

# Efectos individuales e interacción entre $p\text{CO}_2$ y pH en la calcificación del cocolitofórido *Emiliana huxleyi* en distintos escenarios de cambio global: respuestas fisiológicas y variabilidad morfológica de cocolitos y cocoesferas

Víctor Vázquez<sup>1,4\*</sup>, Pablo León<sup>2</sup>, Francisco J. L. Gordillo<sup>1</sup>, Carlos Jiménez<sup>1</sup>, Kevin Mackenzie<sup>3</sup>, Eileen Bresnan<sup>2</sup>, María Segovia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Excelencia Internacional del Mar, España

<sup>2</sup> Marine Planning, Energy & Environment, Marine Scotland Science, Aberdeen, U.K.

<sup>3</sup> Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, U.K.

<sup>4</sup> Department of Research and Development, Cocosphere Environmental Analysis, Málaga, España

\* email: vazquez@uma.es



## INTRODUCCIÓN

Los cocolitofóridos, organismos calcificantes más productivos del planeta, juegan un papel importante en la exportación de materia orgánica y, con ello, en el ciclo global del carbono. Experimentos previos han demostrado que la duplicación de la presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $p\text{CO}_2$ ) en el océano puede reducir significativamente tanto la tasa de calcificación como la disponibilidad de carbono inorgánico.

### Palabras claves:

Acidificación oceánica  
Cocolitofóridos  
*Emiliana huxleyi*  
pH  
Cambio global  
 $\text{CO}_2$   
Calcificación  
Morfometría  
ROS  
Muerte celular  
Viabilidad celular  
( $F_v/F_m$ )

