



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

Respuesta en el crecimiento y la producción pigmentaria a cambios en las condiciones de luz y temperatura en cultivos de microalgas

Autora:

Mónica Miranda de la Maza

Director:

Sergio Seoane Parra

ÍNDICE

ABSTRACT	3
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.1. CULTIVOS	8
2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	9
2.2.1. Fase de aclimatación.....	9
2.2.2. Experimentación.....	9
2.3. MEDIDA DEL CRECIMIENTO	10
2.4. RECUENTO CELULAR	11
2.5. ANÁLISIS PIGMENTARIO.....	11
2.5.1. Filtración y extracción de pigmentos	11
2.5.2. Solventes y método de HPLC.....	11
2.5.3. Análisis de cromatogramas y calibración.....	12
2.6. ESTADÍSTICA	12
3. RESULTADOS	13
3.1. TASAS DE CRECIMIENTO	13
3.2. COMPOSICIÓN PIGMENTARIA	14
3.3. INFLUENCIA DE LUZ Y TEMPERATURA EN LA COMPOSICIÓN PIGMENTARIA	14
4. DISCUSIÓN.....	18
4.1. TASAS DE CRECIMIENTO	18
4.2. COMPOSICIÓN PIGMENTARIA	19
5. CONCLUSIONES	22
6. BIBLIOGRAFÍA	22

ABSTRACT

Phytoplankton is a big challenge for both, market and bioscience, due to the diversity of molecules that are capable to produce in short periods of time. These microorganisms inhabit aquatic environments that are characterized by variable conditions of light and temperature; so, their growth rates and pigment productions adapt to cope with the environment fluctuations. On the one hand, photoacclimation response aims to balance the light-harvesting and the photoprotective capacities in order to maximize cellular activities such as photosynthesis, among others. On the other hand, adaptations to temperature are related to cellular metabolism and variations in this variable can cause photo-oxidative stress.

In this study, the growth rates and pigment productions of microalgae exposed to three types of LED lights and two temperatures were analysed. To do this, two haptophytes and one cryptophyte were cultured, and subsequently, HPLC analyses were performed to determine the presence as well as the amount of extracted pigments from the algae harvested at the end of the exponential phase. The most predominant pigments within chlorophylls and carotenoids were selected and comparisons were made between temperatures, lights and species. Growth rates were also compared. It was found that both growth and pigment production were higher at the highest temperature and in red light, generally. Therefore, there is variation in growth rates and pigment production as a function of light and temperature.

RESUMEN

El fitoplancton resulta de gran interés, tanto a nivel de uso industrial como en estudios básicos, debido a la diversidad de moléculas que son capaces de producir en cortos periodos de tiempo. Estos microorganismos habitan en medios acuáticos que se caracterizan por presentar condiciones de luz y temperatura variables; por lo que sus crecimientos y producciones pigmentarias se adaptan para hacer frente a las fluctuaciones del ambiente. Por un lado, la fotoaclimatación tiene como objetivo equilibrar las capacidades de captación de luz y fotoprotectoras para maximizar las actividades celulares como la fotosíntesis, entre otras. Por otro lado, las adaptaciones a la temperatura están relacionadas con el metabolismo celular y las variaciones de esta variable pueden ocasionar estrés foto-oxidativo.

En este trabajo, se analizaron las tasas de crecimiento y producciones pigmentarias de microalgas expuestas a tres tipos de luces LED y dos temperaturas. Para ello, se cultivaron dos haptofitas y una criptofita, y se llevó a cabo un análisis mediante HPLC de todos los pigmentos. Se seleccionaron los mayoritarios dentro de las clorofilas y los carotenoides y se realizaron comparaciones entre temperaturas, luces y especies. También se compararon las tasas de crecimiento. Se comprobó que tanto el crecimiento como la producción pigmentaria eran mayores en la temperatura más alta y en luz roja, generalmente. Por tanto, existe variación de las tasas de crecimiento y las producciones pigmentarias en función de la luz y la temperatura.

1. INTRODUCCIÓN

El fitoplancton está constituido por pequeños microorganismos fotosintéticos que habitan en el medio acuático y que contribuyen, significativamente, a la producción primaria mundial. Algunos de estos microorganismos acuáticos son rápidos productores de biomasa, lo que los convierte en candidatos para la producción de moléculas de interés a bajo costo y con poco gasto de energía (Abida *et al.*, 2013). De hecho, existen numerosas aplicaciones para dichas moléculas en la alimentación humana y animal, la salud y la cosmética, entre otros. Otras de sus propiedades están relacionadas con el cuidado del medio ambiente, como la producción de energías renovables (Muller-Feuga, 2000). La búsqueda de soluciones para problemas de salud, nutrición, energía y contaminación conlleva al desarrollo de la bioprospección, con el objetivo de aprovechar moléculas, enzimas y genes útiles que se encuentran en microorganismos del medio acuático (Abida *et al.*, 2013).

El fitoplancton vive en ambientes diversos con luz y temperatura altamente variables. El fitoplancton puede estar sujeto a cambios tanto en la densidad de flujo de fotones (PFD) como en la calidad espectral de la luz impuesta por la física natural del océano (Anderson *et al.*, 1995). Por un lado, la penetración de la luz a través de la columna de agua es un factor que aporta variabilidad. De hecho, la luz disminuye exponencialmente a lo largo de la columna de agua. Asimismo, las diferentes luces desaparecen de manera distinta en función de la longitud de onda, por ejemplo, las radiaciones rojas se extinguen antes en comparación con las longitudes de onda azules y verdes, que penetran más profundamente en la columna de agua (Brunet *et al.*, 2014).

Por otro lado, la aclimatación a los niveles fluctuantes de PFD puede ser de dos tipos en función del tiempo de duración del cambio: a corto plazo (segundos y minutos) causados

por cambios en la nubosidad o en el movimiento vertical de la columna de agua, y a largo plazo (horas y días) asociados con la luz como ciclos oscuros, movimiento de masas de agua o procesos de mezcla y estratificación (Harris *et al.*, 2005). En este último caso, las microalgas responden con un ajuste en la composición y función del aparato fotosintético, es decir, una síntesis y degradación selectiva de pigmentos, proteínas de transferencia de electrones y enzimas del ciclo de Calvin (Anderson *et al.*, 1995). Esto se conoce como fotoaclimatación, que consiste en un ajuste de los procesos fisiológicos para tratar una variación de un parámetro de condición ambiental (Brunet *et al.*, 2011). No obstante, resulta importante distinguirla de la adaptación, la cual es el resultado de una evolución a largo plazo que está relacionada con los genes y, por lo tanto, con la denominada adaptación genética (Raven & Geider, 2003).

La fotoaclimatación tiene como objetivo equilibrar las capacidades de captación de luz y fotoprotectoras para maximizar las actividades celulares como la fotosíntesis, que es la función principal afectada por el régimen de luz, la respiración, el crecimiento y la división. Por tanto, el patrón pigmentario varía para hacer frente a las condiciones ambientales y sus limitaciones al aumentar la capacidad competitiva de una especie en un hábitat determinado a través de su crecimiento y supervivencia (Raven & Geider, 2003).

Para hacer frente a estas fluctuaciones del régimen de luz, el fitoplancton presenta una gran diversidad de pigmentos que pueden ser clasificados en dos tipos: pigmentos fotosintéticamente activos empleados para la captación de la luz y su posterior transferencia a los centros de reacción de los fotosistemas I y II, y pigmentos fotoprotectores (Brunet *et al.*, 2011).

Por lo general, la clorofila *a* (*chl a*) no es un pigmento importante en la captación de luz, siendo su función principal recibir la energía luminosa de los pigmentos donantes en el complejo de captación de luz. Cuando esta molécula absorbe la luz, entra en un estado de excitación ($^1\text{chl } a^*$), a partir del cual la energía puede ser disipada de tres maneras distintas. El uso principal se basa en transferir la energía al centro de reacción, a través de la separación de cargas, para desencadenar las reacciones fotoquímicas. En segundo lugar, puede haber algunas fugas a través de la fluorescencia de la clorofila y el calor, y, por último, la transformación de $^1\text{chl } a^*$ en $^3\text{chl } a^*$ debido al exceso de energía luminosa absorbida, pero $^3\text{chl } a^*$ puede reaccionar con el oxígeno (O_2) dentro del centro de reacción del fotosistema II y producir especies de oxígeno reactivo (ROS). Por lo tanto, si la concentración de $^1\text{chl } a^*$ aumenta debido a la alta intensidad de luz, la probabilidad de

formar $^3\text{chl a}^*$ también aumenta, así como la probabilidad de producir ROS (Falkowski & LaRoche, 1991).

