

VIABILIDAD DEL ALGA PLANCTONICA « SCENEDESMUS OBLIQUUS »  
EN MEDIO DESFAVORABLE

POR JUAN B. ROSSI \*

RESUMEN

Una cepa de *Scenedesmus obliquus*, cultivada en agar, se desecó, ensayándose a partir de los 12 meses, repiques mensuales que demostraron que el alga conservaba su viabilidad por 24 meses, momento en que se da por finalizada la experiencia. Algas liofilizadas, no sobrevivieron, mientras que algas congeladas a  $-20^{\circ}$  se reproducen al cabo de 90 días de enfiadas. Las algas desecadas lentamente forman gran cantidad de lípidos, mientras que las liofilizadas no pueden hacerlo.

*Scenedesmus obliquus* a igual que otras células, elabora mecanismos protectores, modificando la dirección de la síntesis de hidratos de carbono hacia la de lípidos. Esto requiere un tiempo del que no dispone el alga liofilizada, por lo tanto, muere. El método de enfriamiento rápido, utilizado para las algas que fueron congeladas, no afectó su integridad, seguramente porque no perdieron agua.

La adaptación a una atmósfera de nitrógeno, permite suponer que las algas poseen mecanismos de respiración anaeróbica.

ABSTRACT

The alga *Scenedesmus obliquus* cultivated in agar resists severe droughts and its viability during 24 months of exposure to these conditions is demonstrated in this paper.

However if the loss of water from the medium takes place slowly the result is the formation of great quantities of lipids. Dried algae do not survive during a very active liofilization process.

The algae stock used resists both a temperature of  $-20^{\circ}$  C, and an atmosphere of pure nitrogen. On the other hand it does not survive at temperatures over  $60^{\circ}$  C for more than 15 minutes.

\* Instituto de Limnología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Univ. Nacional de La Plata.

## INTRODUCCION

La sobrevivencia de algas terrestres en suelos desecados es un hecho conocido (Bristol, 1919 y 1920; Evans, 1958 y 1959; Hortobágyi, 1959 y Trainor, 1970). Mientras que Bristol asigna a 2 algas verde-azuladas 70 años de sobrevivencia en suelos desecados y según el mismo autor una Chlorococcácea resume el crecimiento después de 50 años, Trainor presenta una lista de 33 algas halladas en el suelo y después de 10 años consigue que un tercio de ellas crezcan y se multipliquen. Las experiencias de Evans, también sobre algas terrestres, se refieren a casos de algas relativamente recientes y con porcentajes de humedad no muy bajos.

Otros vegetales como algunas Hepáticas, musgos y varias Selagine-las, han sido citadas como resistentes a períodos de sequía. Webster y Steeves (1964) experimental con *Selaginella densa* y demuestran la reviviscencia de esa especie al cabo de 33 meses de marchitez.

Asimismo algas unicelulares como *Chlorella* sp. resisten altas temperaturas (Trainor, 1970).

Es aceptable el concepto de que plantas terrestres posean mecanismos variados y no bien conocidos, que le permiten sobrevivir a amplias variaciones de su habitat; esos mecanismos deben hallarse especializados a un alto nivel, tratándose de plantas acuáticas, que les permiten sobrevivir a las condiciones de sequía total con las que deben enfrentarse periódicamente.

En esta experiencia, se trata de establecer la vitalidad del alga *Scenedesmus obliquus*, de naturaleza plantónica, frente a la carencia casi total de agua, variaciones de temperatura, ambiente gaseoso de nitrógeno y desecación brusca por liofilización.

## MATERIAL Y METODOS

En este trabajo se utilizó una cepa de *Scenedesmus obliquus*, aislada en nuestro laboratorio. Inicialmente se cultivó en medio líquido de Arnon y luego en agar nutriente, con la siguiente composición:

(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	1.000 g	EDTA Fe	0,0307 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	0,250 g	Bacto agar	15 ‰
SO <sub>4</sub> Mg · 7H <sub>2</sub> O	0,512 g	H <sub>2</sub> O c.s.p.	1000 ml
ClK	0,250 g		

En tubos de ensayo de 150 mm x 16 mm, se colocó 5 ml de este medio, esterilizándose en autoclave a 1 atm de presión por 20 minutos, disponiéndose posteriormente el contenido en forma de pico de flauta.

Sobre dicho agar nutriente se sembró un cultivo fresco de algas en estrías, el que se mantuvo a 12 horas de luz bajo un foco incandescente de 100 wats alternando con 12 horas de oscuridad y a una temperatura de  $18^{\circ} \pm 25^{\circ} \text{C}$  permaneciendo durante todas las experiencias en las condiciones de laboratorio indicadas.