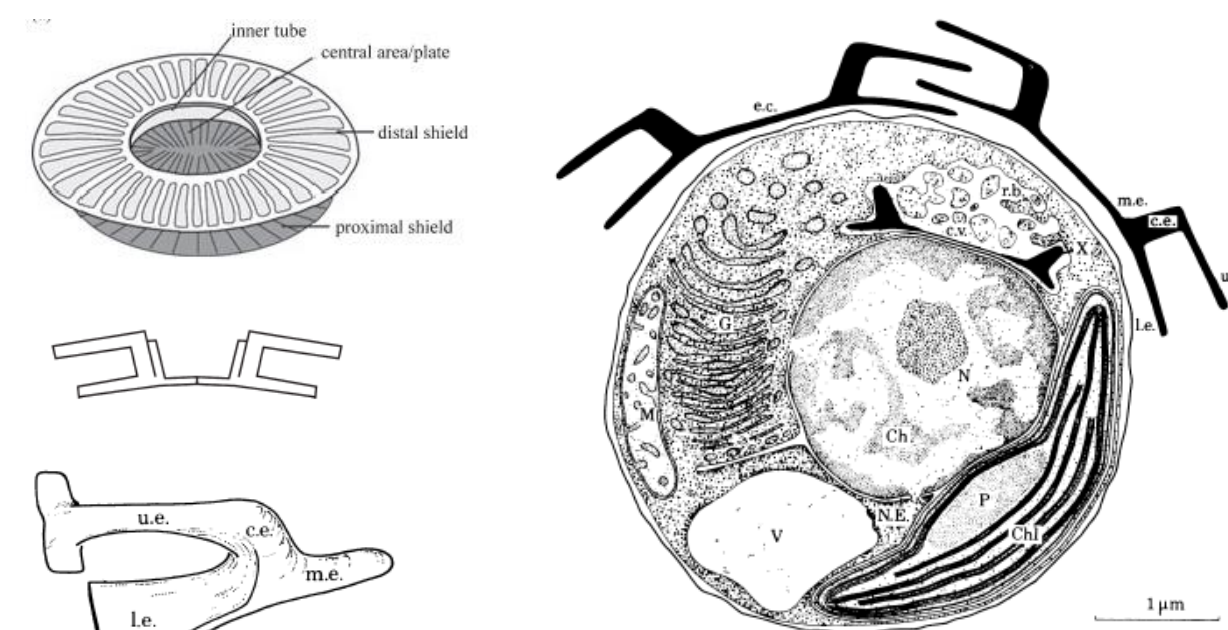
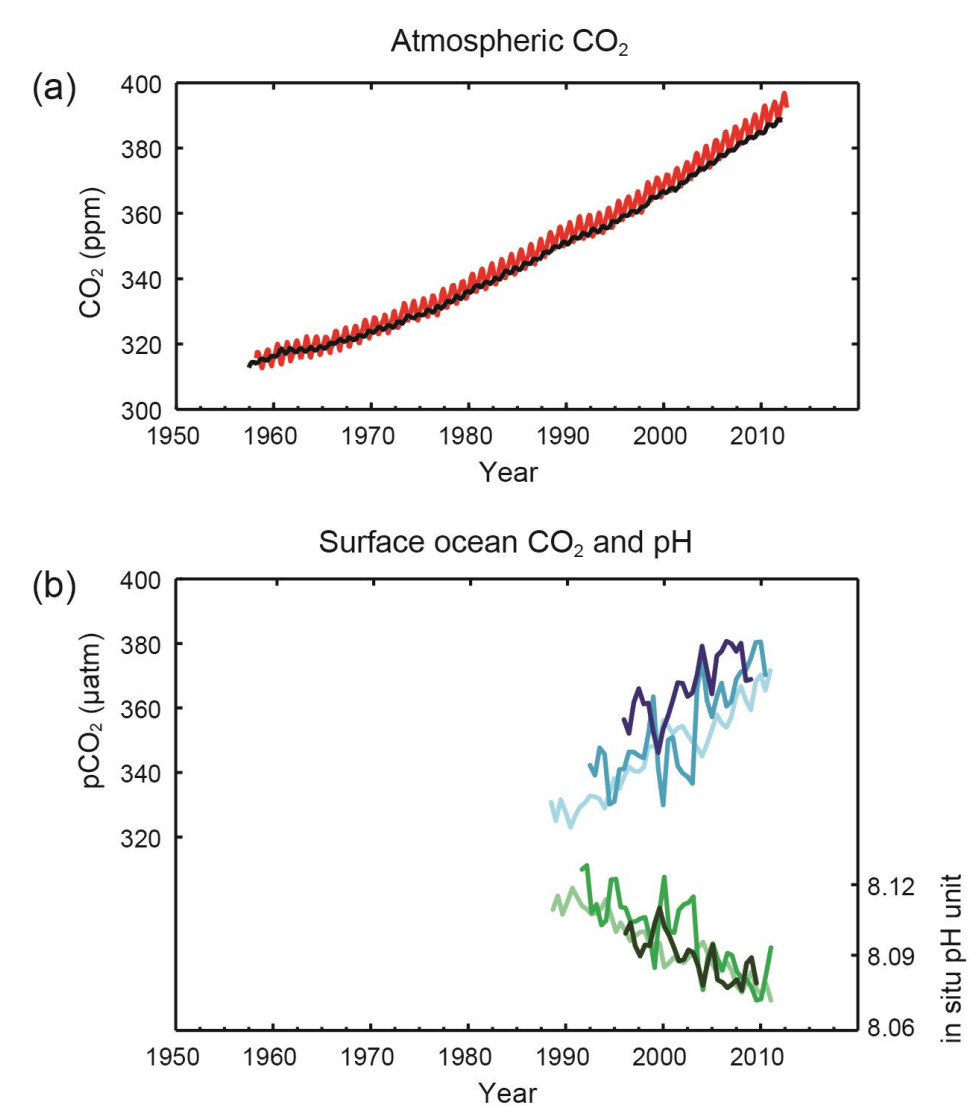


Figura 2. Ultraestructura del alga unicelular *Emiliana huxleyi*. (a) Diagrama esquemático de *E. huxleyi*; (b) Sección transversal de un cocolito Tipo A, (c) Segmento de un cocolito: i.e., elemento inferior aplanado de orientación radial; u.e., elemento superior en forma de martillo; c.e., elemento central, m.e., elemento dirigido medialmente; (d) sección idealizada de *E. huxleyi*.