Estas especies reactivas son muy dañinas para las proteínas, pigmentos y lípidos, y conducen a una disminución en la tasa fotosintética. En consecuencia, los microorganismos presentan una serie de mecanismos fotoprotectores para disminuir la formación de ROS. Según Brunet *et al.* (2011) la extinción de fluorescencia no fotoquímica (NPQ) es el proceso fotoprotector más importante, junto con el ciclo de las xantofilas (XC). Por tanto, NPQ puede deberse a procesos asociados con la interconversión de los pigmentos del ciclo de las xantofilas en las antenas del PSII, con la acidificación del lumen del tilacoide o con procesos que afectan el estado funcional del centro de reacción del PSII (MacIntyre *et al.*, 2002).

El ciclo de las xantofilas implica la desepoxidación/epoxidación enzimática de las xantofilas acetilénicas, sintetizadas a partir de β -caroteno, en función de la luz absorbida (Lohr & Wilhelm, 2001). Existen dos grupos de organismos en función de los pigmentos involucrados en el XC. Un primer grupo incluye como principal ruta la desepoxidación en dos etapas de la violaxantina (Vx) en zeaxantina (Zx) a través de la anteraxantina (Ax). Un segundo grupo incluye la desepoxidación en un solo paso de diadinoxantina (Dd) en diatoxantina (Dt) (Brunet *et al.*, 2011).

Este segundo ciclo es llevado a cabo por microalgas del filo Haptophyta, entre otras. Estas son capaces de sintetizar diadinoxantina y diatoxantina, que son, respectivamente, pigmentos captadores de luz y disipadores de calor. Sin embargo, también tienen la capacidad de formar las xantofilas del ciclo de la violaxantina, aunque estos solo pueden ser visibles cuando las microalgas están expuestas a largos periodos de luz intensa (Lohr & Wilhelm, 2001). Esto es debido a que los pigmentos del ciclo Vx representan pigmentos precursores obligatorios para la formación de los pigmentos del ciclo Dd/Dt y de la fucoxantina (Goss & Jakob, 2010). De este modo, el ciclo Dd representa el mecanismo de fotoprotección más importante de las Haptophytas y conduce a una disipación eficiente de la energía de excitación absorbida en exceso en forma de calor, que se hace visible como una fuerte NPQ (Lavaud *et al.*, 2002).

Sin embargo, algunos filos como Cryptophyta no llevan a cabo ninguno de los dos tipos de ciclo de las xantofilas. En este caso, son otras xantofilas las responsables de llevar a cabo los mecanismos fotoprotectores como la aloxantina en *Rhodomonas baltica* (Laviale

& Neveux, 2011). Pero, este mecanismo no parece ser una regla general para todas las criptofitas (Henriksen *et al.*, 2002).

Otro de los parámetros que muestra gran variabilidad en el medio acuático es la temperatura. En principio, esta no tendría que tener un efecto tan grande como la luz sobre la producción pigmentaria, dado que la fotoquímica es independiente de la temperatura. No obstante, van Leeuwe *et al.* (2014) ha demostrado la influencia de la temperatura en el crecimiento celular y la producción pigmentaria. Además, el estrés foto-oxidativo se experimenta a bajas temperaturas, cuando se obstaculiza el transporte de electrones y el metabolismo celular provocando un exceso de energía. Por otro lado, las altas temperaturas pueden alterar el metabolismo celular por cambios en las estructuras celulares, desnaturalización de proteínas e inactivación de enzimas (Davison, 1991).

El objetivo de este estudio es analizar la influencia de la variación de la temperatura y la luz sobre la producción pigmentaria en diferentes cultivos de microalgas. Para ello, se emplean cultivos de las divisiones Haptophyta y Cryptophyta y se exponen a diferentes temperaturas y luces. De acuerdo con un análisis filogenético sobre el ADN 18s ribosomal realizado por Edvardsen *et al.* (2011), Haptophyta se divide en dos clases: Pavlovophyceae, que está representada en este estudio por *Pavlova gyrams* (*P. gyrams*), y Prymnesiophyceae o Coccolithophyceae, representada en este estudio por *Isochrysis galbana*. Esta división se caracteriza por tener ocho tipos pigmentarios, de los cuales dos caracterizan a Pavlovophyceae (HAPTO-1 y -2) y seis a Prymnesiophyceae (HAPTO-3 a -8) (Zapata *et al.*, 2004). Las haptofitas empleadas en este estudio, *P. gyrams* e *Isochrysis galbana* (*I. galbana*), se caracterizan por ser HAPTO-2 y HAPTO-3, respectivamente (Zapata *et al.*, 2004).

Estas dos divisiones de microalgas son interesantes ya que presentan una gran variedad de pigmentos, comunes y distintos, con propiedades de captación de luz o fotoprotectoras, que cambian para hacer frente a las restricciones ambientales como la disponibilidad de luz o las alteraciones de la temperatura. Por tanto, se parte de la hipótesis de que existe una variación en la presencia y proporción de pigmentos, así como en las tasas de crecimiento, de cultivos de microalgas expuestos a diferentes temperaturas y luces.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivos

Las especies escogidas para llevar a cabo este estudio fueron *Isochrysis galbana* (BMCC1), *Pavlova gyrans* (BMCC10) y *Rhodomonas* sp. (BMCC65) siendo las dos primeras haptofitas y la tercera criptofita. Estos cultivos stock pertenecen a la colección de microalgas del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad del País Vasco /Euskal Herriko Unibertsitatea.

Se cultivaron en medio de cultivo f/2 (Guillard & Ryther, 1962) y el mantenimiento de los cultivos fue en cámaras de cultivo en las que se puede regular la temperatura y cambiar el tipo de luz con la colocación de distintos filtros. Se utilizaron dos cámaras de cultivo con la luz en vertical para que incidiera de la misma manera en los distintos tubos del experimento. Los espectros de las luces utilizadas fueron los siguientes (Figura 1):

