

**Incorporación de Carbono Inorgánico en
Bostrychia scorpioides
(Hudson) Montagne ex Kützing y
Catenella caespitosa
(Withering) L. M. Irvine**

Miriam Ruiz Nieto

TESIS DOCTORAL
Miriam Ruiz Nieto

Tesis doctoral

2014



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Ecología
y Geología
Diciembre, 2014

Directores: F. Xavier Niell
Raquel Carmona



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Ecología y Geología

**Incorporación de Carbono Inorgánico en
Bostrychia scorpioides (Hudson) Montagne ex Kützing y
Catenella caespitosa (Withering) L. M. Irvine**

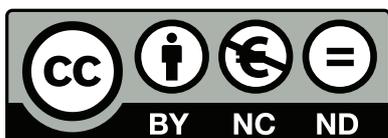
Miriam Ruiz Nieto



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Miriam Ruiz Nieto

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Ecología y Geología

PROGRAMA DE DOCTORADO

Análisis y Gestión de Paisajes Mediterráneos

**“Incorporación de Carbono Inorgánico en
Bostrychia scorpioides (Hudson) Montagne ex Kützing y
Catenella caespitosa (Withering) L. M. Irvine”**

Memoria presentada por Miriam Ruiz Nieto para la optar a la mención del título de
Doctor por la Universidad de Málaga

F. Xavier Niell Castanera
(Director de tesis)

Raquel Carmona Fernández
(Directora de tesis)

Miriam Ruiz Nieto
(Doctoranda)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA

Área de Ecología

F. XAVIER NIELL, con DNI 36474904D, Catedrático de Ecología y RAQUEL CARMONA FERNÁNDEZ, con DNI 25327877R, Profesora Contratada Doctora de Ecología, ambos de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN

Que la presente memoria titulada “**Incorporación de Carbono Inorgánico en *Bostrychia scorpioides* (Hudson) Montagne ex Kützing y *Catenella caespitosa* (Withering) L. M. Irvine**” presentada por la Licenciada en Ciencias Ambientales Miriam Ruiz Nieto, ha sido realizada bajo nuestra dirección y la publicación que la avalan no ha sido utilizada en tesis anteriores. Considerando que representa trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman el presente en Málaga, a 12 de Diciembre de 2014.

Fdo. F. Xavier Niell Castanera

Prof. Catedrático de Ecología

Universidad de Málaga

Fdo. Raquel Carmona Fernández

Prof. Contratada Doctora

Universidad de Málaga



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA

Área de Ecología

D. Carlos Jiménez Gámez, Director del Departamento de Ecología y Geología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación “**Incorporación de Carbono Inorgánico en *Bostrychia scorpioides* (Hudson) Montagne ex Kützing y *Catenella caespitosa* (Withering) L. M. Irvine**” llevado a cabo por la Licenciada en Ciencias Ambientales Miriam Ruiz Nieto, ha sido realizado en este Departamento.

Fdo.: D. Carlos Jiménez Gámez

La presente Tesis Doctoral ha sido subvencionada por el Ministerio de Ciencia e Innovación mediante una beca de formación de personal investigador FPI (convocatoria 2009) en el marco del proyecto: CTM2008-04453. Durante siete meses también ha sido subvencionado por la empresa Energía y Celulosa mediante el proyecto: 8.06/44.2838-4. El sistema sobre el que se ha investigado se enmarca en la temática de las actividades del Campus de Excelencia Internacional del Mar (CEIMAR) en la Universidad de Málaga. El trabajo se ha desarrollado dentro del Grupo de Investigación de Sistemas Acuáticos (P.A.I. RMN-0176 de la Junta de Andalucía), del Área de Ecología del Departamento de Ecología y Geología de la Universidad de Málaga.

*“El mar escupía un lamento
tan tenue que nadie lo oyó.
Era un dolor de tan adentro
que toda la costa murió.
Llora lamentos la nube que enfermó
y escribe espantos en la arena el dolor.
Arrulla el miedo a un delfín que bebió
de un agua negra, su suerte emigró.
[...]
Y una gaviota cuentan que decidió
en acto suicida inmolarse en el sol.
Ríe desprecios un barco que encalló,
y se desangra en su lecho: ¡LA MAR!
Hagamos una revolución,
que nuestro líder sea el sol,
y nuestro ejército
sean mariposas”.*

***La costa del silencio
Mago de Oz***

Agradecimientos

Hace meses que sueño con este momento, en el que puedo dar la escritura de este manuscrito por concluida y en el que me dispongo a agradecer a todos los que me han rodeado durante los últimos años, su aportación a este trabajo.

En primer lugar, todo esto se lo debo a mis directores, el Prof. F. Xavier Niell y la Dra. Raquel Carmona. Ellos han sido los que me han marcado el sendero que debía seguir en un primer momento y los que me mostraron el mapa después, para que pudiera tomar mis propias decisiones. Me han enseñado a trabajar rigurosamente, a equivocarme y enmendar el entuerto, a escribir trabajos científicos e incluso, quién me lo iba a decir, a disfrutar leyendo artículos.

