



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Biologiako Gradua / Grado en biología

# EL EFECTO DE LA ACIDIFICACIÓN DE LOS OCÉANOS SOBRE MICROALGAS DE LA DIVISIÓN CHLOROPHYTA

Egilea/Autor:  
Javier Alegria Zufía  
Zuzendariak/Directores:  
Sergio Seoane Parra y Aitor Laza Martínez

## ÍNDICE

ABSTRACT.....	2
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Cultivos de fitoplancton.....	8
Preparación de los medios de cultivo.....	8
Manipulación del pH.....	9
Diseño experimental.....	10
Problemas en el mantenimiento del pH constante.....	12
RESULTADOS.....	13
Comparación entre las tasas de crecimiento de una misma cepa a diferentes Ph.....	13
Comparación entre tasas de crecimiento a un mismo pH para diferentes cepas.....	14
DISCUSIÓN.....	15
Mantenimiento de un pH estable.....	15
Respuesta de cada cepa a los tratamientos de pH.....	15
Respuesta comparada de cada cepa a un mismo tratamiento de pH.....	17
CONCLUSIÓN.....	18
AGRADECIMIENTOS.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	18

## **ABSTRACT**

Three strains of the division Chlorophyta (*Nephroselmis pyriformis* strain CGA7, *Pyramimonas orientalis* strain CGA13 and *Pyramimonas propulsa* strain CGA16) were grown at four different pH levels (from a control at pH 8.1 to pH 7.2). Growth rates were measured for each strain and treatment. Strains did not show a uniform response to the acidification of the medium, even though all strains showed an increase of their growth rates at pH 7.5. Only *N. pyriformis* showed an increase of the growth rate at pH 7.2. It is concluded that Chlorophytes do not show a common response to the acidification of the medium, and that increases in growth rates could happen for the tested species at an ocean acidification scenario.

## **RESUMEN**

Se cultivaron tres cepas de la división Chlorophyta (*Nephroselmis pyriformis* cepa CGA7, *Pyramimonas orientalis* cepa CGA13 y *Pyramimonas propulsa* cepa CGA16) en medios a cuatro pH diferentes (rango desde un control a pH 8.1 a pH 7.2). Se midieron las tasas de crecimiento para cada cepa y tratamiento. Las cepas no mostraron una respuesta uniforme a la acidificación del medio, aunque todas mostraron un incremento de sus tasas de crecimiento a pH 7.5. Únicamente *N. pyriformis* mostró un incremento de sus tasas de crecimiento a pH 7.2. Se concluye que la división Chlorophyta no muestra una respuesta uniforme a la acidificación del medio, pero que las tasas de crecimiento pueden verse incrementadas para las especies testadas en futuros escenarios de acidificación de los océanos.

## INTRODUCCIÓN

La acción humana está causando graves trastornos a los ecosistemas del planeta. Hasta ahora han sido muchos los estudios realizados acerca del calentamiento global, la destrucción de hábitats o la dispersión de las especies entre otros. A continuación trataremos un problema quizás menos conocido pero igualmente importante: la acidificación de los océanos.

Desde la revolución industrial, los niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera se han incrementado a un ritmo 100 veces superior a la época preindustrial. Esta situación ha provocado un aumento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> de 280 a 384ppm (Solomon et al. 2007).

Los océanos tienen un papel fundamental en el intercambio de CO<sub>2</sub> con la atmósfera. De manera que a medida que la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico crece el océano presenta también una concentración de CO<sub>2</sub> mayor (The Royal Society 2005). Este equilibrio está regulado por la ley de Henry:



Esta relación nos indica que a una salinidad y temperatura constante, la presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) y la concentración de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> están linealmente correlacionadas. A su vez, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tiene una serie de disociaciones que se representan a continuación:



Las ecuaciones (2) y (3) muestran que las concentraciones de tres compuestos del sistema carbonato y de H<sup>+</sup> están intrínsecamente relacionadas, por lo que es imposible variar una sin variar las demás. La ecuación (1) muestra cómo esta relación se extiende también al CO<sub>2</sub> en estado gas, con lo que tenemos que al aumentar pCO<sub>2</sub> aumentará la

concentración de  $H^+$  y por tanto disminuirá el pH, causando la acidificación de los océanos.

Desde la revolución industrial (últimos 200 años) el océano ha absorbido la mitad de las emisiones de  $CO_2$  de origen antrópico, bajando su pH medio de 8.2 a 8.1 (The Royal Society 2005). Si el incremento de la concentración de  $CO_2$  continúa al mismo ritmo, en el año 2100 podría haber una concentración atmosférica de 788ppm según el escenario IS92a del IPCC (2001), que resultaría en una reducción de 0.5 unidades de pH frente a los niveles preindustriales en la superficie de los océanos (Caldeira & Wickett 2003, The Royal Society 2005). De esta manera y según este modelo podemos prever un pH medio en la superficie de los océanos de 7.8 en el año 2100.

De acuerdo con las predicciones de Caldeira & Wickett (2003), en el año 2300 se alcanzará el pH mínimo, correspondiente a 7.43, 0.77 unidades de pH menos frente a los niveles preindustriales. El aumento de la concentración atmosférica de  $CO_2$  y la velocidad de dicho aumento sería un hecho sin precedentes en los últimos 300 millones de años (Caldeira & Wickett 2003, Hönisch et al. 2012).