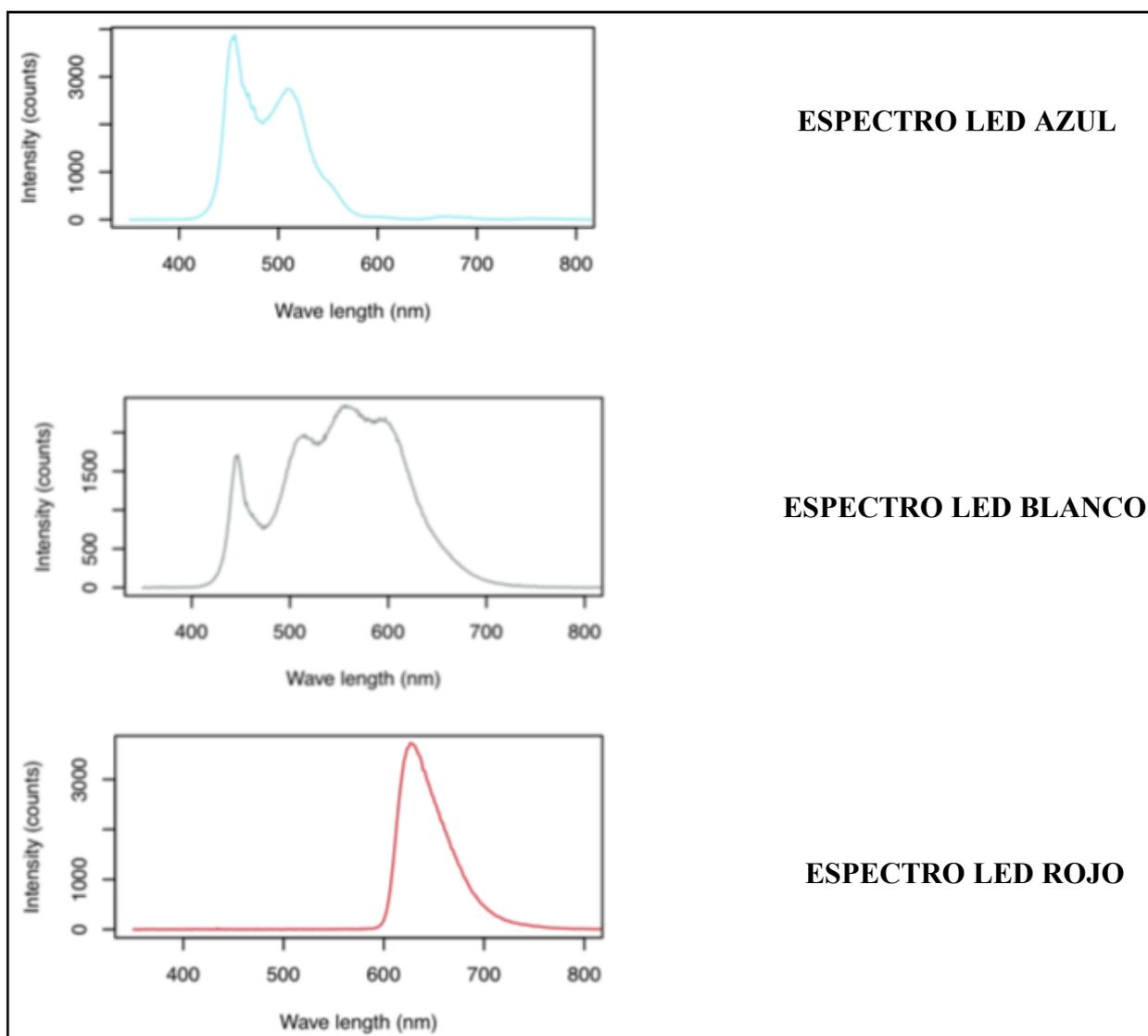


Figura 1. Espectros de luz de las cámaras de cultivo

2.2. Diseño experimental

Las tres especies fueron sometidas a dos temperaturas (15°C y 30°C) y tres luces LED (blanca, roja y azul), combinando cada temperatura con cada luz. La intensidad de luz a la que fueron expuestos en todos los casos fue de, aproximadamente, $100 \mu\text{mol de fotones}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ determinado con ayuda de un luxómetro (Ocean Optics, Red Tide USB 650), en un régimen de exposición de luz:oscuridad de 14:10 horas.

Durante la primera fase, la fotoaclimatación, solo se exponía un tubo de cada especie a cada condición. Después, en la etapa experimental, a partir del tubo de la aclimatación, se inoculaban tres tubos de cada especie con la misma cantidad de células y se exponían a las mismas condiciones que en la fase anterior (Figura 2). Fue en esta última etapa en la cual se recogieron los datos experimentales.

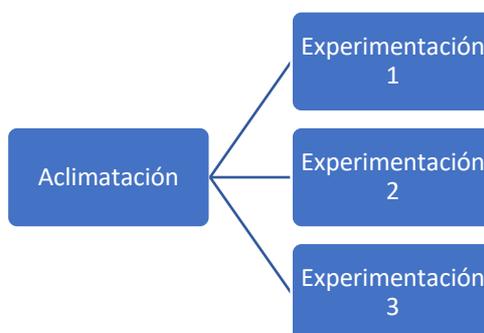


Figura 2. Diseño experimental para cada especie expuesta a cada luz y temperatura.

2.2.1. *Fase de aclimatación*

Se prepararon 3 tubos de ensayo de vidrio de 15 ml, uno para cada especie, y se añadieron 9,85 ml de medio de cultivo y 150 μl del cultivo stock. La fluorescencia de cada especie se midió a diario a la misma hora (11:30), con el objetivo de elaborar una curva de crecimiento para cada una. Cuando el cultivo estaba en la fase final exponencial o en la inicial estacionaria, se cogía 1 ml de cultivo y se fijaba con 5 μl de lugol para calcular la densidad de cada especie ($\text{células} \cdot \text{ml}^{-1}$). Asimismo, se estimaba el volumen necesario que había que cultivar en los otros tres tubos de la etapa de experimentación para tener en cada uno una densidad inicial de $10^4 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$.

2.2.2. *Experimentación*

Tras añadir en las tres réplicas el volumen preciso del tubo de aclimatación y 10 ml del medio de cultivo, se volvieron a meter en las cámaras de cultivo en las mismas

condiciones que en la fase de aclimatación. En esta etapa, la fluorescencia también se midió a diario a la misma hora (11:30), y cuando la curva de crecimiento mostraba que el cultivo estaba entrando en la fase exponencial tardía, se recogían las microalgas para hacer el análisis pigmentario.

2.3. Medida del crecimiento

Para determinar el crecimiento de los cultivos, tanto en la fase de aclimatación como en la experimentación, se usó un fluorímetro (Turner Designs 10-100R). Antes de meter los tubos en el fluorímetro, se homogenizaban y se limpiaba su superficie para evitar cualquier interferencia en la medida.

A partir del logaritmo neperiano de los valores de la fluorescencia obtenidos a lo largo de los experimentos, se elaboraron las curvas de crecimiento de las diferentes especies en las distintas condiciones, así como el cálculo de la tasa de crecimiento, μ . Asimismo, se utilizaban las curvas de crecimiento de las microalgas para determinar la fase de crecimiento en la que se encontraba la población. Cuando la línea de crecimiento comenzaba a asintotizarse, las microalgas se encontraban en la fase exponencial tardía (Figura 3).

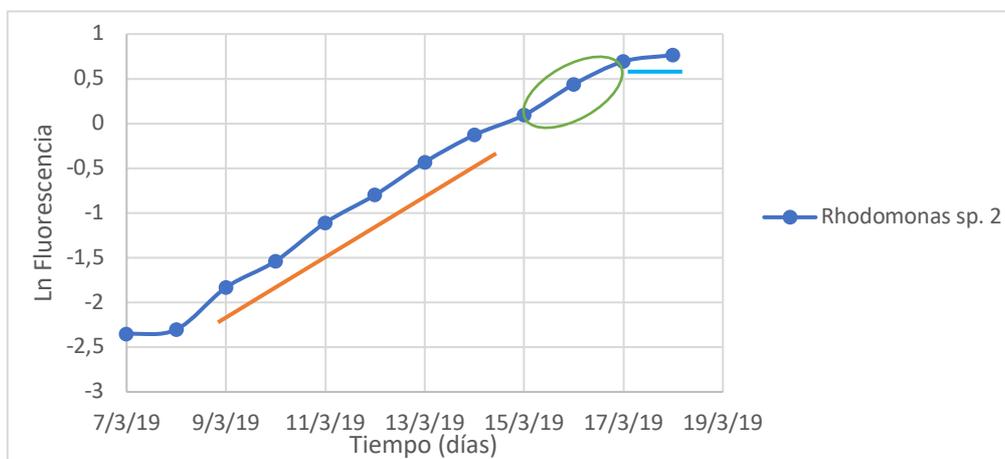


Figura 3. Curva de crecimiento de *Rhodomonas* sp. 2 en la fase de experimentación expuesta a luz blanca y 15°C. Línea naranja: fase exponencial; círculo verde: fase exponencial tardía; línea azul: fase estacionaria.

Para calcular las tasas de crecimiento, se utilizó la fase exponencial de las curvas de crecimiento, que estaba representada por la fase lineal del gráfico, empleando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\text{Ln} (N_t/N_0)}{\Delta t}$$

siendo N_0 la población al inicio de la fase exponencial, N_t la población al final de la fase exponencial e Δt la diferencia entre el tiempo final e inicial de dicha fase.

2.4. Recuento celular

El recuento celular se realizó en el momento de paso de la fase de aclimatación a la experimentación.

El procedimiento realizado fue el siguiente: al finalizar la fase estacionaria, se vertió en un tubo Eppendorf 1 ml del cultivo y se mezcló con 5 μl de lugol para fijar las células. Estos tubos permanecieron en la nevera hasta su uso. Para llevar a cabo el recuento, se añadieron 100 μl del cultivo fijado en una cámara de Neubauer cubierta con un portaobjetos y se observó al microscopio óptico.

2.5. Análisis pigmentario

2.5.1. Filtración y extracción de pigmentos

Tras finalizar la experimentación, se llevó a cabo la filtración de 8 ml del cultivo con ayuda de una bomba de vacío y empleando filtros de microfibras de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro. Tras la filtración, los filtros obtenidos de los diferentes experimentos se almacenaron en un congelador a -80°C , hasta su análisis.

Los filtros se extrajeron añadiendo 2 ml de acetona al 90% a un tubo donde se depositaba el filtro y donde se machacaba con una varilla de vidrio. A continuación, el resultante fue filtrado para conseguir un extracto libre de impurezas por medio de un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,2 μm . Era importante que todo el contenido del tubo de extracción pasase a través de la jeringuilla para asegurar que se recolectaban todos los pigmentos presentes en el filtro. El análisis se realizaba inmediatamente después a la extracción.

Ambos procesos, la filtración y la extracción, se desarrollaron en absoluta oscuridad porque los pigmentos son altamente fotosensibles.