Gracias a F. Xavier Niell, porque es un honor para mí poder decir que he sido tu alumna y becaria, por tu genialidad científica y tu carisma. Porque he aprendido muchísimo de ti y siempre me has animado a seguir. Gracias.

A Raquel, porque no solo eres mi directora sino también mi amiga, y aunque pudiera ser difícil de conjugar, creo que la cosa no ha ido nada mal. Muchas gracias por tu paciencia y por tus ánimos. Por el esfuerzo que has hecho para que todo salga bien. Pero sobretodo, gracias por los “tratamientos”, porque son los que me han salvado de enloquecer entre las paredes de esos laboratorios.

Gracias también al resto de profesores y exprofesores de este departamento Jaime, Juan Lucena, Valeriano, Félix, Carlos, José María, Begoña, Gordillo, María, Nathalie, Kike, Roberto y Andy. Gracias por estar siempre dispuestos a resolver cualquier duda, y por interesaros sobre mis progresos y sobre mi futuro en el gélido Aberdeen. Y a Concha y Malen, gracias por facilitarme el trabajo y ayudarme siempre con una sonrisa.

A José Antonio Fernández, por sus estupendos consejos y su extraordinaria paciencia enseñándome a manejar el IRGA. Y a la gente de Fisiología Vegetal, Bea, Karima y Delia, y en especial a Lourdes, gracias por abrirme las puertas de tu casa interior y recibirme con una copa de vino en la mano. Los próximos tratamientos van a tener que ser en Escocia.

Por supuesto agradecer a la Dra. Pauline Snoeijs del Department of Systems Ecology de la Universidad de Estocolmo, la oportunidad de trabajar en su laboratorio durante tres meses en los que me descubrí a mí misma y conocí otra manera de trabajar. Gracias también a los becarios de su laboratorio: Ma Qiang, Jenny, Peter y Filip y José, porque fueron encantadores y me ayudaron en todo lo posible. A special thank for Berit, Tina, Anna and Saeed, the family I lived with in Stockholm. Thank you for making me feel I was part of your family. I would love to see you soon.

I also would like to express my gratitude to Dr Mario Giordano and Dr Rui Santos for accepting to write a report about the suitability of my thesis to apply for the “Doctor Internacional” mention.

Y llegó el momento lacrimógeno, ese en el que me acuerdo de los becarios, ex-becarios y demás ocupantes de la sala de becarios: gracias a todos, porque si me tuviera

que quedar con una sola cosa de todos estos años en el departamento elegiría sin dudarle el haberos conocido. No importa si de ahora en adelante estaremos cerca o lejos, si nos veremos a menudo o nos perderemos la pista durante años. El tiempo que hemos compartido, las vivencias, la empatía que ha existido siempre entre nosotros, lo que me habéis hecho sentir y lo que he aprendido de vosotros, eso quedará en mí para siempre. Me habéis hecho ser mejor persona. Rafa, María M., Celia, Rosa, Candela, Charo, Rakel, Irene, Conchi, M^a Ángeles, Roberto, Helen, María L. Mayte, Armando. A todos gracias. A los que ya se fueron, me alegro de haberos tenido como compañeros en algún momento. A los que aún están, gracias por seguir ayudándome y apoyándome. A las nuevas incorporaciones, suerte en el camino que os queda por andar. De estos últimos no puedo dejar de mencionar a Félix, porque en poco tiempo se ha hecho querer, siempre tan amable y tan dispuesto a ayudar. Ojalá tengas mucha suerte en todo lo que te propongas. Y por supuesto, mis Ecogirls, de las que podría escribir otra tesis sólo con halagos para ellas. Allá vamos: Candela, qué puedo decir de ti amiga?... sólo eso, amiga con todas las letras y todo lo que eso conlleva. Necesitaría mil páginas para describir todo lo que significas para mí. Celia, por esas largas charlas en horas bajas y a altas horas, porque you can count on me like one, two, three. Sevilla está al ladito de Aberdeen, tú sabes que mientras haya Skype no hay distancia que nos separe, te quiero mucho peque. Charo, por ser una bellísima persona, por tu ingenio y tus grandes consejos. Eres un amor de persona. Tengo tanto que aprender de ti... Conchi, esa peque preciosa y estupenda (ya sabes que me voy a comprar una como tú para ponerla encima de la tele), inteligente y perfeccionista, eres un cielo y tienes que empezar a creerlo tú también. Gracias por tu cariño y por nuestras charlas sobre Rubisco y anhidrasa. Irene, supermamá, sabia y práctica donde las haya... de grande quiero ser como tú. María L. esa mujer luchadora y trabajadora al máximo, que contagia alegría a todo el que está a su alrededor. Rakel, mi Palmonera, compañera de viaje y visitadora oficial a países extranjeros. Gracias por todo lo que me has ayudado profesional y personalmente, os espero pronto en Aberdeen. Rosa, mi “prima”, esa rubia de ojos azules que es capaz de superar cualquier dificultad. Lista, guapa, simpática... Alguien da más?? Pues sí, es amiga mía.