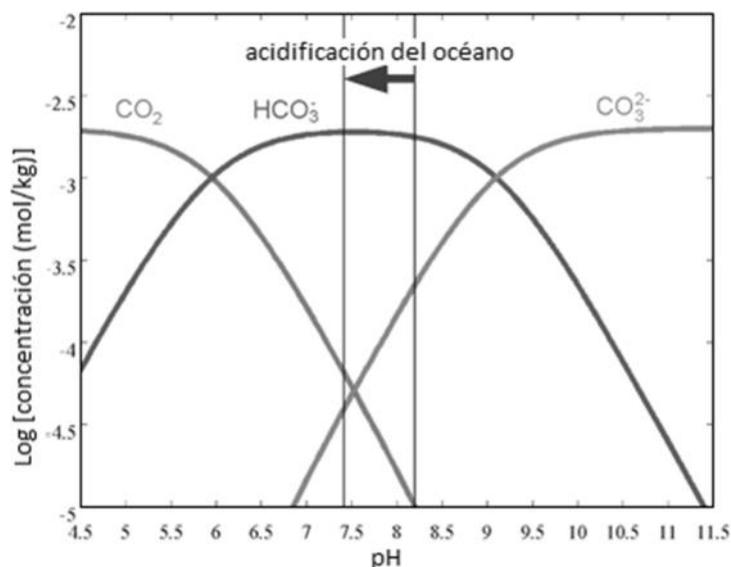


Figura 1. Cambios en el sistema carbonato en función del pH

Uno de los principales efectos del descenso del pH es el cambio en la saturación de  $CaCO_3$

$$\Omega = \frac{[Ca^{2+}] [CO_3^{2-}]}{K_{sp}} \quad (3)$$

La acidificación, como vemos en la figura 1, causaría un descenso en la concentración de  $\text{CO}_3^{2-}$ , provocando una disminución sustancial de la saturación para  $\text{CaCO}_3$  ( ) (3) y por tanto de la profundidad del horizonte de saturación. Esto afectaría a la supervivencia de organismos con estructuras de  $\text{CaCO}_3$  (Orr et al 2004).

Los efectos de la acidificación sobre los organismos marinos son múltiples y pueden afectar a cualquier nivel de la cadena trófica. El fitoplancton está en la base de esta cadena, por lo que es importante conocer su comportamiento en estos posibles escenarios futuros. Los efectos que podría tener sobre las microalgas se muestran principalmente mediante tres vías: el descenso en la saturación de  $\text{CaCO}_3$ , el aumento de la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  y el propio descenso del pH.

El decremento en la saturación de  $\text{CaCO}_3$  afectaría únicamente a los cocolitofóridos, pertenecientes al filo Haptophyta, ya que son los principales organismos fitoplanctónicos calcificadores. Los efectos previstos serían una reducción de sus tasas de crecimiento a causa del adelgazamiento de las escamas de  $\text{CaCO}_3$ . No obstante, hasta ahora han sido pocos los efectos mostrados sobre estas algas (Jonhston 1996, Iglesias-Rodriguez et al. 2008, Langer et al. 2009, Ridgwell et al. 2009)

En el caso del aumento de la disponibilidad de  $\text{CO}_2$ , la afección viene ligada a la saturación del ciclo de Calvin-Benson. La enzima encargada de la fijación del carbono, la RUBISCO, no tiene una gran afinidad por el  $\text{CO}_2$  y, consecuentemente, para muchas especies sólo llega a la mitad de la saturación. A esto se suma la afinidad de la RUBISCO por el oxígeno, que disminuye notablemente la eficiencia de la fotosíntesis desviando la producción a fotorrespiración.

Actualmente la  $p\text{CO}_2$  no es lo suficientemente alta como para saturar a la enzima, por tanto, un aumento del  $\text{CO}_2$  podría suponer también un aumento de la producción fitoplanctónica. No obstante, la mayoría de algas han desarrollado mecanismos de concentración de carbono (MCC), que les permiten saturar la fotosíntesis incluso en situaciones de bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  (Giordano et al. 2005). Por esta razón no se prevén grandes variaciones sobre la producción microalgal total a este respecto (Berge et al. 2010).

Por otro lado tenemos el efecto que pueda tener un pH más bajo. Una mayor acidez oceánica podría causar un mayor gasto de energía en el mantenimiento interno del pH (Raven 1980, Raven & Lucas 1985) o una alteración en el equilibrio de los metales en disolución, afectando a la absorción de los mismos (Granéli & Haraldsson 1993). Estos cambios en los equilibrios celulares podrían afectar al rendimiento metabólico y en última instancia a la tasa de crecimiento.

Algunos estudios utilizando microcosmos y mesocosmos han mostrado alteración en la composición de especies en respuesta al descenso de pH e incremento de CO<sub>2</sub>, mientras que otros han mostrado efectos muy limitados en la composición específica (Tortell et al. 2002, Kim et al. 2006, Feng et al. 2009). Estos estudios de micro y mesocosmos tienen la ventaja de poder ofrecer resultados acerca de comunidades completas de fitoplancton. No obstante, sus conclusiones son difíciles de interpretar y están sujetas a varios artefactos que puedan distorsionar su precisión:

- 1.-Los organismos no se verán sometidos a la sedimentación en las botellas de cultivo de la misma manera que lo harían en la naturaleza. Así que algunas especies de diatomeas no móviles de crecimiento rápido podrían dominar la comunidad en una semana (Berge et al. 2010).
- 2.-Las diluciones, típicamente del 50% al día, se realizan para evitar la limitación de los nutrientes y el incremento del pH. No obstante esto podría suponer la eliminación de especies de crecimiento más lento (Berge et al. 2010).
- 3.-El descenso del pH puede no afectar de manera directa, sino indirecta, alterando los ciclos de competidores y depredadores (Pedersen & Hansen 2003).
- 4.-Es imposible determinar cuál es el tiempo de aclimatación requerido. Un tiempo de aclimatación largo podría alterar la comunidad que originalmente fue muestreada (Berge et al. 2010).

Por estas razones, es más recomendable recopilar primero información acerca de cómo afecta un pH bajo a las especies de manera aislada (Berge et al. 2010). Tras una revisión bibliográfica detallada de un número representativo de los estudios sobre cultivos uniespecíficos, Berge et al. (2010) concluye que la tendencia general de los taxones estudiados hasta ahora es que un pH más bajo no tenga efecto sobre las tasas de

crecimiento del fitoplancton. No obstante, sí se han reportado variaciones en algunas especies como se lee a continuación.