Figura 1. Múltiples indicadores observadores de un ciclo de carbono global cambiante. (a) concentraciones atmosféricas de  $\text{CO}_2$ ; (b)  $p\text{CO}_2$  disuuelto en la superficie del océano y pH in situ.

El Proyecto de Investigación plantea como objetivo determinar las repercusiones ecofisiológicas del cocolitofórido *Emiliana huxleyi* dentro de distintos escenarios de cambio global, donde se analizan los efectos individuales e interacción entre  $p\text{CO}_2$  y pH en la calcificación, fisiología celular y variabilidad morfológica de cocolitos/cocoesferas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

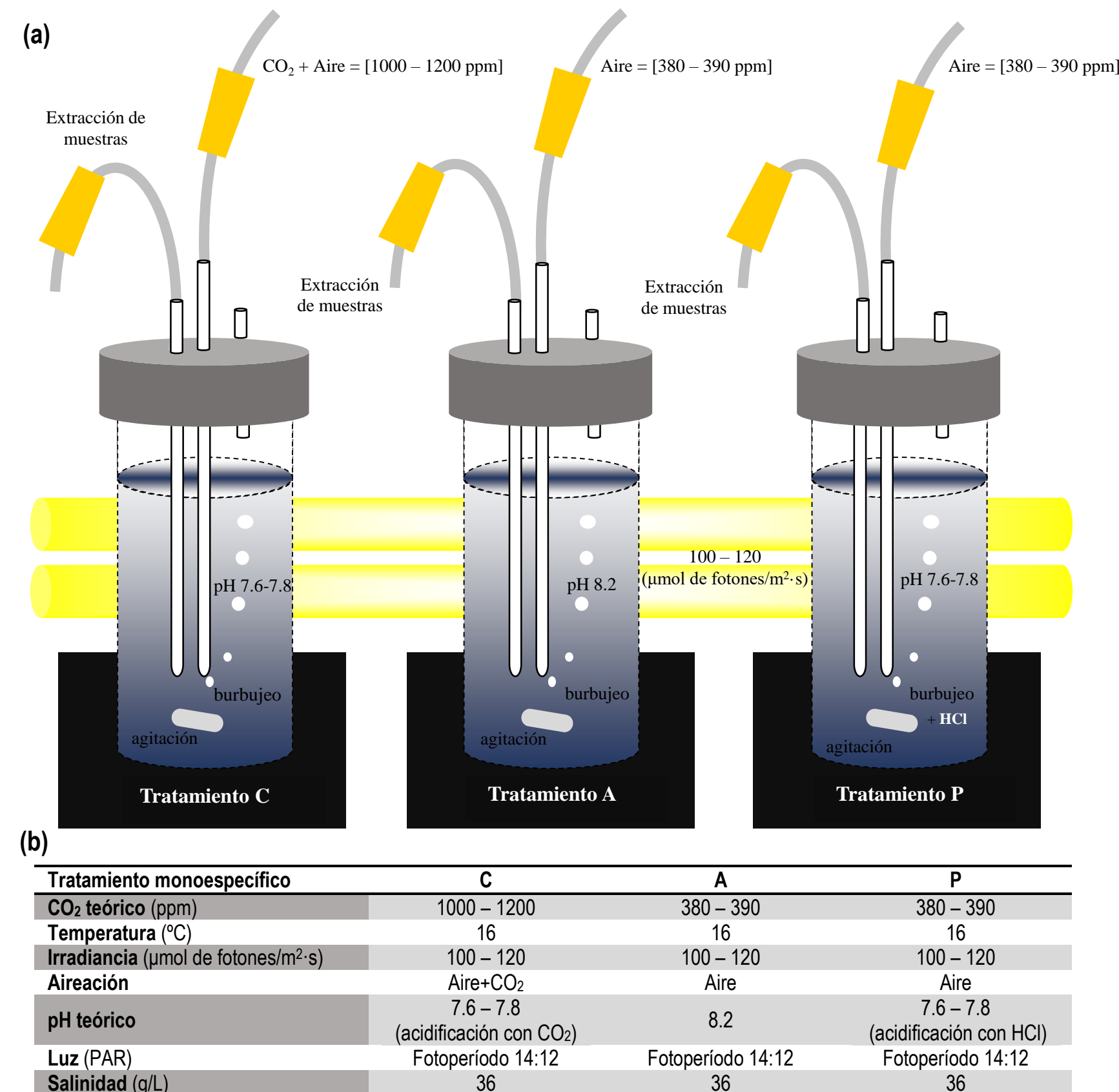
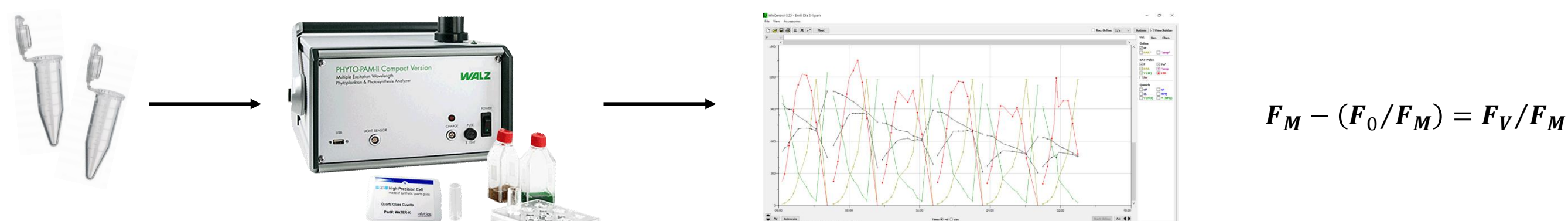