Además de estas maravillosas personas, he tenido la suerte de poder compartir laboratorio con algunos alumnos internos en los últimos años. Fran, Mario, Gabi, Juanje, Dani, Carmen, María, Marina, Joaquín y Christian. Muchísimas gracias a todos ellos por hacer de esas horas interminables un ratito agradable. Especialmente a Juanje y Dani gracias por ayudarme con los experimentos de Rubisco, y sobre todo a Mario, gran persona y gran corazón, mi amigo y compi de laboratorio hasta las tantas. Un pedacito de este manuscrito también es tuyo.

Esta tesis no ha sido sólo un “sufrimiento” para mí, sino para muchas otras personas que se han preocupado por su avance y por cómo me sentía. A Sandra, mi “Epifica”, por estar ahí todos estos años, amiga incondicional a pesar de la distancia. Mucha suerte en tu nueva vida. Gracias a mis niñas, compañeras de carrera, hoy mujeres de éxito profesional y personal, algunas maravillosas madres, otras fantásticas aventureras. Os siento cerca y eso me da mucha fuerza. Gracias amigas. A mi grupo de salseros, porque ya lo dice la canción, “Salsero si llamas, yo vengo” y vosotros venís siempre que os necesito. Gracias a los “Pistas” sobre todo a los malagueños, que me sacan de tapitas para que me olvide del mundo. Y como reciente incorporación, mis amigos “Aberdonians”, que están deseando que termine esta tesis para que los domingo

les cocine arroz con cosas, o sea, paella. Gracias por preocuparos por mí. En poco tiempo os he cogido muchísimo cariño.

Tampoco se me puede olvidar agradecer a Marcus y Khaliq su ayuda. Thanks for solving my English grammar questions any time and for the psychological support, thanks especially for being my friends.

He dejado para el final la mención que más amor se merece por mi parte. La familia no se puede elegir pero si hubiera podido hacerlo os habría elegido a vosotros, sin lugar a dudas. A mi madre por ser mi todo, mi apoyo, mi consuelo, el amor hecho persona. A mi padre porque con sus bromas ha sabido siempre sacarme una sonrisa e inculcarme esa alegría y positividad tuyas. Ambos sois los cimientos sobre los que me sostengo cuando mi vida se tambalea. Sin vuestro apoyo hace mucho tiempo que habría abandonado. Ha sido duro, pero ya estamos aquí. A mi hermano, porque soy una gruñona y ha tenido que soportar mi mal humor. Gracias por ser único y genuino y por quererme a pesar de todo. Te espero en Aberdeen. A mi abuelo, a quien tanta ilusión le hace que su nieta sea doctora.

Y por último, pero no por eso menos importante, a Pablo por ser mi apoyo y mi alegría. La persona que mejor me comprende y que mejor me trata. Por valorarme más que yo misma y darme las fuerzas que a veces me faltan para acabar el día. Porque una frase tuya disipa todas mis dudas y temores. Porque soy tu compañera como tú mi compañero. Gracias por todo eso y por lo que nos queda por vivir. El fin de esta tesis es el inicio de una nueva aventura juntos que estoy deseando emprender.

A todos, GRACIAS.

A mi familia

A Pablo

Listado de abreviaturas usadas en la presente memoria

AZ	Acetazolamida
ACA	Actividad Anhidrasa carbónica
ACAc	Ácido aminocaproico
ANOVA	Análisis de la varianza
ASW	Agua de mar artificial
BSA	Albúmina bovina
BTP	Bis-Trispropano
CAext	Anhidrasa carbónica externa
CAint	Anhidrasa carbónica interna
CAs	Anhidrasas carbónicas
CAtotal	Anhidrasa carbónica total/Total carbonic anhydrase
CCMs	Mecanismos concentradores de Carbono
CE	Cóctel de enzimas
Ci	Carbono inorgánico/Inorganic carbon
CO ₂ cp	Punto de compensación para el CO ₂
CO ₂ sys	CO ₂ system
DBS	Sulfonamida unida a dextrano
DIDS	Ácido 4,4'-diisotiocianatostilbenato-2,2' disulfónico
DTT	Ditiotreitol
EB	Tampón de extracción
eCA	External Carbonic Anhydrase
EDD	Tampón para el cóctel de enzimas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E-flask	Frasco Erlenmeyer
EME	Tampón de ensayo
EZ	6-etoxizolamida
FW	Fresh weight
g _p	Conductancia fotosintética
iCA	Internal Carbonic Anhydrase
IRGA	Analizador de Gases Infrarrojos
Km	Constante de semisaturación
MON	Sal sódica monensina
MOPS	Ácido 4-Morfolino propanosulfónico
NPR	Net photosynthetic rate
NSW	Agua de mar natural/Natural Sea Water
PCpH	Punto de compensación para el pH/pH compensation point
PF	Peso fresco
PMSF	Fluoruro de fenilsulfonilo
PQ	Cociente fotosintético
PS	Peso seco
p/v	Peso/volumen
PVPP	Polivinilpolipirrolidona Rubisco
RuBP	Ribulosa bifosfato
SD	Desviación estandar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNK	Student-Newman-Keuls
TFB	Tasa de fotosíntesis bruta
TFN	Tasa de fotosíntesis neta
TFNi	Tasa de fotosíntesis neta en presencia de inhibidor
TR	Tasa de respiración
TRIS	Trizma Base
VAN	Ortovanadato sódico
v/v	volumen/volumen