2.5.2. Solventes y método de HPLC

El método empleado para el análisis de todos los cultivos fue el propuesto por Zapata *et al.* (2000). El equipo cromatográfico empleado estaba compuesto por un inyector automático (Waters 717 plus Autosampler) para inyectar una mezcla de extracto de

pigmentos y agua en una proporción 5:2 y mejorar así los picos de los cromatogramas, un fotodiodo (Waters 2996 Photodiode Array Detector) y un fluorímetro (Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector) para la detección, un calentador HPLC asociado (Waters 1525 Binary HPLC Pump) y un degasificador (Waters In-Line Degasser AF). Todo esto estaba conectado a un ordenador con el software Millenium 32 (2002, Waters Corporation).

La fase estacionaria estaba compuesta por una columna Waters Symmetry C₈ (150 x 4,6 mm, 3,5 μ m de tamaño de partícula, 100 Å de tamaño de poro). La fase móvil estaba constituida por dos disolventes: A (metanol: acetonitrilo: 0,025 M piridina acuosa 50:25:25) y B (metanol: acetonitrilo: acetona 20:60:20). Cada disolvente fue filtrado con ayuda de un filtro de Sartorius (filtro de poliamida sartolon) con un tamaño de poro de 0,2 μ m, para verterlo, posteriormente, en sus correspondientes botellas de almacenamiento conectadas con el HPLC.

2.5.3. Análisis de cromatogramas y calibración

Todos los pigmentos fueron identificados por sus tiempos de retención y espectros de absorbancia. Los tiempos de retención se compararon con los de los estándares obtenidos comercialmente de DHI (Hoersholm, Dinamarca) y los reportados en Jeffrey (1997) y Zapata *et al.* (2000). La calibración del HPLC se realizó utilizando clorofilas (*a*, *b* y *c*₂) y carotenoides (fucoxantina, luteína, violaxantina, zeaxantina, peridina y aloxantina) obtenidos, también, comercialmente de DHI. Además, los coeficientes de extinción molar obtenidos de Jeffrey (1997) se utilizaron para la cuantificación de pigmentos no calibrados con estándares comerciales.

2.6. Estadística

En primer lugar, se estudió la normalidad de los datos obtenidos comparando las proporciones de pigmentos de las tres réplicas de cada especie expuestas a cada temperatura y luz. A continuación, se realizó un análisis de la varianza de dos vías y se compararon los diferentes grupos de luz y temperatura en cada especie con ayuda de la prueba de Tukey, asumiendo una significación de 0,01. A pesar de que se analizaron todos los pigmentos encontrados en las tres especies, solo se compararon los pigmentos mayoritarios de cada especie, ya que si se desea llevar a cabo una producción pigmentaria, los pigmentos de interés serán aquellos que se generen con mayor facilidad; a no ser que haya interés especial en algún pigmento minoritario.

Asimismo, se analizaron las diferencias entre las tasas de crecimiento en función de las especies, la temperatura y la luz, con una significación de 0,01. El programa empleado fue PAST (versión 3.24).

3. RESULTADOS

3.1. Tasas de crecimiento

Las tasas de crecimiento oscilaron entre 0,36 y 1,18 d⁻¹ para *I. galbana*, entre 0,16 y 1,08 d⁻¹ en *P. gyrans* y entre 0,13 y 0,59 d⁻¹ en *Rhodomonas* sp. Se observó que existían diferencias significativas ($p < 0,01$) entre todas las condiciones dentro de la misma especie. Por tanto, se comprobó que las tasas de crecimiento de las tres especies estuvieron significativamente influenciadas tanto por la luz como por la temperatura.

Analizando cada especie por separado, se comprobó que las tasas de crecimiento de *I. galbana* fueron mayores a 30°C que a 15°C y estas fueron significativamente más bajas en luz roja que en las otras dos luces. El único caso en el que no se observó una diferencia significativa entre las tasas de crecimiento fue cuando *I. galbana* estaba expuesta a luz blanca y azul a 30°C y a 15°C.

En el caso de *P. gyrans*, se observaron diferencias significativas entre todas las tasas de crecimiento, pero no mostraron un patrón claro. Conforme aumentaba la temperatura, aumentaron las tasas de crecimiento en luz roja y blanca, pero disminuyeron en la azul. Y, en cuanto a *Rhodomonas* sp., esta no creció en luz azul a 30°C. Se observó un aumento de las tasas de crecimiento a 30°C respecto a 15°C para las luces blanca y roja (Figura 4).

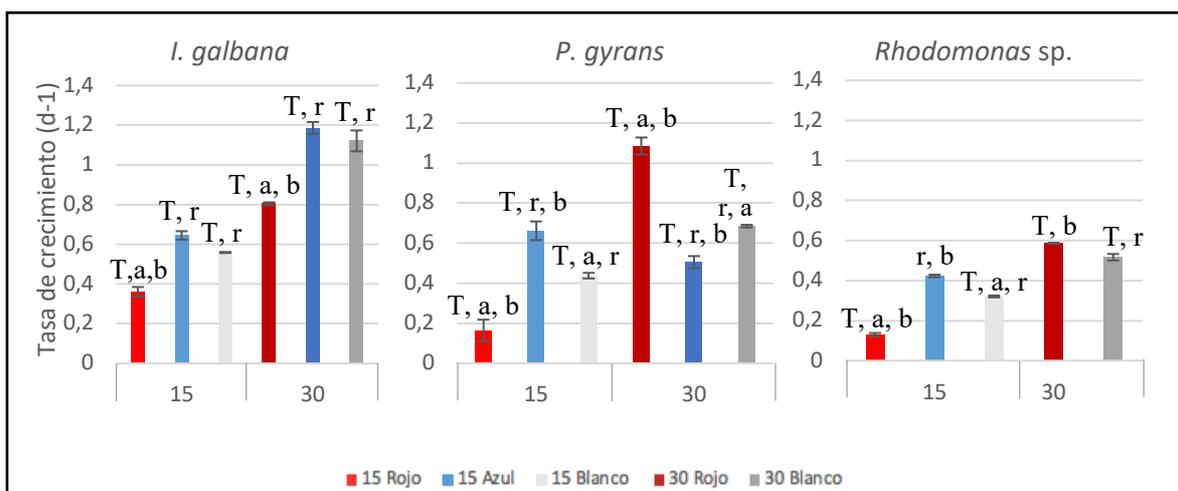


Figura 4. Tasas de crecimiento de *I. galbana*, *P. gyrans* y *Rhodomonas* sp. expuestas a las diferentes condiciones de luz y temperatura. Diferencias significativas ($p < 0,01$). T: diferencias respecto a la misma luz y distinta temperatura; a: diferencias con luz azul a la misma temperatura; b: diferencias con luz blanca a la misma temperatura; r: diferencias con luz roja a la misma temperatura.

3.2. Composición pigmentaria

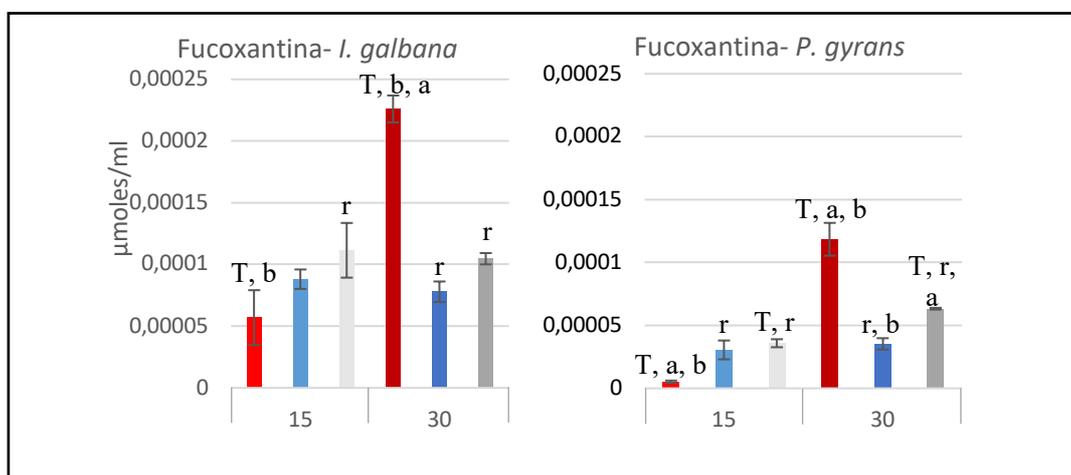
Isochrysis galbana presentó pigmentos de tipo HAPTO-3 como son las clorofilas *a*, *c*₁, *c*₂ y *c*₂-MGDG y carotenoides como fucoxantina, violaxantina, diadinoxantina, diatoxantina y β -caroteno. Por su parte, *P. gyrans*, presentó pigmentos tipo HAPTO-2 que se caracterizan por tener los mismos pigmentos que HAPTO-3, a excepción de la clorofila *c*₂-MGDG e incluyen otras clorofilas como la *c*₂ *P. gyrans*.