Algunas especies de fitoplancton se ven beneficiadas por este descenso. Como podemos observar en la tabla 1, hay un número considerable de especies que presentan tasas de crecimiento mayores a pH cercanos a 7.5 (Humphrey 1975).

**Tabla 1. Especies con sus rangos de crecimiento óptimos. Entre paréntesis está el pH observado en el que presentan mayor crecimiento. Extraído de Humphrey (1975) y Hwang & Lu (2000)**

<b>Especies</b>	<b>pH óptimo</b>
<i>Amphidinium carterae</i>	7.0–10.0 (7.0)
<i>Biddulphia aurita</i>	7.4–8.6 (7.5)
<i>Chaetoceros didymum</i>	7.3–9.0 (7.5)
<i>Cylindrortheia closterium</i>	6.4–8.3 (7.3)
<i>Gymnodinium splendens</i>	7.3–8.0 (7.3)
<i>Monochrysis lutheri</i>	7.4–8.5 (7.5)
<i>Nitzschia closterium</i>	6.4–7.8 (6.3)
<i>Nitzschia</i> sp.	7.5–9.6 (7.6)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	7.3–9.5 (7.8)
<i>Alexandrium minutum</i>	7.5

Un caso notable es el del dinoflagelado tóxico *Alexandrium minutum*, que a pH 7.5 muestra crecimiento y toxicidad máximos (Hwang & Lu 2000). Además, estudios más recientes a esos niveles de pH apuntan a un aumento de la toxicidad y crecimiento a largo plazo a causa de la adaptación genética y fisiológica (Flores-Moya et al. 2012). También se han reportado blooms a pH menores a 7.5 en la especie *Dinophysis acuminata* (Hinga 1992). Estos resultados podrían apuntar a un futuro aumento de la frecuencia en los blooms de ciertas especies.

En algunos casos, se han reportado también reducciones en la tasa de crecimiento de algunas especies (Jonhston 1996). También es importante mencionar, que algunos investigadores han apuntado a una correlación entre tasas de crecimiento bajas y pH bajos para diatomeas y dinoflagelados (Yoo 1991, Hinga 1992). Este es por tanto el

punto con mayor controversia y que con más urgencia necesita ser esclarecido por la comunidad científica.

En la bibliografía se observó una falta de estudios acerca de la respuesta de la división Chlorophyta a bajos pH. No obstante, es un grupo de gran importancia en muchos ecosistemas marinos, observándose como grupo dominante en algunas zonas costeras del País Vasco (Alonso 2011). A fin de ampliar el conocimiento de los efectos de la acidificación sobre este grupo, se ha llevado a cabo un estudio con tres cepas de Chlorophyta sometidas a las condiciones de pH en los escenarios previstos por Caldeira & Wickett (2003). El objetivo de este experimento será conocer si las cepas estudiadas del grupo Chlorophyta tampoco verán afectadas sus tasas de crecimiento como parece ser la tendencia general.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Cultivos de fitoplancton.** Se seleccionaron tres cepas diferentes de la división Chlorophyta: *Pyramimonas propulsa* (cepa CGA16), *Pyramimonas orientalis* (cepa CGA13) y *Nephroselmis pyriformis* (cepa CGA7). Las tres cepas provienen de cultivos de la colección del laboratorio de ecología del fitoplancton de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Estos cultivos son procedentes de cepas aisladas a partir de muestras del estuario de Bilbao entre los años 2006 y 2008. Todas las cepas fueron mantenidas en medio F/2 a una salinidad de 30 y una temperatura de 17°C, con una intensidad lumínica de 100μEinsteins/m<sup>2</sup>s y ciclos de luz oscuridad de 12:12.

**Preparación de los medios de cultivo.** Se realizó medio de cultivo F/2 a una salinidad de 30. Para ello, se filtró agua de mar procedente de la estación marina de Plencia con filtros de 22.0μm de diámetro de poro, se esterilizó en el autoclave y tras dejar enfriar a temperatura ambiente se le añadieron vitaminas, fosfato, nitrato y micronutrientes. Las altas temperaturas del proceso de autoclavado pueden cambiar los equilibrios de los gases y durante el enfriamiento posterior es habitual la formación de precipitados. Estos factores junto con la adición de los nutrientes pueden afectar al pH, por lo que se midió el pH con un pHmetro Crison GLP 21 antes y después de autoclavar y se observó que los valores estabilizaban a partir de las 48 horas (ver figura 2).

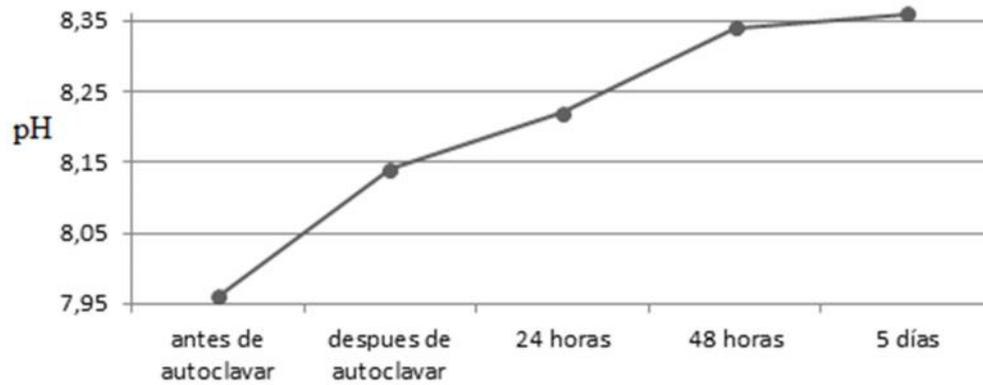


Figura 2. Evolución del pH en el medio. Después de autoclavar incluye el haber añadido los nutrientes y vitaminas

Se observó también que las cepas que se cultivaron con un medio recién realizado no prosperaron. Por estos motivos en la fase experimental sólo se empleó medio con un mínimo de 48 horas de reposo.