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Antecedentes	3
1.2.- Incorporación y asimilación de Ci en el medio acuático	3
1.3.- Mecanismos de incorporación y concentración de Ci en organismos acuáticos fotosintéticos.....	5
1.3.1.- La enzima anhidrasa carbónica	6
1.3.2.- Mecanismos de incorporación de Ci alternativos a las CAs	8
1.4.- Los mecanismos de incorporación de HCO ₃ ⁻ en macroalgas.....	10
1.5.- Los mecanismos de incorporación de carbono en rodófitas de estuario	12
1.6.- Cambios en la osmolaridad y salinidad como variables reguladoras de los mecanismos de incorporación de Carbono en macroalgas de estuario	15
1.7.- Justificación del trabajo y objetivos	16
2.- MATERIAL Y MÉTODOS	19
2.1.- Material biológico: <i>Bostrychia scorpioides</i> y <i>Catenella caespitosa</i>	21
2.2.- Lugar de muestreo, recolección y mantenimiento de las algas	23
2.3.- Diseño experimental.....	25
2.4.- Medida de la actividad fotosintética con inhibidores de distintos mecanismos de incorporación de Ci.....	27
2.4.1.- Medida de la fotosíntesis como desprendimiento de O ₂	27
2.4.2.- Efecto de inhibidores de los mecanismos de incorporación de carbono sobre la fotosíntesis (evolución de O ₂)	28
2.4.3.- Medida de la fotosíntesis como incorporación de Ci en agua.....	29
2.4.3.1.- Cálculo para la obtención de las tasas en el IRGA en modo abierto	30
2.4.4.- Efecto de inhibidores de los mecanismos de incorporación de carbono sobre la fotosíntesis (incorporación de Ci)	31
2.4.5.- Medida de la fotosíntesis como incorporación de Ci en emersión	32
2.5.- Ensayos de Actividad Anhidrasa Carbónica	33
2.5.1.- Ensayos de la Actividad Anhidrasa Carbónica Externa (ACAext)	33
2.5.2.- Inhibición de la Actividad Anhidrasa Carbónica Externa.....	35
2.5.3.- Ensayo de la Actividad Anhidrasa Carbónica Total (ACAtotal)	35
2.5.4.- Inhibición de la Actividad Anhidrasa Carbónica Total.....	36
2.6.- Determination of the inorganic carbon form used by different experimental methods.....	37
2.6.1.- Photosynthetic response to different Ci concentrations	37
2.6.1.1.- Km (TIC) and conductance (g _p) calculations	37
2.6.2.- pH and alkalinity measurements	38
2.6.3.- pH-drift measurements	39
2.6.3.1.- Photosynthetic quotient (PQ).....	39
2.6.3.2.- Speciation of the Ci forms, calculated CO ₂ compensation point and spontaneous HCO ₃ ⁻ dehydration.....	40
2.6.4.- CO ₂ -drift	41
2.6.5.- Isotopic discriminants as Ci uptake markers	42
2.7.- Efecto de inhibidores de los mecanismos de incorporación de Ci en la concentración y actividad de la enzima Rubisco.....	44
2.7.1.- Incubaciones de las algas con los inhibidores	44