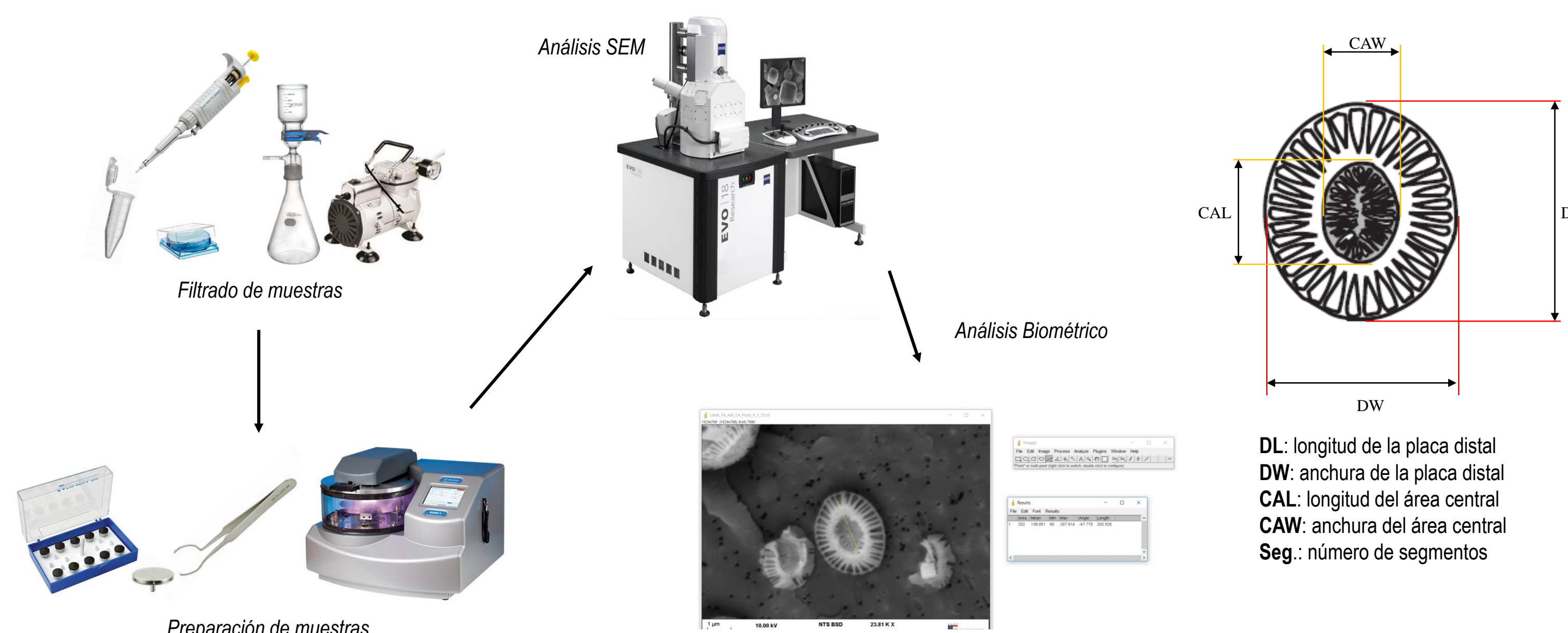
Figura 3. (a) Diseño experimental. Por simplicidad sólo se muestra una réplica por tratamiento (n=3 en los experimentos realizados). Cada tratamiento presenta un sistema de aireación concreto e independiente. Todo el sistema de aireación se deshumidifica pasando a través de un cilindro relleno de gel de sílice con una etapa de carbón activo para eliminar cualquier contaminante orgánico. Los cultivos se burbujan y agitan continuamente para mantener estable la química del carbonato y evitar precipitación de sales. (b) Condiciones experimentales asumidas para cada uno de los tratamientos. (c) Duración del experimento.