**Manipulación del pH.** Para testar de manera experimental el efecto del descenso de pH en cultivos monoespecíficos, se preparan medios de cultivo en los que se manipula el pH. Los métodos más comunes para manipular el pH son la adición de HCl/NaOH y el bombeo de CO<sub>2</sub>. La adición de HCl en el método de HCl/NaOH reduce el pH mediante la disminución de la alcalinidad total pero manteniendo constante carbono inorgánico disuelto (CID). Por el contrario, el bombeo de CO<sub>2</sub> reduce el pH aumentando el CID pero manteniendo la alcalinidad total constante.

Las principales diferencias entre ambos métodos radican en la concentración de bicarbonato y la pCO<sub>2</sub>. Éstas comienzan a ser significativas a pH inferiores a 7,5, donde la pCO<sub>2</sub> y el bicarbonato son superiores en un 23% y 22% respectivamente en el método del bombeo de CO<sub>2</sub> frente al método del HCl/NaOH. Como el océano ya tiene el bicarbonato en saturación para las algas que basan sus MCC en este compuesto, no debería haber diferencias prácticas entre ambos a este respecto. En cuanto a la diferencia en la pCO<sub>2</sub>, sólo debería afectar a los organismos sin MCC que basen su asimilación de carbono en la difusión pasiva de CO<sub>2</sub> (Hurd et. al 2009, Schulz et. al 2010).

Otro factor a tener en cuenta en la metodología es que el bombeo de CO<sub>2</sub> podría causar estrés por el burbujeo constante, alterando las tasas de crecimiento del fitoplancton (Hurd et. al. 2009, Shi et al. 2009). Además los resultados obtenidos tienden a ser más

variables y menos fiables que los obtenidos por el método HCl/NaOH (Shi et al. 2009, Iglesias-Rodriguez et al. 2008).

Salvo excepciones muy concretas, las clorofitas basan sus MCC en la asimilación activa de CO<sub>2</sub> y bicarbonato (Giordano et al. 2005), por esta razón se decidió la utilización del método HCl/NaOH. El método del bombeo de CO<sub>2</sub> se descartó por la menor fiabilidad de los resultados y mayor complejidad técnica (Schulz et. al 2010).

**Diseño experimental.** Por cada cepa se realizaron cuatro muestras a diferentes pH y tres réplicas por pH. Los pH seleccionados fueron 8.1, 7.8, 7.5 y 7.2. El pH 8.1 fue el control del experimento y corresponde a la media actual de pH en los océanos (The Royal Society 2005). Los pH 7.8 y 7.5 corresponden a los escenarios previstos en 2100 y 2300 respectivamente (Caldeira & Wickett 2003). Al ajustar el pH se admitió un error de  $\pm 0.05$  unidades de pH respecto a los valores experimentales.

Las cepas se cultivaron en botellas de cultivo (Thermo scientific modelo Nunclon delta Surface) con un volumen de 80ml. Siguiendo las recomendaciones de Hurd et al (2009) las botellas de cultivo se llenaron hasta los 60ml y se aisló la membrana transpirable del tapón con parafilm. De esta manera se evitó la pérdida de CO<sub>2</sub>, saturando con este gas un volumen de aire inferior al 50% de la botella. Éste es un factor de especial interés en la muestra de pH 7.2.

Para establecer los cultivos al pH correspondiente sin una variación brusca que pudiese afectar a la tasa de crecimiento, primeramente se establecieron todos los cultivos a pH 8.1. Cada 24 horas se bajaron 0.3 unidades de pH hasta alcanzar el pH de cada tratamiento.

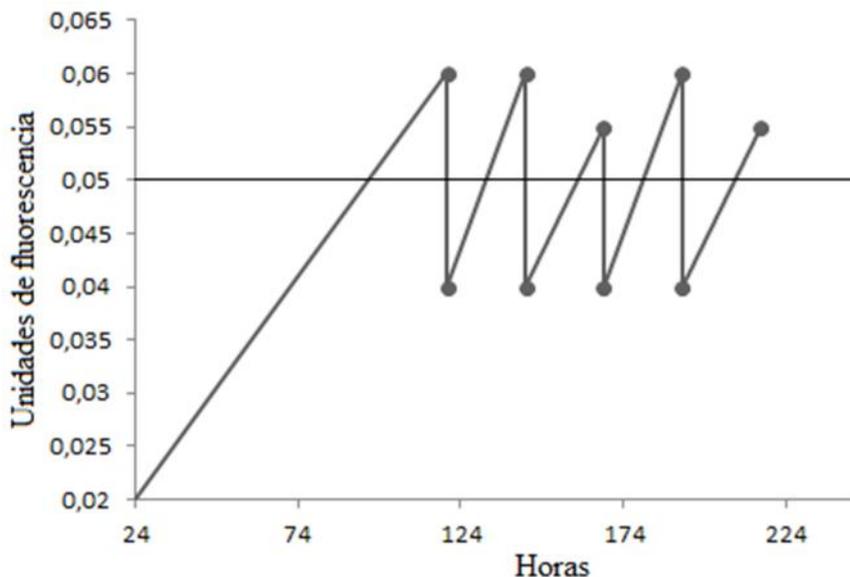
Mantener un cultivo a un pH constante es difícil, y pueden darse grandes variaciones en el pH en 24 horas (Barker 1935). Además, en los primeros cultivos se observó la dificultad de mantener un pH estable a los valores 7.5 y 7.2, consecuencia seguramente de la absorción de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis. Por estos motivos se tomaron las siguientes precauciones: Se midió el pH cada 24 horas a fin de mantener un control más estricto y se mantuvo una concentración celular baja como se indicará a continuación (Hurd et al. 2009).