2.7.2.- Extracción de la enzima.....	44
2.7.3.- Determinación de la concentración de Proteínas solubles	45
2.7.4.- Determinación de la concentración de la enzima Rubisco.....	46
2.7.5.- Descripción del método espectrofotométrico para el cálculo de la actividad Rubisco	48
2.7.5.1.- Preparación del cóctel de enzimas.....	49
2.8.- Medida de la tasa fotosintética y la actividad CAext en relación con las fluctuaciones iónicas del medio.....	50
2.8.1.- Medida de la tasa fotosintética y la actividad CA externa a distintas salinidades	50
2.8.2.- Medida de la tasa fotosintética y la actividad CAext en medio con distinta carga iónica.....	51
2.9.- Tratamiento estadístico de los datos.....	54
3.- RESULTADOS.....	55
3.1.- Características generales de la zona de muestreo.....	57
3.2.- Actividad Anhidrasa Carbónica en <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i>	57
3.3.- Efecto de la adición de concentraciones crecientes de varios inhibidores sobre la fotosíntesis y la ACA.....	58
3.3.1.- Efecto de la adición de concentraciones crecientes de varios inhibidores sobre la fotosíntesis, como evolución de O ₂	59
3.3.1.1.-Efecto de la inhibición de la CA.....	59
3.3.1.2.- Efecto de la inhibición de los mecanismos de incorporación de HCO ₃ ⁻ en simporte con Na ⁺	60
3.3.1.3.-Efectos de la inhibición de los canales aniónicos.....	60
3.3.1.4.-Efecto de la inhibición de la bomba de H ⁺ -ATPasa tipo P.....	60
3.3.2.- Efecto de la adición de concentraciones crecientes de varios inhibidores sobre la actividad anhidrasa carbónica externa (ACAext)	63
3.3.2.1.- Efecto de los inhibidores de la ACAs.....	63
3.3.2.2.- Efecto del inhibidor de la incorporación de HCO ₃ ⁻ en simporte con Na ⁺	63
3.3.2.3.- Efecto del inhibidor de los canales aniónicos.....	64
3.3.2.4.-Efecto del inhibidor de la bomba de H ⁺ -ATPasa.....	64
3.3.3.- Efecto de los inhibidores sobre la actividad ACAtotal	67
3.3.4.- Efecto de los inhibidores sobre la tasa de fotosíntesis como intercambio de Ci.....	68
3.4.- Inorganic Carbon Uptake	70
3.4.1.- P-C curves	70
3.4.2.- pH and alkalinity	71
3.4.3.- pH compensation point calculated from pH-drift experiments	71
3.4.3.1.- Photosynthetic quotient (PQ).....	74
3.4.3.2.- Changes in Ci species concentration along the pH-drift experiment	74
3.4.4.- CO ₂ -drift experiments	77
3.4.5.- Ci uptake rate in emersion.....	78
3.4.6.- Carbon Isotopic Discrimination	78
3.5.- Efecto de los inhibidores de transporte de HCO ₃ ⁻ sobre la concentración y actividad de la enzima Rubisco	79
3.5.1.- Variación en la concentración de la enzima Rubisco.....	79

3.5.2.- Variación en la actividad de la enzima Rubisco.....	80
3.6.- Respuesta fotosintética a la salinidad.....	82
3.6.1.- Efecto de distintas salinidades y osmolaridades sobre la tasa fotosintética expresada como evolución de O ₂	82
3.6.2.- Efecto de distintas salinidades y osmolaridades sobre la ACAext.....	83
3.6.3.- Efecto de los iones Na ⁺ y/o Cl ⁻ sobre la tasa de fotosíntesis y de respiración como intercambio de O ₂	84
3.6.4.- Efecto del ión Na ⁺ y/o Cl ⁻ sobre la tasa de fotosíntesis y de respiración como intercambio de Ci.....	86
3.6.5.- Efecto de Na ⁺ y/o Cl ⁻ sobre la ACAext.....	87
4.- DISCUSIÓN.....	89
4.1.- Origen de este estudio y determinación de los canales de incorporación de Ci... 91	91
4.2.- Forma de Ci utilizada por <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i>	98
4.3.- Importancia de las anhidrasas carbónicas externa e interna.....	106
4.4.- Incorporación de Ci desde el punto de vista ecológico	109
4.5.- ¿Están relacionados la actividad Rubisco y los mecanismos de incorporación de Ci?.....	110
4.6.- Influencia de la salinidad y osmolaridad en la incorporación de Ci	113
4.7.- Epílogo	117
5.- CONCLUSIONES.....	119
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	123
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	145
ANEXO I: Summary	149
CONCLUSIONS	164
ANEXO II: Compendio de publicaciones	165

1. - Introducción

1.1.- Antecedentes

Los ecosistemas del estuario del río Palmones, han sido objeto de numerosos estudios por parte del Grupo de Ecofisiología de los Sistemas Acuáticos de la Universidad de Málaga desde finales de los años 80, con el fin de tener una visión integrada del funcionamiento de los mismos (Clavero et al. 1997a, 1999a; Izquierdo 2001), de la dinámica del fósforo del sedimento y su influencia en la eutrofización del ecosistema (Clavero et al. 1992; 1997b, 1999b; Avilés et al. 2000), el ecosistema fluvial y su influencia en el estuario (Avilés 2002), el papel de la marisma como fuente de materia orgánica y su influencia sobre las características del estuario (Palomo et al. 2004; Arrojo et al. 2009) o la contribución del estuario a la emisión de gases de efecto invernadero (Moreno 2008). También se han caracterizado aspectos faunísticos desde un punto de vista dinámico (López-Figueroa y Niell 1987; Guevara y Niell 1990, Clavero et al. 1991), así como la ecofisiología de algunas especies vegetales que son o fueron clave en la dinámica de dichos ecosistemas (Pérez-Llorens y Niell 1993; Pérez-Llorens et al. 1996, Hernández et al. 1997, Mercado et al. 2003; Palomo 2004; Palomo et al. 2004; Palomo y Niell 2009).