En el caso de la criptofita *Rhodomonas* se observaron las clorofilas *a* y *c*₂, así como aloxantina, crocoxantina y monadoxantina, carotenoides característicos de esta división, y α -caroteno.

3.3. Influencia de luz y temperatura en la composición pigmentaria

El análisis estadístico de todos los pigmentos en las diferentes especies mostró que las producciones pigmentarias se veían afectadas por la luz y la temperatura en todos los casos.

La producción más alta en los carotenoides de las haptofitas se produjo en luz roja y a 30°C, a excepción de la diatoxantina y el β -caroteno de *P. gyrans*. Sin embargo, a 15°C la producción de todos los carotenoides fue menor en luz roja que en azul y blanca (Figura 5).



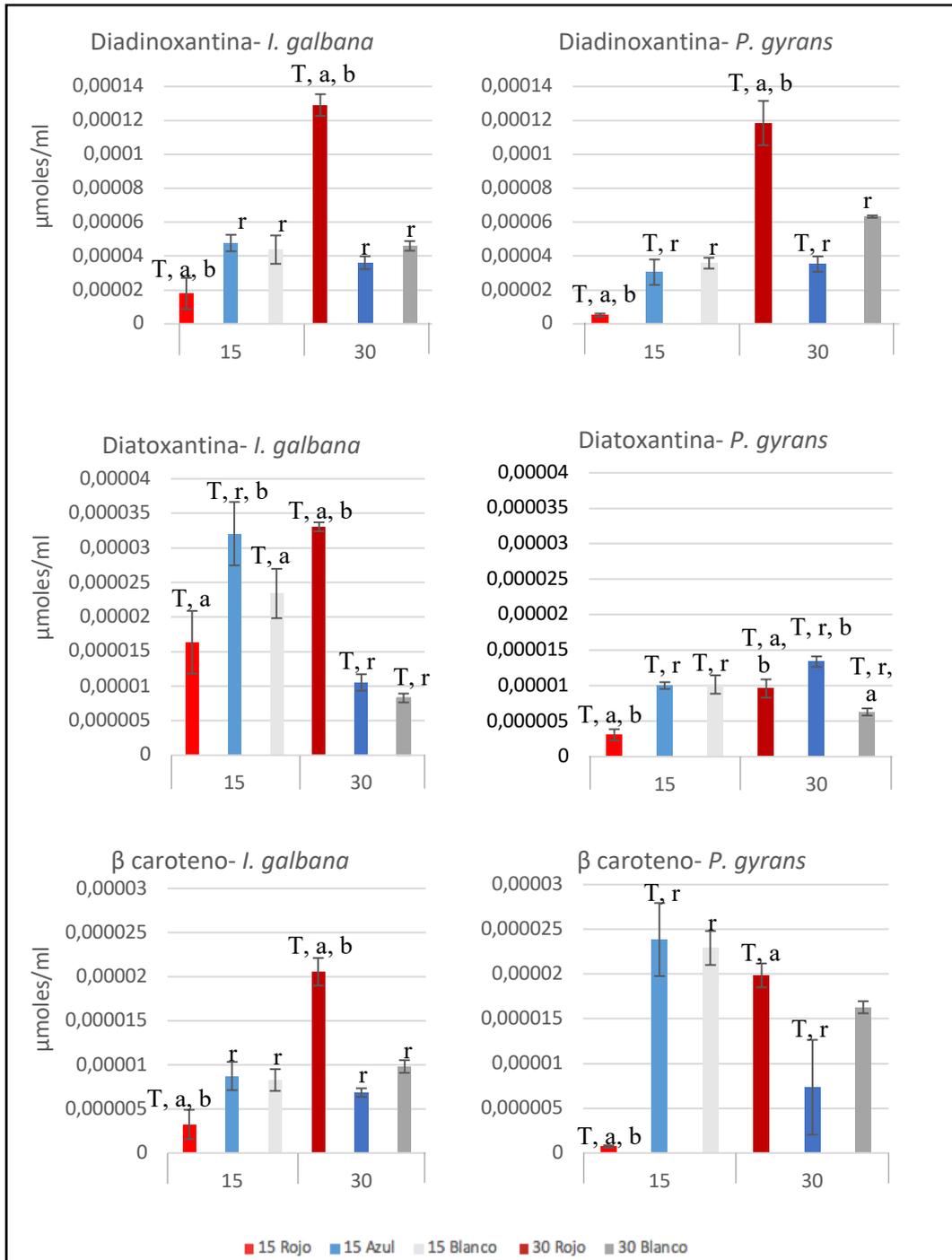


Figura 5. Concentración (μmoles/ml) de diadinoxantina, diatoxantina y β-caroteno en las haptofitas *I. galbana* y *P. gyrans*. Diferencias significativas ($p < 0,01$). T: diferencias respecto a la misma luz y distinta temperatura; a: diferencias con luz azul a la misma temperatura; b: diferencias con luz blanca a la misma temperatura; r: diferencias con luz roja a la misma temperatura.

En el caso de los carotenoides de criptofitas, por lo general, la producción a 15°C fue mayor en luz azul que en las otras dos luces, excepto en aloxantina. A 30°C, en cambio, la cantidad máxima de pigmentos se obtuvo en la luz roja, salvo en el caso de la monadoxantina (Figura 6).