El crecimiento se midió cada 24 horas, salvo en el comienzo de la fase lag, que se medía cada 48 horas. Para seguir el crecimiento de los cultivos se medía la fluorescencia como

aproximación a la concentración de clorofila y, por tanto, de biomasa algal. Para ello se empleó un fluorímetro Turner Designs 10-100R fluorometer. Cuando el cultivo superaba las 0.05 unidades de fluorescencia se realizaron diluciones con medio de cultivo de hasta un 60% con el objetivo de mantener una concentración celular baja que afectase lo mínimo al pH (Hurd et al. 2009). Las diluciones se llevaron a cabo bajo la campana de extracción para evitar contaminación del medio y para no provocar cambios bruscos de pH se empleó medio al pH de cada tratamiento. El pH fue medido tanto antes como después de cada dilución y en caso de ser necesario se ajustaba el pH. En la figura 3 se puede ver cómo se reducían las unidades de fluorescencia en una réplica tras cada dilución. Con las medidas de la fluorescencia se utilizó la siguiente fórmula para calcular la tasa de crecimiento:

$$\mu = \frac{\ln(X_{t1}-X_{t2})}{t1-t2}$$

Donde  $X_{t1}$  es la fluorescencia a  $t_1$  y  $X_{t2}$  es la fluorescencia a  $t_2$ .



**Figura 3. Ejemplificación de la variación en las medidas de fluorescencia con las diluciones. Se observa como al superar 0.05 unidades se realiza una dilución haciendo descender las unidades de fluorescencia. Esta figura corresponde a la réplica 3 de CGA 7 a pH 7.2.**

Cuando las tasas de crecimiento se estabilizaban y la curva logarítmica de las medidas de fluorescencia presentaba una disposición lineal, se consideró que se había llegado a la fase exponencial. En esta fase se recopilaban las medidas de fluorescencia de al

menos 5 días. Si no se alcanzaba la fase exponencial en un periodo menor a 10 días se consideró que la cepa tenía un crecimiento nulo a ese pH.

Durante toda la fase experimental se mantuvieron las condiciones de intensidad de luz, temperatura y ciclos de luz:oscuridad iguales a las que se utilizaron para el mantenimiento de las cepas desde su aislamiento. De esta manera se evitó un periodo de aclimatación a estos factores.

Las tasas de crecimiento en la fase exponencial a cada pH se compararon para ver si existían diferencias significativas entre sí. A continuación, se compararon las tasas de crecimiento de la fase exponencial para un mismo pH entre diferentes cepas. Para realizar las comparaciones se empleó el programa estadístico SPSS 19. En todos los análisis se utilizó una prueba previa para comprobar si había diferencias significativas entre las varianzas. En caso de no haberlas se continuó el análisis con ANOVA para un factor y el test post-hoc de Tukey; en caso de verse diferencias significativas entre las varianzas se realizó la prueba de Welch y el test post-hoc de Tamhane.

**Problemas observados en el mantenimiento del pH constante.** Tras mantener las tres cepas a cuatro pH diferentes (8.1, 7.8, 7.5 y 7.2) se obtuvieron diferentes respuestas en el mantenimiento del pH. En los tratamientos para pH 7.8 y pH 8.1 (control) no se observaron problemas para mantener el pH estable dentro de los rangos establecidos como admisibles ( $\pm 0.05$ ) en la mayor parte de los días. Las tasas de crecimiento correspondientes a los días en los valores de pH se salieron del rango establecido para los tratamientos de pH 7.8 y pH 8.1 fueron descartados del tratamiento estadístico.

**Tabla 2. Incrementos medios de pH en las muestras a pH 7.5 y 7.2 de las diferentes especies**

	7.5		7.2	
	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.
CGA7	0.092	0.058	0.163	0.027
CGA13	0.0656	0.051	0.262	0.054
CGA16	0.049	0.062	0.15	0.046

En cambio, sí se observaron problemas para mantener los tratamientos a pH 7.2 y 7.5 dentro de los rangos de pH establecidos a pesar de las medidas de precaución tomadas. Dado que se superó el rango de pH permitido en la mayor parte de los días, no se descartó ninguna tasa de crecimiento para los cálculos estadísticos. En la tabla 2 se puede observar la media y desviaciones típicas de los aumentos de pH en estos tratamientos.

## **RESULTADOS**

Las medias de las tasas de crecimiento en fase exponencial de las tres réplicas para cada tratamiento se representan en la figura 4. En ella se puede observar que *Nephroselmis pyriformis* muestra las mayores tasas de crecimiento a cualquiera de los valores de pH. *Pyramimonas orientalis* y *Pyramimonas propulsa* muestran patrones parecidos en las tasas de crecimiento a diferentes pH, aunque en *Pyramimonas orientalis* se observan tasas mayores a los pH 7.2, 7.5 y 7.8.

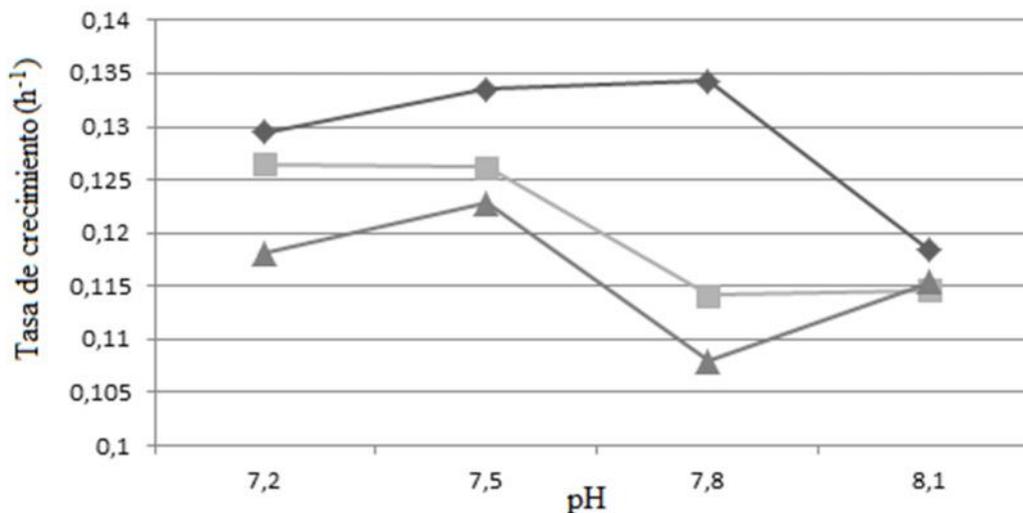


Figura 4. Tasas de crecimiento medias en función del pH. —◆— *Nephroselmis pyriformis* (cepa CGA7), —■— *Pyramimonas orientalis* (cepa CGA 13), —▲— *Pyramimonas propulsa* (cepa CGA16)