Además, en los últimos años, los esfuerzos se han enfocado hacia el estudio del estuario como fuente y sumidero de CO₂ (Palomo 2004; Moreno 2008). Algunos autores como Mercado y Niell (1999, 2000) comenzaron a estudiar los mecanismos de incorporación de carbono inorgánico (Ci) presentes en *B. scorpioides*, una de las rodófitas características del el intermareal de dicho estuario. Más adelante, Carrasco et al. (2008) realizaron la caracterización morfológica y ecofisiológica de los tapetes microbianos localizados en la marisma, incluyendo el estudio de sus mecanismos de incorporación de Ci mediante el uso de inhibidores específicos de las distintas vías de entrada de HCO₃⁻. Estos trabajos entre otros, fueron fundamentales en el estudio de los posibles mecanismos concentradores de carbono (CCMs) de las rodófitas presentes en el estuario.

1.2.- Incorporación y asimilación de Ci en el medio acuático

La única fuente de Ci para la fotosíntesis en plantas terrestres es el CO₂ atmosférico, sin embargo, los organismos fotosintéticos que viven en el medio marino,

Introducción

por las características físico-químicas de éste, disponen de bajas concentraciones de CO_2 que dificultarían su existencia. En el agua de mar natural, en sus condiciones de pH (entre 8.1 y 8.2), a 15°C , a una salinidad de 35 y en equilibrio con el aire, sólo el 1% del Ci está en forma de CO_2 (Park 1969; Axelsson et al. 1995; Sültemeyer y Rinast 1996; Falkowski y Raven 1997; Gutknecht et al. 1997; Andría et al. 1999b), lo que corresponde a 0.014 mol m^{-3} (Riley y Chester 1971). Otra dificultad para disponer de Ci procedente del agua es que, aunque la concentración de CO_2 en agua es similar a la del aire, la tasa de difusión en ella es 10000 veces menor (Lobban y Harrison 1997), por lo que la concentración de CO_2 en agua es, en proporción, mucho menor que las concentraciones de HCO_3^- (2 mol m^{-3}) y CO_3^{2-} (0.2 mol m^{-3}) en las mismas condiciones. El HCO_3^- es potencialmente incorporable pero no se puede asimilar si no se transforma previamente a CO_2 .

A priori, la menor concentración de CO_2 que de HCO_3^- y su baja difusión suponen una seria dificultad para la adquisición de Ci a través de la membrana celular de los organismos fotosintéticos acuáticos. Dentro de este grupo de organismos cabe destacar las algas cuya fotosíntesis supone alrededor del 50% de la producción primaria marina (Behrenfeld et al. 2001). Las algas y las cianobacterias, en último término incorporan el Ci al ciclo de Calvin por el que se producen azúcares. El ciclo de Calvin tiene lugar en el estroma del cloroplasto, en el que la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39), fija el CO_2 directamente. La Rubisco tiene una baja afinidad por la molécula de CO_2 (K_m para el CO_2 en macroalgas rojas: $30\text{-}85 \mu\text{M}$) según Beer et al. (1994), y una baja especificidad puesto que presenta una ambigua actividad como carboxilasa y oxigenasa a la vez, pues hay una competencia activa entre el CO_2 y el O_2 como sustratos por su sitio activo.

Por otro lado, la difusión de HCO_3^- , la especie más abundante de Ci en el agua de mar, a través de membranas biológicas es muy baja (Gutknecht et al. 1977; Sültemeyer y Rinast 1996), y la única forma de Ci que sirve como sustrato a la Rubisco es el CO_2 (Raven 1991). Estas circunstancias de limitación de CO_2 disuelto pueden conducir al desarrollo de mecanismos que subsanen la restricción del mismo, los CCMs, presentes como ya se ha demostrado en cianobacterias, muchas algas y plantas vasculares acuáticas (Moroney et al. 2001; Giordano et al. 2005). La concentración de Ci en el interior celular se manifiesta por la existencia de estructuras (carboxisomas y pirenooides), y por actividades enzimáticas muy específicas que catalizan la reacción de

deshidratación del HCO_3^- como las anhidrasas carbónicas (CAs). Existen asimismo, aunque no de modo general, diversos transportadores de membrana para la incorporación de CO_2 o HCO_3^- que aumentan la concentración de Ci en el interior celular (Badger y Price 1994).

1.3.- Mecanismos de incorporación y concentración de Ci en organismos acuáticos fotosintéticos

El CO_2 puede entrar a las células de los organismos acuáticos fotosintéticos a través de la membrana proteo-lipídica por procesos de difusión simple (Gutknecht et al. 1977). Dado que la concentración de CO_2 a pHs altos desciende drásticamente, además de los procesos de difusión, pueden existir transportadores de bicarbonato que actúen en medio básico, donde la forma de Ci predominante es el bicarbonato y, por lo tanto, pueda usarse como fuente alternativa de Ci al CO_2 .