Se estudiaron las siguientes variables en cultivos mono-específicos de *E. huxleyi* sometidos a diferentes tratamientos con  $\text{CO}_2$  y pH:

1. Determinación de la **abundancia celular** (densidad celular): citometría de flujo BD Accuri™ C6
2. Estudio de la **viabilidad celular**: diacetato de fluoresceína (FDA)
3. Estudio de la **mortalidad celular**: SYTOX-Green
4. Detección de **especies reactivas de oxígeno** (ROS): Carboxi-H<sub>2</sub>FFDA
5. Medida de la **fluorescencia in vivo de la clorofila a asociada al fotosistema II** ( $F_v/F_m$ ): fluorimetría Water-PAM:



6. Análisis biométrico – morfométrico: microscopía electrónica de barrido (SEM) y Fiji-ImageJ 1.47v:



DL: longitud de la placa distal  
DW: anchura de la placa distal  
CAL: longitud del área central  
CAW: anchura del área central  
Seg.: número de segmentos

## RESULTADOS

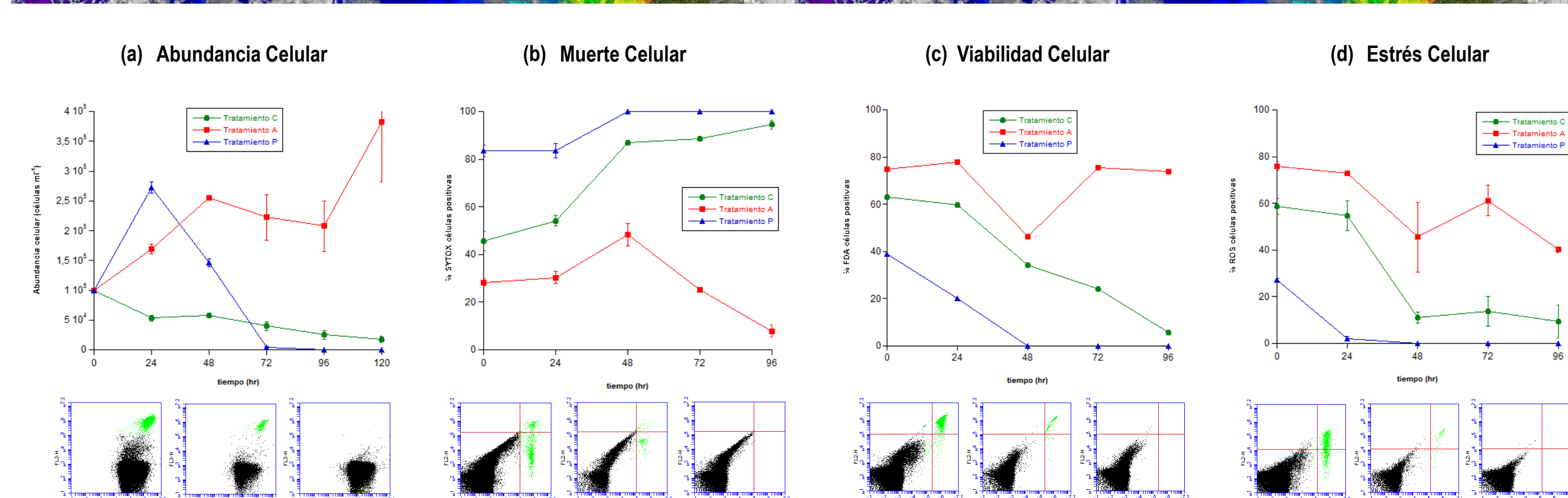


Figura 4. (a) Abundancia celular (células  $\text{ml}^{-1}$ ) promedio de *E. huxleyi*; (b) Porcentaje de células positivas para SYTOX; (c) Viabilidad celular; (d) Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los símbolos son el promedio de 6 réplicas y las barras de error indican la desviación típica estándar. Los citogramas de flujo hacen referencia al muestreo realizado a las 96 horas de experimentación. Los píxeles de color verde corresponden a *E. huxleyi*; y los píxeles de color negro a los cocolitos y restos particulados de dicho organismo.