*N. pyriformis* muestra un aumento de la media de la tasa de crecimiento a pH 7.8 frente a las presentadas a pH 8.1. Estas tasas se mantienen estables aunque con un ligero descenso en los pH 7.5 y 7.2. *P. orientalis* muestra tasas de crecimiento estables entre los pH 8.1 y 7.8. A pH 7.5 muestra un incremento, manteniendo la estabilidad a pH 7.2. *P. propulsa* muestra un decremento en sus tasas de crecimiento a pH 7.8 frente a pH 8.1. A pH 7.5 muestra crecimiento máximo, para volver a descender a pH 7.2.

### 1. Comparación entre las tasas de crecimiento de una misma cepa a diferentes pH

En *N. pyriformis* y *P. propulsa* se observaron varianzas diferentes, por lo que se analizó mediante la prueba de Welch, mostrando diferencias significativas entre sus tasas de crecimiento a los diferentes pH (p-valor<0.05). En la tabla 3 se muestran los resultados de la prueba post-hoc de Tamhane para *N. pyriformis* y *P. propulsa*. En *N. pyriformis* se observan diferencias significativas entre las tasas de crecimiento a pH 8.1 y a pH 7.5 así como entre las tasas de crecimiento a pH 8.1 y pH 7.2. En la cepa *P. propulsa* únicamente se observan diferencias significativas entre las tasas de crecimiento a pH 8.1 y a pH 7.5.

**Tabla 3.** Pruebas post-hoc comparando las tasas de crecimiento a los diferentes tratamientos de pH. Para *Nephroselmis pyriformis* (cepa CGA7) y *Pyramimonas propulsa* (cepa CGA16) se realizó el test de Tamhane, mientras que *Pyramimonas orientalis* (cepa CGA 13) fue analizada mediante el test de Tukey.

pH		CGA7	CGA13	CGA16
8.1	7.8	0.189	1.000	0.999
	7.5	0.004*	0.002*	0.027*
	7.2	0.033*	0.142	0.439
7.8	7.5	1.000	0.009*	0.555
	7.2	0.964	0.229	0.958
7.5	7.2	0.538	0.359	0.900

\*diferencias significativas entre las tasas de crecimiento a ambos pH

*P. orientalis* no mostró diferencias significativas en las varianzas, por lo que se analizó con la prueba ANOVA para un factor, mostrando diferencias significativas entre las tasas de crecimiento a diferentes pH (p-valor<0.05). En la tabla 3 se puede observar los resultados de la prueba post-hoc de Tukey para las tasas de crecimiento a diferentes pH. *N. pyriformis* muestra diferencias significativas entre las tasas de crecimiento a pH 8.1 y a pH 7.5, así como entre las tasas a pH 7.8 y pH 7.5.

Tabla 4. Comparación de las tasas de crecimiento de varias cepas a un mismo pH. *Nephroselmis pyriformis* (cepa CGA7), *Pyramimonas orientalis* (cepa CGA 13), *Pyramimonas propulsa* (cepa CGA16).

pH	cepas	CGA13	CGA16
7.8	CGA7	0.041*	0.046*
	CGA13		0.963
7.5	CGA7	0.977	0.040*
	CGA13		0.125
7.2	CGA7	0.733	0.023*
	CGA13		0.223

\*Diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las dos cepas a ese pH

## 2. Comparación entre tasas de crecimiento a un mismo pH para diferentes cepas

Al comparar las tasas de crecimiento de las diferentes cepas para un mismo pH con ANOVA no se observaron diferencias significativas a pH 8.1 entre las cepas ( $p$ -valor  $> 0.05$ ). Las tasas de crecimiento a pH 7.8, 7.5 y 7.2 mostraron diferencias en las varianzas, por lo que se analizaron con el test de Welch y posteriormente con la prueba post-hoc de Tamhane; los resultados se muestran en la tabla 4. En esta tabla se observan diferencias significativas en las tasas de crecimiento a pH 7.8 entre *N. pyriformis* y *P. propulsa*, así como entre *N. pyriformis* y *P. orientalis*. También se mostraron diferencias significativas en los tratamientos a pH 7.5 y pH 7.2 entre *N. pyriformis* y *P. propulsa*.

## DISCUSIÓN

### 1. Mantenimiento de un pH estable

A lo largo del procedimiento experimental uno de los puntos más importantes fue el mantenimiento de un pH estable en cada tratamiento. No obstante, en los valores de pH 7.5 y 7.2 se observaron grandes incrementos de pH (tabla 2), consecuencia probablemente de la retirada de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis por las microalgas. En este sentido no se puede tratar los resultados de pH 7.5 y pH 7.2 con la misma fiabilidad que los de 7.8. En la tabla 2 se observa que las variaciones a pH 7.5 no llegan a superar 0.1 unidades de pH ni, por tanto, llegar al pH inmediatamente superior (7.8). Por esta razón, a pesar de no poderse considerar que el cultivo estaba a pH 7.5, sí se puede considerar que estaba a un pH inferior a 7.8 y entre los pH 7.55 y 7.65. A pH 7.2 la variación es

mucho mayor, llegando a valores correspondientes al intervalo de pH 7.5 (tabla 2). Tampoco se puede, por tanto asumir que la muestra estaba a pH 7.2, por lo que se considerará que se encontraba en un intervalo de 7.2 y 7.5. En la interpretación de los resultados de estos tratamientos (pH 7.5 y pH 7.2) se debe tener en cuenta que la gran variación de pH en 24 horas podría ser un factor de estrés que afectase a la tasa de crecimiento.