A pesar de que la afinidad de la Rubisco por el CO_2 es baja en relación con la concentración de CO_2 ambiental (375 ppm en aire y 10-12 μM CO_2 a 25°C en agua) se consiguen altas tasas de fotosíntesis gracias a mecanismos que aumentan la concentración de CO_2 intracelular (Kaplan y Reinhold 1999). Según estos autores, el aumento de la concentración interna de CO_2 tiene distintos significados biológicos: a) activar la Rubisco (Schwarz et al. 1995); b) compensar la relativamente baja afinidad de la enzima por el CO_2 y por consiguiente, disminuir la inhibición de la fotosíntesis por competencia con el O_2 , reduciendo así la fotorrespiración y el punto de compensación para el CO_2 (Johnston y Raven 1987); c) intervenir mediante los flujos masivos transmembranales de Ci en la disipación del exceso de energía lumínica y en el mantenimiento del pH interno (Tchernov et al. 1997).

La captura y uso eficiente del CO_2 por la Rubisco en la fotosíntesis, así como la respuesta adaptativa de distintas especies a las limitaciones ambientales en cuanto al uso del Ci, se han estudiado ampliamente por muchos autores en cianobacterias (Kaplan et al. 1991; Sültemeyer 1998; Badger et al. 2002; Badger 2003; Badger et al. 2006; Carrasco et al. 2008) y en microalgas (Moroney et al. 1985; Karlsson 1995; Eriksson et al. 1996; Colman et al. 2002). Dichos estudios se han basado tanto en la identificación de distintos transportadores de Ci que acumulan HCO_3^- en el interior celular, como en la

Introducción

caracterización y localización de orgánulos específicos que actúan como CCMs: como los carboxisomas en cianobacterias (Kaplan et al. 1991; Kaplan y Reinhold 1999; Badger 2003; Badger et al. 2006) y el pirenoide de algunas microalgas (Badger et al. 1998; Kaplan y Reinhold 1999; Morita et al. 1999), siendo *Chlamydomonas reinhardtii* una de las pocas especies bien estudiada en este aspecto (Moroney et al. 1987; Sültemeyer y Rinast 1996; Morita et al. 1999; Raven 2001; Meyer y Griffiths 2013).

1.3.1.- La enzima anhidrasa carbónica

En el marco de los CCMs, y considerando que el HCO_3^- es la forma de Ci predominante en el agua de mar, cabe destacar la actividad de la enzima anhidrasa carbónica (CA, carbonato deshidratasa; EC 4.2.1.1), encargada de catalizar la transformación del HCO_3^- del agua de mar en CO_2 de forma reversible (Khalifah 1971; Palmqvist et al. 1990; Haglund et al. 1992a; Haglund et al. 1992b; Björk et al. 1992), permitiendo la entrada de HCO_3^- a la célula, incrementando así la concentración de Ci en el interior celular. Esta transformación de HCO_3^- en CO_2 se lleva a cabo según la ecuación:



La reacción catalizada mediante la CA es el mecanismo más común de incorporación de Ci en forma de HCO_3^- y también el más estudiado. Las distintas CAs se han localizado y caracterizado tradicionalmente en microalgas y cianobacterias (e.g. Dionisio et al. 1989; Nara et al. 1989; Bedu et al. 1992; Badger y Price 1994; Berman-Frank et al. 1995; Palmqvist et al. 1995; Iglesias-Rodríguez et al. 1998; Karlsson et al. 1998; Satoh et al. 2001; Harada y Matsuda 2005; Long et al. 2011; Moroney et al. 2011; Blanco-Rivero et al. 2012; Sinetova et al. 2012; Meyer y Griffiths 2013). No obstante, diversos autores también han identificado dicha actividad enzimática en multitud de especies de macroalgas (Bowes 1969; Giordano y Maberly 1989; Maberly 1990; Haglund et al. 1992a; Johnston et al. 1992; Mercado et al. 1998; Andría et al. 2000). A la actividad CA en macroalgas se hará referencia más adelante con mayor profundidad.

Hasta la fecha, existen cinco familias de CAs conocidas en la naturaleza, α , β , γ , δ , ϵ , (Cox et al. 2000; Tripp et al. 2001; So et al. 2004). En algas eucarióticas, se han descrito al menos dos localizaciones diferentes de la actividad de la anhidrasa carbónica: anhidrasa carbónica externa (CAext) y anhidrasa carbónica interna (CAint) (Surif y Raven 1990; Haglund et al. 1992a; Björk et al. 1993).