Al cabo de 12 meses, el agar estaba seco, reducido a una delgada lámina, muchas veces desprendida de la pared del tubo; las algas presentaban color verde oscuro hacia el fondo del tubo y rojo naranjada hacia el extremo afilado del agar debido a la presencia de carotinoides. Una parte de los tubos se reservó como testigo; a un lote se le reemplazó su atmósfera por nitrógeno puro. Simultáneamente, un cultivo fresco de algas en agar nutriente, bien desarrollado, fue liofilizado por congelación rápida a  $-35^{\circ}$  y desecamiento por 24 horas, luego cerrado herméticamente al vacío.

A partir de ese momento cada mes durante doce meses, se agregó a tres tubos, 0.1 ml de agua estéril y luego de dos horas de imbibición se sembraron las algas rehidratadas en agar fresco, colocándose los tubos en las condiciones de laboratorio ya mencionadas.

Tres lotes de algas fueron sometidos a temperaturas de  $0^{\circ}$ ,  $-5^{\circ}$  y  $-20^{\circ} \text{C}$  bajando la temperatura a razón de  $3^{\circ} \text{C}/\text{minuto}$ ; cada 30 días se efectuó una resiembra, a partir siempre del tubo original, el cual era llevado posteriormente a la temperatura indicada. La experiencia se repitió durante tres meses.

Otra experiencia consistió en colocar lotes de algas frescas a temperaturas de  $\pm 60^{\circ}$  y  $101^{\circ} \text{C}$ , practicándose luego resiembras.

## RESULTADOS

Las algas que procedían de cultivos desecados, reasumían el crecimiento dentro de los 7 primeros días de la siembra, el color verde oscuro y los carotinoides desaparecían, dando lugar a un color verde natural de la especie, señalando la regeneración del cloroplasto. Lo mismo sucedía con las algas desecadas provenientes de tubos con ambiente de nitrógeno, demostrándose así que en las condiciones experimentales mantenidas en un ambiente con  $\pm 1\%$  de agua se conservaron vivas.

Las algas liofilizadas no pudieron sobrevivir al energético tratamiento de congelamiento y rápida pérdida de agua, a pesar de conservar su aspecto normal, con excepción de alguna célula cuyo cloroplasto se hallaba desgarrado.

Los lotes de algas mantenidos a baja temperatura, reanudaban el crecimiento pudiendo observarse a simple vista colonias vigorosas a  $0^{\circ}$  y  $-5^{\circ}$  C mientras que las algas provenientes de cultivos a  $-20^{\circ}$  tardaban unos 15 días en formar colonias. El período de sobrevivencia a  $-20^{\circ}$  C es de 90 días al momento de redactar este trabajo.

Solamente sobrevivió un 50 % de las algas tratadas a  $-20^{\circ}$  C, pues la resiembra se presentaba en forma de colonias que cubrían aproximadamente ese porcentaje de la superficie sembrada.

Un lote de algas expuesto a  $60^{\circ}$  C, por 15 minutos no sobrevivió.

#### DISCUSION

El alga *Scenedesmus obliquus*, sobrevivió a una desecación casi total, de  $\pm 1$  % de agua, por más de 24 meses, cuando dicho proceso se realizó lentamente. Observaciones periódicas, mostraron una reducción en el proceso reproductivo, disminución de la clorofila y aumento de carotinoides: ya en las últimas etapas del proceso de desecación se observó la formación de pequeños glóbulos de grasas, que al completarse el mismo, ocupaban toda la célula, observándose dos glóbulos grandes o 3 a 4 más pequeños. La presencia de grandes cantidades de lípidos en las células desecadas, se demostró por técnicas histoquímicas utilizando como colorante Fat Red 7 B (Chroma-Gesellschaft; Schmid & Co.). Las paredes celulares se hallaban muy engrosadas, y las células en formas aisladas. Al reasumir el crecimiento, se formaron los clásicos cenobios propios de la especie.

Uphof (1920), en un estudio anatómico sobre selaginelas xerofíticas encuentra lípidos formando gotas ovoideas; estos cuerpos no aparecen en especies mesofíticas cuando se las cultiva con abundante provisión de agua. Igualmente Evans (1958 y 1959) señala que algunas algas filamentosas capaces de sobrevivir a una sequía, acumulan lípidos en sus células vegetativas, extraídas del borde del lago, donde la desecación es lenta, pero el fenómeno no se repite cuando toma muestras y las seca rápidamente en el laboratorio.

Las algas liofilizadas no sobrevivieron al tratamiento. El estudio del mecanismo fisiológico de sobrevivencia de algunas algas, a un bajo potencial de agua es un desafío, según una expresión de F. R. Trai-

nor. El comportamiento de las algas desecadas lentamente, juntamente con la progresiva pérdida de agua, modifican su metabolismo, sintetizando lípidos en cantidad tal que ocupan casi toda la célula, mientras que las algas liofilizadas, por la rápida desecación que sufren, no tienen posibilidad de modificar en poco tiempo el sentido de la síntesis de compuestos orgánicos protectores.