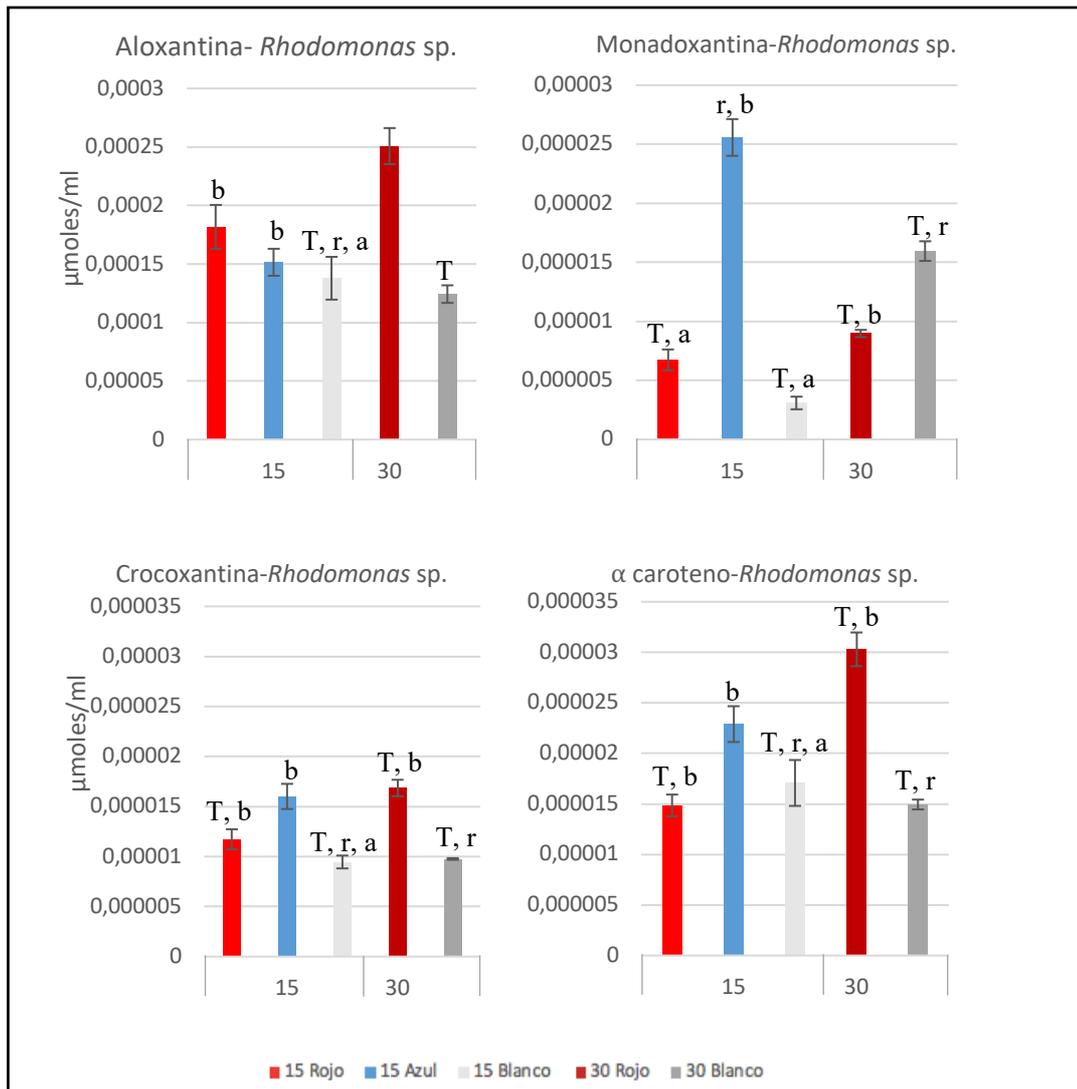


Figura 6. Representación gráfica de µmoles/ ml de carotenoides de la criptofita *Rhodomonas* sp. Diferencias significativas ($p < 0,01$). T: diferencias respecto a la misma luz y distinta temperatura; a: diferencias con luz azul a la misma temperatura; b: diferencias con luz blanca a la misma temperatura; r: diferencias con luz roja a la misma temperatura

Las clorofilas mostraron una mayor concentración en luz roja y 30°C en todos los casos. Además, a 15°C, salvo en *Rhodomonas* sp., la mayor cantidad de pigmento se obtuvo con luz blanca, aunque en *P. gyrams* la diferencia entre la luz blanca y azul no fue significativa para la clorofila *a* (Figura 7).

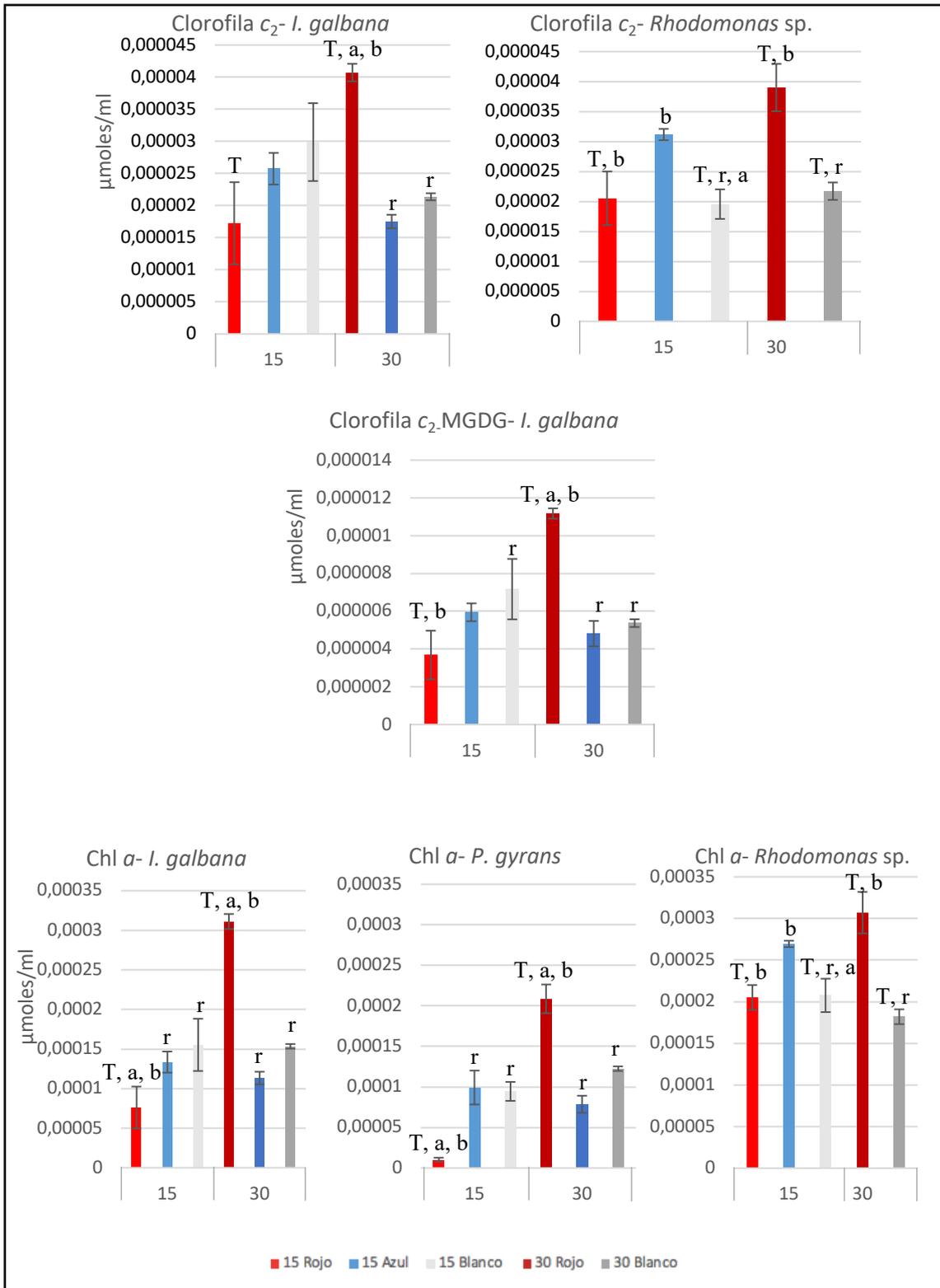


Figura 7. Representación gráfica de $\mu\text{moles/ml}$ de clorofila a , c_2 -MGDG y c_2 en las tres especies. Diferencias significativas ($p < 0,01$). T: diferencias respecto a la misma luz y distinta temperatura; a: diferencias con luz azul a la misma temperatura; b: diferencias con luz blanca a la misma temperatura; r: diferencias con luz roja a la misma temperatura

4. DISCUSIÓN

4.1. Tasas de crecimiento

Las tasas de crecimiento de las tres especies en función de las temperaturas muestran que el crecimiento es mayor a 30°C en todas las luces, excepto para *P. gyrans* en luz azul. Respecto a las especies, las tasas de crecimiento son menores en *Rhodomonas* sp. que en las dos haptofitas. Esto puede ser debido a que estas últimas son conocidas por su capacidad de alcanzar grandes densidades en diferentes condiciones ambientales, soportando incluso amplios rangos de temperatura y luz (Moestrup, 1994).

A 15°C los cultivos de las 3 especies tienen tasas de crecimiento más altas con luz azul que con las luces roja y blanca. En esta misma condición, luz azul y 15 °C, las dos haptofitas logran un crecimiento similar (0,64 d⁻¹ en *I. galbana* y 0,66 d⁻¹ en *P. gyrans*) a la diatomea *Pseudo-nitzschia multistriata* en el estudio de Brunet *et al.* (2014). Además, *I. galbana* y *P. gyrans* muestran patrones pigmentarios similares a los de esta diatomea, con la fucoxantina como pigmento principal. Según Brunet *et al.* (2014), esto revela que un eficiente desarrollo de las características de aclimatación, variando sus estrategias de reparto de energía y control de vías bioquímicas, pueden conducir a unas eficiencias de crecimiento similares. Esto, junto con la falta de activación del ciclo de las xantofilas dependiente de la luz roja y la NPQ en luz azul, que limitan el costo energético de la respuesta fotoprotectora, permite una mayor inversión energética para el crecimiento.

En esa misma temperatura de 15°C, las tres especies presentan una disminución significativa de las tasas de crecimiento cuando son sometidas a luz roja. Este comportamiento se observa también en *Phaeodactylum tricornutum*, por ejemplo, donde Schellenberger Costa *et al.* (2012) concluyen que, para la misma cantidad de luz absorbida, el uso de la energía lumínica para la producción de biomasa es menos eficiente en las células cultivadas en luz roja. Argumentan que podría existir una disipación de la energía celular por el aumento de las tasas de respiración mitocondrial durante el periodo de oscuridad en cultivos de luz roja frente a los de luz blanca y azul. No obstante, es en esta misma luz y a 30°C donde se observan las tasas de crecimiento más altas en *P. gyrans* y *Rhodomonas* sp.

