 53rd annual meeting of the Phycological Society of America at the XVI International Botanical Congress*.

LARKUM, A. W. D. y J. BARRET, 1983. Light-harvesting processes in algae. En: Woolhouse H. W. (ed.). *Advances in botanical research*, Academic Press, volumen 10, 219p.

LOUDON, G. M., 1984. *Organic chemistry*. ADDISON-WESLEY PUBLISHING COMPANY, USA, 1451p.

MAKITA, N. e I. SHIHIRA-ISHIKAWA, 1997. Chloroplast assemblage by mechanical stimulación and intercellular transmission in diatom cells. *Protoplasma*, 197: 86-95.

- MANN, D. G., 1996. Chloroplasts morphology, movements and inheritance in diatoms. En: Chaudhary B. R. y S. B. Agrawal (eds.). *Citology, genetics and molecular biology of algae*, SPB Academic Publishing bv, Nueva York, 439p.
- MOREL, A. y A. BRICAUD, 1981. Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep-Sea Research*, 28A (11): 1375-1393.
- NAVALUNA, N. A., PERRY, M. A. y M. C. TALBOT, 1989. The effect of chemical fixation on some optical properties of phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 11(1): 15-24.
- NULTSCH, W. y J. PFAU, 1979. Occurrence and biological role of light-induced chromatophore displacements in seaweeds. *Marine Biology*, 51: 77-82.
- NULTSCH, W., PFAU, J. y U. RÜFFER, 1981. Do correlations exist between Chromatophore arrangement and photosynthetic activity in seaweeds?. *Marine Biology*, 62: 111-117.
- PARSONS, T. R., TAKAHASHI M. y B. HARGRAVE, 1995. *Biological oceanographic processes*. Butterworth Heinemann, Oxford, 330p.
- RICHARDSON, K., BEARDALL J. y J. A. RAVEN, 1982. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol*, 93: 157-191.

- SEO, K. S. y L. FRITZ, 1999. Diurnal movement and ultrastructure in the marine dinoflagellate genus, *Pyrocystis* Murray Ex Haeckel. *Abstracts of papers scheduled for the 53rd annual meeting of the Phycological Society of America at the XVI International Botanical Congress*
- SHIBATA, K., BENSON A. A. y M. CALVIN, 1954. The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 15: 461-470.
- SMITH, K. C., 1989. *The science of photobiology*. Plenum Press, Nueva York.
- STEEMANN N. y T. S. Park, 1964. On the time course in adapting to low light intensities in marine phytoplankton. *J Cons Int Explor Mer*, 29: 19-24.
- STEPHENS, F. C., 1995. Variability of spectral absorption efficiency within living cells of *Pyrocystis lunula* (Dinophyta). *Marine Biology*, 122: 325-331.
- TLALKA, M. y H. GABRY'S, 1993. Influence of calcium on blue-light-induced chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Planta*, 189: 491-498.
- VERITY, P. G., ROBERTSON, C. Y., TRONZO, C. R., ANDREWS, M. G., NELSON, J. R. y M. E. SIERACKI, 1992. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 37 (7): 1434-1446.

WAGNER, G., Y F. GROLIG, 1992. Algal chloroplast movements. En: Melkonian M. (ed.). *Algal cell motility*, Chapman and Hall, Nueva York.

WILLIAMSON, R.E., 1993. Organelle movements. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44: 181-202.