## **2. Respuesta de cada cepa a los tratamientos de pH**

Actualmente, el océano muestra pH cercanos a 7.5 en las zonas de afloramiento de agua (Doney 2006) por lo que se podría prever que por efecto de la acidificación en el año 2100 existirán zonas más amplias a ese pH. Además, la mayoría de sistemas costeros se hallan en un rango de 7.5-8.5 unidades de pH (Hinga 2002), de manera que al bajar la media del pH también podrían aumentar las zonas costeras a pH 7.5. Los efectos de la acidificación llegarán a su mayor expresión en el año 2300 con un pH oceánico medio de 7.5 (Caldeira & Wickett 2003), consecuencia de esto podría ser un aumento también de las zonas a pH 7.2 en ecosistemas costeros debido a un descenso del su rango de pH; además, también se podría notar este efecto en las zonas de afloramiento de agua, que podrían descender su pH a 7.2 en muchos de sus puntos. Los resultados para las especies estudiadas muestran un aumento de las tasas de crecimiento a pH más bajos que los actuales, pudiendo derivarse importantes implicaciones ecológicas en los escenarios previstos para 2100 y 2300 que merecen ser estudiadas con más profundidad.

*Nephroselmis pyriformis* (cepa CGA7) en la figura 4 muestra un incremento en la media de las tasas de crecimiento no significativa (tabla3) desde pH 8.1 a pH 7.8. Se puede decir por tanto que existe una nula afeción de las tasas de crecimiento por la media de pH prevista en el año 2100. Esto no indica necesariamente que las tasas de crecimiento no se vayan a ver afectadas en 2100, ya que sí existen diferencias significativas en la tasa de crecimiento para los tratamientos a pH 7.2 y 7.5 al compararse con las tasas de crecimiento a pH 8.1. Por esta razón se podría prever un incremento de sus tasas de crecimiento en algunos puntos localizados en el año 2100 y un aumento más generalizado en el año 2300.

*Pyramimonas orientalis* (cepa CGA 13) también podría mostrar tasas de crecimiento mayores en los escenarios previstos para 2100 y 2300 debido a un incremento significativa en sus tasas de crecimiento de pH 8.1 y pH 7.8 a pH 7.5. Un descenso del

pH en 2100 podría aumentar sus tasas de crecimiento en algunas zonas, aunque los mayores efectos se verían en 2300, cuando la media de pH del océano alcanzaría pH 7.5.

*Pyramimonas propulsa* (cepa CGA16) muestra un descenso en la media de sus tasas de crecimiento a pH 7.8 respecto a pH 8.1 (figura 4). No obstante, estas diferencias no han sido significativas. Para esta cepa únicamente se observan diferencias significativas al comparar las tasas de crecimiento en el ensayo a pH 8.1 con el ensayo a pH 7.5, por esta se podría hablar de un aumento significativo de las tasas de crecimiento a pH 7.5. Debido a esto, se podrían prever los mismos efectos que para *Pyramimonas orientalis* en escenarios futuros.

### **3. Respuesta comparada de cada cepa a un mismo tratamiento de pH**

Comparar la respuesta de las diferentes cepas a un mismo pH es importante para conocer la respuesta global de la división Chlorophyta ante la acidificación del medio. En los resultados de este estudio se puede observar que existen diferencias significativas entre algunas de las cepas testadas para un mismo pH. De esta manera, no se puede asumir una única respuesta de la división Chlorophyta a la acidificación de los océanos.

*P. orientalis* (cepa CGA13) y *P. propulsa* (cepa CGA16) muestran un patrón de tasas de crecimiento similar a diferentes pH (figura 4), además en la tabla 4 se puede observar que no hay diferencias significativas entre sus tasas de crecimiento a ningún tratamiento de pH. Estas similitudes podrían indicar una gran relación genética de este género en cuanto a los genes implicados en la respuesta a pH bajos. Sería interesante un estudio más detallado de este género para comprobar si se trata de un patrón común.

*N. pyriformis* (cepa CGA7) muestra diferencias significativas con al menos una de las cepas del género *Pyramimonas* en todos los tratamientos correspondientes a los escenarios previstos para el futuro. Únicamente no hay diferencias significativas en las tasas de crecimiento en el tratamiento control (pH 8.1), correspondiente a la media del pH oceánico actual. Esta es, por tanto, la cepa que estadísticamente tiene mayores tasas de crecimiento a los tratamientos de pH 7.8, 7.5 y 7.2. Esto podría indicar un mayor distanciamiento genético entre Chlorophytas de diferente género en los genes responsables de la respuesta a pH más ácidos. La aparición de diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre estos dos géneros en los escenarios previstos para el

futuro, teniendo en cuenta la ausencia de ellas en el tratamiento control, podría tener implicaciones en los equilibrios ecológicos previstos en escenarios futuros que deben ser estudiadas con mayor profundidad.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados del estudio de estas tres cepas de la división Chlorophyta muestran un aumento de las tasas de crecimiento ante una acidificación del medio. Estos resultados podrían suponer un aumento de las tasas de crecimiento para las especies estudiadas en los escenarios futuros previstos y tener implicaciones ecológicas que deberían ser estudiadas más a fondo. Se ha observado también una gran similitud en la respuesta a la acidificación del medio de cepas del mismo género, y algo más diferenciada al comparar cepas de géneros diferentes. Estos resultados descartan la existencia de una respuesta común de toda la división Chlorophyta a la acidificación de los océanos. Futuros estudios deberían centrarse en la respuesta comparada de géneros de esta división a la acidificación y las consecuencias que pudiere tener en los ecosistemas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer a mis directores de TFG Sergio Seoane y Aitor Laza su apoyo y consejo en la realización de este trabajo. En todo momento mostraron gran interés y no tuvieron reparo en sacrificar el tiempo que hiciese falta para ayudarme. Sin su empeño este TFG no habría sido posible.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Alonso A (2011) Algas verdes en el picoplancton y nanoplancton del estuario del río Nervión (Golfo de Bizkaia) Tesis doctoral 325pp
- Barker HA (1935) The culture and physiology of the marine dinoflagellates. Arch Mikrobiol 6:157–181
- Berge T, Daugbjerg N, Andersen BB, Hansen PJ (2010) Effect of lowered pH on marine phytoplankton growth rates. Mar Ecol Prog Ser 416: 79–91