La literatura sobre algas liofilizadas es escasa, pero queda claro que muy pocas sobreviven siempre que antes del tratamiento, se le agreguen sustancias coadyuvantes que las proteja (leche sólida, suero de caballo, glutamato de Na, etc.). Holm Hansen (1964) y Luyet y col. (1952) usan glicerol, afirmando que al penetrar éste en la célula, aumenta los valores osmóticos de la misma, elevándose así el nivel de agua protoplasmática que impediría el daño intracelular. La presencia de gran cantidad de lípidos en la célula algal desecada lentamente, sugiere que esos compuestos actuarían como los coadyuvantes en la liofilización, contribuyendo a la retención del agua. Está demostrado que durante el proceso de liofilización solamente se remueve el agua libre, es posible que en la desecación lenta suceda lo mismo, resultando difícil determinar con precisión cuánta agua queda en la célula sometida a bajo potencial de agua, puesto que el método del peso seco es impracticable para determinar agua residual. En vegetales superiores se ha determinado por otros métodos, valores para el agua ligada que va desde un 6 a 20 %.

El agua residual, permitiría reducir a un mínimo el metabolismo compatible con la capacidad vital, al mismo tiempo, protegería a las proteínas celulares de una posibles salificación.

Iljin (1957) por su parte, basándose en que las plantas xerofitas tienen células pequeñas, sostiene que estas células pequeñas sufren menos daño bajo condiciones de desecación.

La resistencia a la sequía, por lo expuesto no tiene una explicación concreta, pero las experiencias llevadas a cabo hasta el presente, permiten asignarle a dicha resistencia un carácter adaptativo, cuyo mecanismo se desencadena cuando la célula pasa a un estado de relativa falta de agua, que puede llegar a ser total. Un proceso así es normal en la naturaleza, proceso por otra parte muy diferente al de la liofilización que deseca bruscamente a las células; esta rápida desecación inducida en el laboratorio no se produce en un ambiente acuático.

La sobrevivencia de cultivos mantenidos en atmósferas de nitrógeno, sugiere la posibilidad de que las algas adapten su metabolismo a las condiciones anaeróbicas con que se enfrentan.

En cuanto a la resistencia al frío, Liebo y Jones (1963) demostraron

que la velocidad del enfriamiento es importante para provocar la resistencia al frío, produciéndose en la célula mayor daño cuanto mayor sea la velocidad de congelación. A iguales conclusiones llega Holm Hansen (1963), por lo que puede admitirse que el daño producido por el frío, estaría relacionado con la concentración de la solución de la célula, cuando ésta se enfría rápidamente se producirían cristales intracelulares, capaces de dañar la integridad celular. No existen al presente pruebas definitivas sobre el modo de acción del frío sobre la célula y de qué mecanismo se vale ésta para resistir al congelamiento.

#### BIBLIOGRAFIA

- AUGIER, H. 1970. *La lyophilisation: son utilisation en Phycologie*. Bull. Mus. Hist. Nat. Marseille, 30, 229-251.
- BRISTOL, B. M., 1919. *On the retention of vitality by algae from old stored soils*. New Phyt. 18, 92-107.
- 1920. *On the algal flora of some desiccated English soils: An important factor in soil biology*. An. Bot. 34, 35-80.
- EVANS, J. H., 1958. *The survival of freshwater algae during dry periods. I An investigations of the algae of five small ponds*. J. Ecol. 46, 149-167.
- 1959. *The survival of freshwater algae during dry periods. II Drying experiments*. J. Ecol. 47, 55-71.
- HOLM HANSEN, O., 1963. *Effect of varying residual moisture content on the viability of lyophilized algae*. Nature G. B. 198 N° 4884, 1014-1015.
- 1964. *Viability of lyophilized algae*. Canad. J. Bot. 47, N° 2, 127-137.
- 1967. *Factors affecting the viability of lyophilized algae*. Cryobiology, 4 N° 1, 17-23.
- HORTOBAGYI, T., 1960. *Das mehrmonatige Leben von Algen eines austrocnenden Teichbettes unter erschwerten Bedingungen (im Laboratorium)* Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 10, 299-330.
- LIEBO, S. P. y R. F. JONES, 1963. *Effects of subzero temperatures on the unicellular red alga Porphyridium cruentum*. J. Cell. Comp. Physiol., 62, 295-302.
- MERYMAN, H. T., 1960. *Freezing and drying of biological materials*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 85, 501-734.
- TRAINOR, F. R. 1962. *Temperature tolerance of algae in dry soil*. Phycol. Soc. Amer. News. Bull., 15, 3-4.
- 1970. *Survival of algae in a desiccated soil*. Phycologia, 9, N° 2, 111-113.
- ÚPHOF, J. G., 1920. *Physiological anatomy of xerophytic Selaginellas*. New Phytol. 19, 101-131.
- WEBSTER, T. R. y T. A. STEEVES., 1964. *Observation on drought resistance in Selaginella densa Rids*. Amer. Fern. Journal 54, N° 4, 189-196.