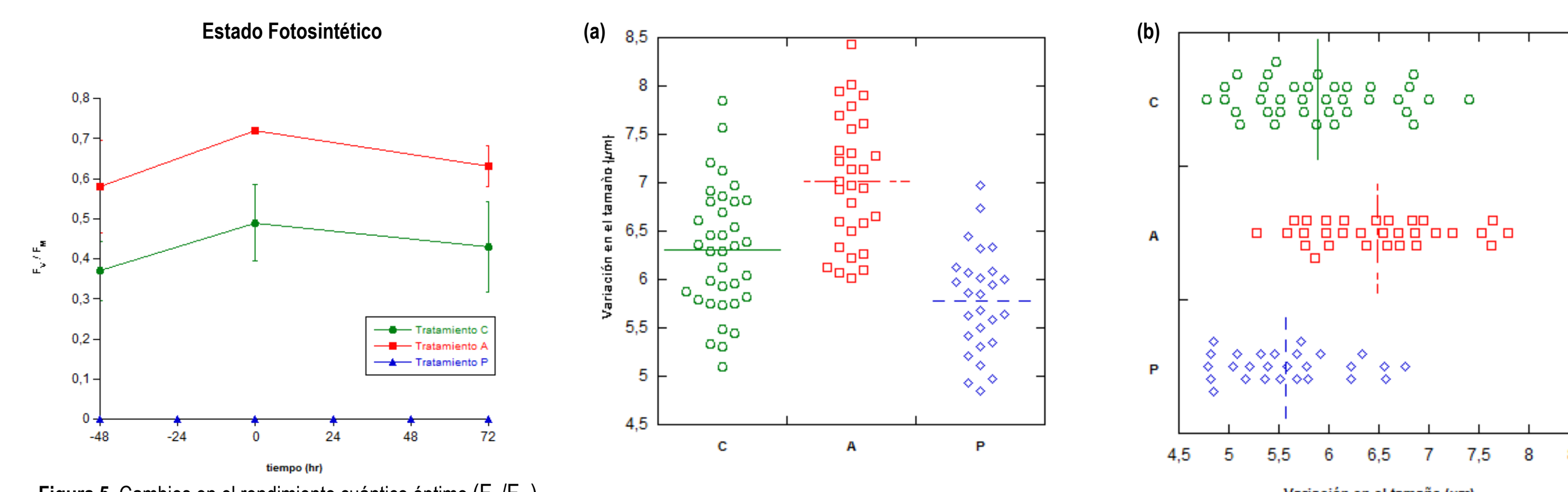


Figura 5. Cambios en el rendimiento cuántico óptimo ( $F_v/F_m$ ).

Figura 6. Variación en el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de las cocoesferas de *E. huxleyi*. (a) diferencia de tamaño en las cocoesferas para la longitud mayor (largo); (b) diferencia de tamaño en las cocoesferas para la longitud menor (ancho).

Cocolitos	Tratamiento C		Tratamiento A		Tratamiento P	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE
DL	3,581	± 0,386	3,715	± 0,284	3,529	± 0,355
DW	3,129	± 0,391	3,244	± 0,259	3,109	± 0,405
CAL	1,464	± 0,162	1,432	± 0,156	1,494	± 0,169
CAW	0,868	± 0,176	0,837	± 0,151	0,938	± 0,162
Seg.	31,56	± 4,49	33,41	± 2,32	28,08	± 2,56
n	29		30		30	
Cocoesferas		Media	SE	Media	SE	
Largo	6,3	± 0,646	7,016	± 0,663	5,774	± 0,541
Ancho	5,885	± 0,661	6,488	± 0,67	5,574	± 0,583
n	36		29		27	

Tabla 1. Variación en el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de las cocoesferas, cocolitos y número de segmentos en los tratamientos C, A y P. DL, longitud de la placa distal; DW, anchura de la placa distal; CAL, longitud del área central; CAW, anchura del área central; Seg., número de segmentos; n, número de cocolitos analizados. Los datos se presentan como media y error estándar de la media (SE) de los resultados.