- Caldeira K, Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425: 365
- Doney SC (2006) The dangers of ocean acidification. *Scientific American* March 58-96
- Feng YY, Hare CE, Leblanc K, Rose JM and others (2009) Effects of increased pCO<sub>2</sub> and temperature on the North Atlantic spring bloom. I. The phytoplankton community and biogeochemical response. *Mar Ecol Prog Ser* 388: 13–25
- Flores-Moya, A; Rouco, M; Garcia-Sanchez, MJ; Garcia-Balboa, C; Gonzalez, R; Costas, E; Lopez-Rodas, V (2012) Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification. *Ecology and Evolution* 2(6):1251–1259
- Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005) CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. 99-131pp
- Granéli E, Haraldsson C (1993) Can increased leaching of trace metals from acidified areas influence phytoplankton growth in coastal waters? *Ambio* 22:308–311
- Hinga KR (1992) Co-occurrence of dinoflagellate blooms and high pH in marine enclosures. *Mar Ecol Prog Ser* 86: 181–187
- Hinga KR (2002) Effects of pH on coastal marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 238: 281–300
- Honisch B, Ridgwell, Schmidt DN, Thomas E, Gibbs SJ, Sluijs A, Zeebe R, Kump L, Martindale RC, Greene SE, Kiessling W, Ries J, Zachos JC, Royer DL, Barker S, Marchitto TM, Moyer R, Pelejero C, Ziveri P, Foster GL, Williams B (2012) The Geological Record of Ocean Acidification. *Science* 335: 1058
- Humphrey GF (1975) The photosynthesis:respiration ratio of some unicellular marine algae. *J Exp Mar Biol Ecol* 18: 111–119
- Hurd CL, Hepburn CD, Currie KI, Raven JA, Hunter KA (2009) Testing the effects of ocean acidification on algal metabolism: considerations for experimental designs. *J Phycol* 45:1236–1251

- Hwang DF, Lu YH (2000) Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon* 38: 1491–1503
- Iglesias-Rodriguez MD, Halloran PR, Rickaby REM, Hall IR, Colmenero-Hidalgo E, Gittins JR Green DRH, Tyrrell T, Gibbs SJ, von Dassow P, Rehm E, Armbrust EV, and Boessenkool KP (2008) Phytoplankton Calcification in a High-CO<sub>2</sub> World, *Science*, 320:336–340
- IPCC, 2001: Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Houghton, J.T., Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C.A. Johnson (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 881pp
- Johnston AM (1996) The effect of environmental variables on <sup>13</sup>C discrimination by two marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 132: 257–263
- Kim JM, Lee K, Shin K, Kang JH, Lee HW, Kim M, Jang PG, Jang MC (2006) The effect of seawater CO<sub>2</sub> concentration on growth of a natural phytoplankton assemblage in a controlled mesocosm experiment. *Limnol Oceanogr* 51: 1629–1636
- Langer G, Nehrke G, Probert I, Ly J, Ziveri P (2009) Strainspecific responses of *Emiliana huxleyi* to changing seawater carbonate chemistry. *Biogeosciences* 6:2637–2646
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Maier-Reimer E, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar RG, Plattner GK, Rodgers KB, Sabine CL, Sarmiento JL, Schlitzer R, Slater RD, Totterdell IJ, Weirig MF, Yamanaka Y, Yool A (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437: 681–686
- Pedersen MF, Hansen PJ (2003) Effects of high pH on a natural marine planktonic community. *Mar Ecol Prog Ser* 260: 19–31
- Raven JA (1980) Nutrient transport in microalgae. *Adv Microbial Physiol* 21:47–226

- Raven JA, Lucas WJ (1985) Energy costs of carbon acquisition. In: Lucas WJ, Berry JA (eds) Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p 305–324
- Ridgwell A, Schmidt DN, Turley C, Brownlee C, Maldonado MT, Tortell P, Young JR (2009) From laboratory manipulations to Earth system models: scaling calcification impacts of ocean acidification. *Biogeosciences* 6:2611–2623
- Shi D, Xu Y, Morel FMM (2009) Effects of the pH/pCO<sub>2</sub> control method on medium chemistry and phytoplankton growth. *Biogeosciences* 6:1199–1207
- Schulz KG, Barcelos e Ramos J, Zeebe RE, Riebesell U (2009) CO<sub>2</sub> perturbation experiments: similarities and differences between dissolved inorganic carbon and total alkalinity manipulations. *Biogeosciences* 6:2145–2153
- Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (2007). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 996 pp.
- The Royal Society. (2005) *Ocean Acidification Due to Increasing Atmospheric Carbon Dioxide*. Policy Document 12/05. The Royal Society, London, 57 pp.
- Tortell PD, DiTullio GR, Sigman DM, Morel FMM (2002) CO<sub>2</sub> effects on taxonomic composition and nutrient utilization in an Equatorial Pacific phytoplankton assemblage. *Mar Ecol Prog Ser* 236:37–43
- Yoo KI (1991) Population dynamics of dinoflagellate community in Masan Bay with a note on the impact of environmental parameters. *Mar Pollut Bull* 23:185–188