4.2. Composición pigmentaria

Hay un claro ajuste de la composición pigmentaria a los cambios de calidad de luz y temperatura en todas las especies, siendo estos cambios de proporción menor en la luz blanca entre las dos temperaturas. Este ajuste ya ha sido descrito por otros autores como van Leuwee *et al.* (2014) o Garrido *et al.* (2016), en estudios similares de variaciones de luz con especies de las mismas divisiones.

Aunque la clorofila *a* se usa comúnmente como una medida del contenido pigmentario, otros pigmentos pueden contribuir significativamente a la absorción de luz, así como a la disipación de la energía de excitación. Los pigmentos están unidos a proteínas *in situ* como parte de los complejos del centro de reacción, los complejos periféricos y los complejos de captación de la luz (MacIntyre *et al.*, 2002).

Según Garrido *et al.* (2016), cabría esperar un aumento general en clorofilas, tanto *a* como *c*, bajo luz roja ya que solo estas, especialmente la clorofila *a*, son capaces de capturar luz en longitudes de onda superiores a 600 nm. No obstante, solo se alcanzan niveles altos de clorofila *a* en esta luz en las tres especies a 30°C, ya que a 15°C esto ocurre en la luz blanca y azul. Por tanto, la abundancia de clorofila *a* varía, ampliamente, tanto entre especies como dentro de las especies expuestas a diferente color de luz y temperatura en las divisiones examinadas.

Teniendo en cuenta las diferentes clorofilas *c*, los patrones de variación observados sugieren globalmente un papel potencial en la recolección de luz para estos pigmentos puesto que son más abundantes en luz roja y 30°C. Las clorofilas *c*₂ son pigmentos de recolección de luz y parte del complejo de proteínas fucoxantina-clorofila *a/c* (Porra *et al.* 2011). También se ha sugerido esta función de recolección de luz para la clorofila *c*₂-MGDG, así como de administrador de clorofila *c*₂ desde su lugar de formación hasta la ubicación final en las antenas proteicas de fucoxantina-clorofila *a/c* (Garrido *et al.*, 2000). En este estudio, las tendencias dependientes de la luz y de la temperatura de la clorofila *c*₂-MGDG en *I. galbana* son similares a las de la clorofila *c*₂ polar con un aumento de la proporción de ambas a 30°C y luz roja, lo que sugiere que presenta una función de captación de la luz. Esto coincide con los resultados obtenidos por Rodríguez *et al.* (2006), en los que la clorofila *c*₂-MGDG también tiene patrones similares a la clorofila *c*₂ y actúa como captador de luz en *Phaeocystis globosa* y *Prymnesium parvum*.

Los pigmentos de tipo fucoxantina son importantes en la adaptación a luces de baja intensidad porque son pigmentos de respuesta flexible ante la luz (van Leeuwe *et al.*, 2014). Las proporciones de fucoxantina en las dos haptofitas son mayores en luz roja y 30°C que en azul, dado que son más necesarias de acuerdo con las longitudes de onda y la energía vinculada. Por tanto, las bajas temperaturas parecen limitar la capacidad o la necesidad de invertir energía biosintética en los pigmentos de recolección de luz, lo que lleva a una composición pigmentaria característica similar a la de las células aclimatadas a luz alta (Hammer *et al.*, 2002).

En cuanto a los carotenos, las proporciones observadas en las dos haptofitas de β -caroteno y la de α -caroteno de la criptofita no muestran un patrón claro, ya que el máximo en *I. galbana* y *Rhodomonas* sp. se produce en luz roja y a 30°C, mientras que en *P. gyrans* ocurre en luz azul y 15°C. Además, se ha visto que a medida que la proporción de pigmentos fotosintéticos disminuye y la proporción de pigmentos fotoprotectores aumenta con la irradiancia, la capacidad de disipar el exceso de energía absorbida aumenta, aunque la proporción de todos los carotenoides con respecto a clorofila *a* puede no cambiar mucho (MacIntyre *et al.*, 2002).

Los pigmentos relacionados con el ciclo de la xantofila (diadinoxantina-diatoxantina) no muestran patrones claros inducidos por la luz. Aunque cabría esperar un aumento de las proporciones de diatoxantina en luz azul respecto a los otros colores, por lo general, no existen diferencias significativas entre la concentración de este pigmento en luz azul y blanca, pero sí entre azul y rojo a 15°C. Esto parece demostrar la necesidad de una fotoprotección bajo la luz azul y 15°C, ya que la acumulación de este pigmento ilustra una reorganización del aparato fotosintético para proteger a las células del estrés oxidativo inherente a condiciones de luz más altas (MacIntyre *et al.* 2002). Además, podría coincidir con la hipótesis de que las especies reaccionan de manera similar a las luces rojas y azules a la que podrían hacerlo a las luces de baja y alta intensidad, respectivamente (Brunet *et al.*, 2014). Sin embargo, esto no coincide con los resultados observados a 30°C y luz roja, en los que las concentraciones de diadinoxantina y diatoxantina son elevadas.

El papel de la aloxantina en la recolección de luz o como pigmento fotoprotector en criptofitas es poco conocido. En *Rhodomonas* sp. se observa un aumento en la concentración de este pigmento en luz roja frente a la azul y la blanca, lo que indicaría una función de recolección de luz. Estos resultados no coinciden con los observados en

Henriksen *et al.* (2002) ya que en este estudio la proporción de aloxantina aumenta conforme aumenta la irradiación sobre *Rhodomonas salina*, mostrando un papel fotoprotector de este pigmento.

La temperatura es un factor que no solo controla la actividad fotosintética y la síntesis asociada de pigmentos a través de vías de flujo de energía, sino que también afecta directamente la estructura de las membranas fotosintéticas. En microalgas, una disminución de la temperatura coincide con un aumento en el contenido de ácidos grasos insaturados para mantener la flexibilidad de las membranas (Morgan-Kiss *et al.* 2006), lo cual puede ser beneficioso para la fluidez de la membrana, pero también deja las membranas más susceptibles a la fotooxidación. En respuesta a estos cambios, las microalgas aumentan el contenido de pigmentos fotoprotectores como diatoxantina, diadinoxantina y β -caroteno, lo que coincide con los resultados observados en *I. galbana* expuesta a 15°C. Estos compuestos no solo actúan como pigmentos fotoprotectores, sino que también se sabe que funcionan como un estabilizador de membrana en condiciones de estrés (Strzalka *et al.* 2003).

Por tanto, las temperaturas bajas conducen a reducciones en los pigmentos de recolección de luz como la fucoxantina y aumentos modestos de los pigmentos fotoprotectores. Estos hallazgos son consistentes con un estudio de campo en una comunidad dominada por *Phaeocystis antarctica* por Kennedy *et al.* (2012), quienes atribuyeron una disminución en la actividad fotosintética con temperaturas decrecientes y alta salinidad (> 100 psu) al estrés foto-oxidativo. No obstante, los resultados observados en *P. gyrans* no coinciden con esta teoría, ya que los niveles de diadinoxantina son más bajos a 15°C que a 30°C en luz roja y blanca, y en el caso de la diatoxantina no hay un patrón claro. Además, los niveles de fucoxantina sí son significativamente más bajos en *P. gyrans* a 15°C que a 30°C para rojo y blanco, mientras que en *I. galbana* solo ocurre en luz roja.

Este trabajo revela una gran variabilidad interespecífica del conjunto total de pigmentos captadores de luz y fotoprotectores. Además, refleja la gran diversidad de estrategias pigmentarias existentes en el fitoplancton, que generalmente se interpreta como un rasgo funcional importante para la adaptación específica de microalgas a los diversos nichos ecológicos pelágicos (Laviale & Neveux, 2011) e intenta aportar conocimiento sobre las condiciones más favorables para la producción de determinados pigmentos.

Esta gran diversidad pigmentaria de microalgas ha llevado a un incremento del interés por descubrir las diferentes utilidades que pueden tener estos pigmentos para la salud, la alimentación o el medio ambiente. Ejemplo de esto son investigaciones en los carotenoides, como el β -caroteno y la fucoxantina, cuyos principales usos son la alimentación y la salud para el tratamiento de cáncer, problemas cardiovasculares y algunos trastornos neurológicos, entre otros (Kohen & Nyska, 2002; Jin *et al.*, 2003). Estos usos se ven favorecidos por las características intrínsecas de los carotenos como son su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral (Guedes *et al.*, 2011).

5. CONCLUSIONES

Existe variación en la composición pigmentaria y en las tasas de crecimiento de cultivos de microalgas expuestos a diferentes luces y temperaturas. Por lo general, el aumento de la temperatura conlleva un incremento del crecimiento y de las concentraciones de los diferentes pigmentos.