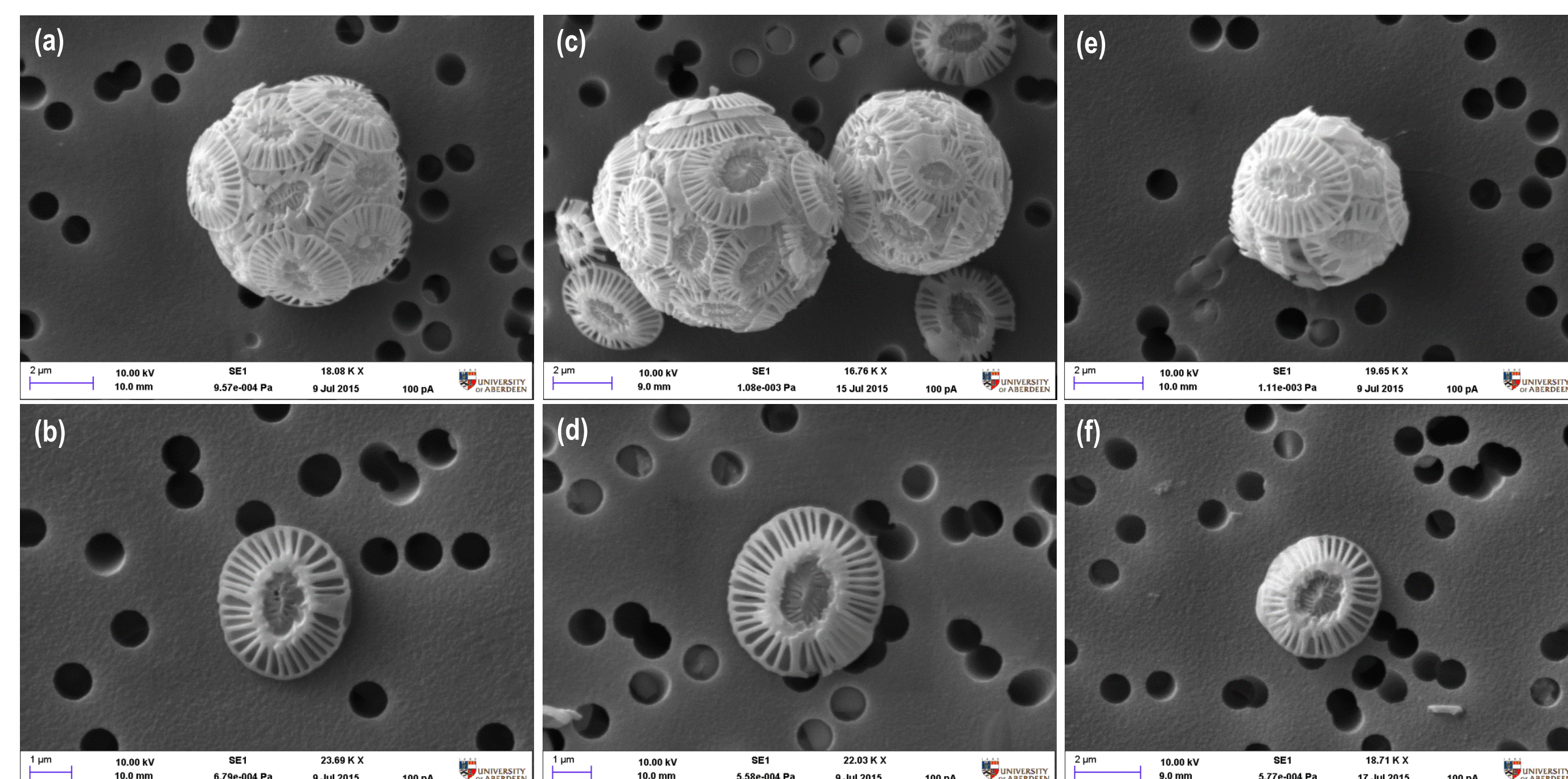


Figura 7. Micrografías del cocolitofórido *Emiliana huxleyi* bajo diferentes concentraciones de  $\text{CO}_2$  y valores de pH NBS (tratamiento C, A y P) obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Figuras (a) y (b) corresponden a 1000-1200 ppm y 7.6-7.8 pH; figuras (c) y (d) corresponden a 380-390 ppm y 8.8 pH; y figuras (e) y (f) corresponden a 380-390 ppm y 7.6-7.8 pH. Las barras de escala están en  $\mu\text{m}$ .

## CONCLUSIONES

- *Emiliana huxleyi* es realmente sensible a los cambios en la  $p\text{CO}_2$  y pH, como reflejan los cambios producidos en la fisiología celular y molecular.
- El análisis morfométrico de cocolitos/cocoesferas puede ser tomado como estimador relativo del grado de calcificación.
- La acidificación causada por HCl produce más daños fisiológicos y relacionados con la calcificación, pero la acidificación por enriquecimiento de  $\text{CO}_2$  también influye negativamente, aunque en menor grado, ante el estrés.
- La calcificación disminuye con el aumento de la  $p\text{CO}_2$  y con la disminución del pH. Un bajo contenido de calcita celular puede esperarse en condiciones de  $p\text{CO}_2$  futuras, que se refleja por el deterioro de la morfología de los cocolitos.
- El tamaño de cocolitos/cocoesferas muestra una tendencia a la reducción de tamaño con el aumento de la  $p\text{CO}_2$  y disminución de pH. Existe variabilidad en el grado de terminación, tamaño, grado de calcificación y malformación.
- La acidificación oceánica puede inducir cambios en la calidad de las partículas biogénicas, que afectan a sus propiedades y la velocidad de precipitación. Igualmente, disminuye la producción de carbonato cálcico en superficie.