Comparando las diferentes condiciones de experimentación, se observa que los mejores resultados tanto en las tasas de crecimiento como en las producciones pigmentarias se obtienen, en la mayoría de los casos, a 30°C y luz roja. Es en esta misma luz, pero a 15°C la condición en la que se obtienen resultados de peor calidad. En cuanto a la luz blanca, esta no presenta diferencias importantes con respecto a la luz azul debido a que el espectro de la luz LED blanca presenta parte del espectro de la luz LED azul, es decir, la luz blanca LED está enriquecida en luz azul (Piasecki *et al.*, 2010).

Además, comparando las diferentes tasas de crecimiento y el tiempo que tardan en alcanzar la fase exponencial tardía las tres especies, se puede concluir que la especie óptima para obtener producciones pigmentarias elevadas en cortos periodos de tiempo es *Isochrysis galbana*.

Por último, dada la variabilidad de los resultados pigmentarios obtenidos, y con el fin de obtener resultados más robustos, sería oportuno reducir el número de condiciones experimentales y la realización de un mayor número de réplicas.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abida, H., Ruchaud, S., Rios, L., Humeau, A., Probert, I., De Vargas, C., Bach, S. & Bowler, C. (2013). Bioprospecting marine plankton. *Marine drugs*, 11(11), 4594-4611. doi:10.3390/md11114594

Anderson, J. M., Chow, W. S., & Park, Y. I. (1995). The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research*, 46(1-2), 129-139. doi.org/10.1007/BF00020423

Brunet, C., Chandrasekaran, R., Barra, L., Giovagnetti, V., Corato, F., & Ruban, A. V. (2014). Spectral radiation dependent photoprotective mechanism in the diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *PLoSOne*, 9(1),1-10. doi.org/10.1371/journal.pone.0087015

Brunet, C., Johnsen, G., Lavaud, J., & Roy, S. (2011). Pigments and photoacclimation processes. In S. Roy, C. A. Llewellyn, E. S. Egeland, & G. Johnsen (Eds.), *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography* (pp. 445-471). USA: Cambridge University Press.

Davison, I. R. (1991). Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of phycology*, 27(1), 2-8. doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00002.x

Edwardsen, B., Eikrem, W., Shalchian-Tabrizi, K., Riisberg, I., Johnsen, G., Naustvoll, L., & Throndsen, J. (2007). *Verrucophora farcimen* gen. et sp. nov. (Dictyochophyceae, Heterokonta)-a bloom-forming ichthyotoxic flagellate from the Skagerrak, Norway. *Journal of Phycology*, 43(5), 1054-1070. doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00390.x

Falkowski, P. G., & LaRoche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology*, 27(1), 8-14. doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00008.x

Garrido, J. L., Brunet, C., & Rodríguez, F. (2016). Pigment variations in *Emiliana huxleyi* (CCMP370) as a response to changes in light intensity or quality. *Environmental microbiology*, 18(12), 4412-4425. doi.org/10.1111/1462-2920.13373

Garrido, J. L., Otero, J., Maestro, M. A., & Zapata, M. (2000). The main nonpolar chlorophyll c from *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) is a chlorophyll c₂-monogalactosyldiacylglyceride ester: a mass spectrometry study. *Journal of phycology*, 36(3), 497-505. doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99135.x

Goss, R., & Jakob, T. (2010). Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis research*, 106(1-2), 103-122. doi.org/10.1007/s11120-010-9536-x

Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*, 9(4), 625-644. doi.org/10.3390/md9040625

Guillard, R. R., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: *I. Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), 229-239. doi.org/10.1139/m62-029. doi.org/10.1139/m62-029

Harris, G. N., Scanlan, D. J., & Geider, R. J. (2005). Acclimation of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) to photon flux density. *Journal of phycology*, 41(4), 851-862. doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00109.x

Hammer, A., Schumann, R., & Schubert, H. (2002). Light and temperature acclimation of *Rhodomonas salina* (Cryptophyceae): photosynthetic performance. *Aquatic Microbial Ecology*, 29(3), 287-296. doi:10.3354/ame029287

Henriksen, P., Riemann, B., Kaas, H., Sørensen, H. M., & Sørensen, H. L. (2002). Effects of nutrient-limitation and irradiance on marine phytoplankton pigments. *Journal of Plankton Research*, 24(9), 835-858. doi.org/10.1093/plankt/24.9.835

Jeffrey, S. W. (1997). Chlorophyll and carotenoid extinction coefficients. In S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura & S. W. Wright (Eds.), *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to Modern Methods*. (pp. 595-596). Paris: UNESCO.

Jin, E. S., Polle, J. E., Lee, H. K., Hyun, S. M., & Chang, M. (2003). Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(2), 165-174.

Kennedy, F., McMinn, A., & Martin, A. (2012). Effect of temperature on the photosynthetic efficiency and morphotype of *Phaeocystis antarctica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 429, 7-14. doi.org/10.1016/j.jembe.2012.06.016

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650. doi.org/10.1080/01926230290166724

Lavaud, J., Rousseau, B., Van Gorkom, H. J., & Etienne, A. L. (2002). Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiology*, 129(3), 1398-1406. doi.org/10.1104/pp.002014

Laviale, M., & Neveux, J. (2011). Relationships between pigment ratios and growth irradiance in 11 marine phytoplankton species. *Marine Ecology Progress Series*, 425, 63-77. doi.org/10.3354/meps09013

Lohr, M., & Wilhelm, C. (2001). Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta*, 212(3), 382-391. doi.org/10.1007/s004250000

MacIntyre, H. L., Kana, T. M., Anning, T., & Geider, R. J. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of phycology*, 38(1), 17-38. doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x

Moestrup, Ø. (1994). Economic aspects: 'blooms', nuisance species and toxins. In J. C. Green & B. S. C. Leadbeater (Eds.), *The Haptophyte Algae* (pp. 265-285). Oxford: Clarendon Press.

Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., & Huner, N. P. (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 222-252. DOI: 10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006

Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of applied phycology*, 12(3-5), 527-534. doi.org/10.1023/A:1008106304417

Piasecki, T., Breadmore, M. C., & Macka, M. (2010). White LEDs as broad spectrum light sources for spectrophotometry: Demonstration in the visible spectrum range in a diode-array spectrophotometric detector. *Electrophoresis*, 31(22), 3737-3744. doi.org/10.1002/elps.201000341

Porra, R. J., Oster, U. & Scheer, H. (2011). Recent advances in chlorophyll and bacteriochlorophyll biosynthesis. In S. Roy, C. A. Llewellyn, E. S. Egeland, & G. Johnsen (Eds.), *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography* (pp. 78–112). USA: Cambridge University Press.

Raven J.A. & Geider R.J. (2003). Adaptation, Acclimation and Regulation in Algal Photosynthesis. In A. W. D. Larkum, S. E. Douglas & J. A. Raven (Eds.), *Photosynthesis*

in *Algae. Advances in Photosynthesis and Respiration* (pp. 385-412). Dordrecht: Springer.

Rodríguez, F., Chauton, M., Johnsen, G., Andresen, K., Olsen, L. M., & Zapata, M. (2006). Photoacclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. *Marine Biology*, *148*(5), 963-971. doi.org/10.1007/s00227-005-0138-7

Schellenberger Costa, B., Jungandreas, A., Jakob, T., Weisheit, W., Mittag, M., & Wilhelm, C. (2012). Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of experimental botany*, *64*(2), 483-493. doi.org/10.1093/jxb/ers340.

Strzałka, K., Kostecka-Gugała, A., & Latowski, D. (2003). Carotenoids and environmental stress in plants: significance of carotenoid-mediated modulation of membrane physical properties. *Russian Journal of Plant Physiology*, *50*(2), 168-173. doi.org/10.1023/A:1022960828050

Van Leeuwe, M. A., Visser, R. J., & Stefels, J. (2014). The pigment composition of *Phaeocystis antarctica* (Haptophyceae) under various conditions of light, temperature, salinity, and iron. *Journal of phycology*, *50*(6), 1070-1080. doi.org/10.1111/jpy.12238

Zapata, M., Jeffrey, S. W., Wright, S. W., Rodríguez, F., Garrido, J. L., & Clementson, L. (2004). Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: implications for oceanography and chemotaxonomy. *Marine Ecology Progress Series*, *270*, 83-102. doi:10.3354/meps270083

Zapata, M., Rodríguez, F., & Garrido, J. L. (2000). Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C₈ column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series*, *195*, 29-45. doi:10.3354/meps195029