La CAext se localiza en la membrana plasmática de las células. Las dos funciones fundamentales propuestas para la CAext en macroalgas son: (a) por un lado, la conversión de HCO_3^- a CO_2 , de forma que este último pueda penetrar en las células a través de la membrana plasmática (Haglund et al. 1992b) por difusión o transporte y (b) la rápida conversión de CO_2 atmosférico en HCO_3^- en la película de agua que queda sobre las algas en emersión (Bidwell y McLachlan 1985; Badger 1987; Giordano y Maberly 1989), de forma que el HCO_3^- penetre mediante transporte activo o pasivo a través de la membrana plasmática (Badger 1987; Surif y Raven 1990; Axelsson et al. 1995). No son demasiados los estudios sobre la distribución de la CAext en macroalgas. Tanto Surif y Raven (1990) como Maberly (1990) hipotetizaron que la capacidad para usar HCO_3^- parecía estar relacionada con el ambiente en el que crecían las macroalgas, de forma que las que habitaban el intermareal superior, y por lo tanto, estaban más expuestas al aire, tenían una mayor afinidad por el HCO_3^- (Maberly, 1990), y por consiguiente, una mayor actividad CAext (Surif y Raven, 1990). Otros autores como Mercado et al. (1997b, 1998) y Giordano y Maberly (1989) mostraron que la presencia de la actividad CA en macroalgas del intermareal está ampliamente extendida, aunque dicha actividad no se correlaciona con la afinidad por el HCO_3^- en el agua de mar, por lo tanto, en este sentido, la presencia de CAext no sería un buen indicador del uso eficiente de HCO_3^- (Mercado et al. 1998). Todo esto demuestra que el significado de la actividad CAext no está comprendido completamente o se interpreta de modo diverso desde un punto de vista ecológico.

En cuanto a la CAint, su presencia en microalgas y cianobacterias ha sido ampliamente referenciada (e.g. Moroney et al. 1987; Price y Badger 1989; Sültemeyer et al. 1990; Ramazanov y Cárdenas 1992; Badger y Price 1994; Badger et al. 1998, 2002, 2006; Sültemeyer 1998; Badger 2003), así como en macroalgas (e.g. Mercado et al. 1997b; Mercado y Niell 1999; Andría et al. 2000; Zou et al. 2004). Badger y Price (1994) propusieron distintas funciones para la CAint según su posición en el interior celular que en muchas ocasiones no pasan de ser hipótesis. Por un lado, la CAint

Introducción

localizada en el citosol podría facilitar la difusión de Ci hacia el cloroplasto o catalizar la conversión de HCO_3^- a CO_2 si el HCO_3^- se hubiera acumulado de forma activa en el citosol por transporte transmembranal. Por su parte, la CAint situada en el cloroplasto facilitaría la difusión de CO_2 hacia el sitio activo de la Rubisco, elevando así su concentración en las inmediaciones de la enzima carboxilante.

1.3.2.- Mecanismos de incorporación de Ci alternativos a las CAs

Además de las enzimas CAs, pueden existir otras vías o canales de transporte activo (con consumo de energía) de HCO_3^- , que facilitan la incorporación de Ci a las células. Las posibles vías de incorporación de HCO_3^- , tanto facilitado por CAs como mediante otros mecanismos de incorporación de Ci , fueron descritas para *Synechococcus* PCC7002, como modelo general de cianobacterias marinas, por Badger y Price (2003) mediante el esquema de la figura 1.

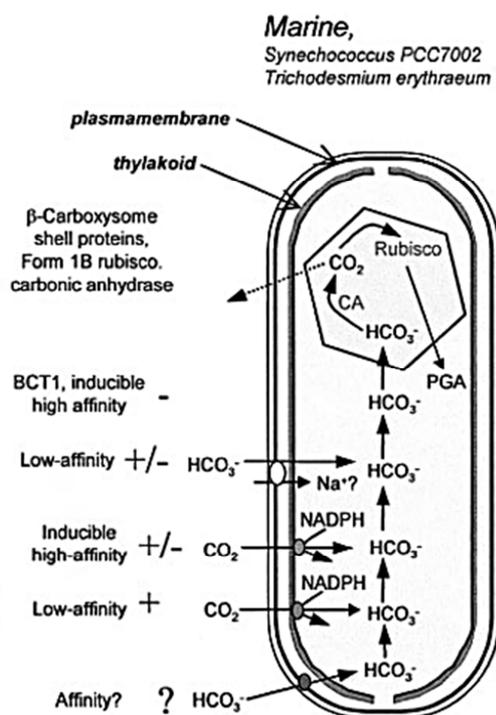


Figura 1. Modelo general de los CCM en cianobacterias. En la figura se muestra la Rubisco contenida en los carboxisomas, así como la anhidrasa carbónica carboxisómica y asociado a este sistema, una resistencia a la pérdida de CO_2 como flujo difusivo (Badger y Price 2003).

Posteriormente, Giordano et al. (2005) esquematizaron las posibles entradas de Ci en algas eucariotas según la Figura 2. Este modelo resume las posibilidades de que el Ci sea incorporado a través de la membrana plasmática y plastidial, así como mediante un posible mecanismo tipo C₄. El CO₂ cruza la membrana por difusión mientras que el transporte activo puede darse tanto para el CO₂ como para el HCO₃⁻.

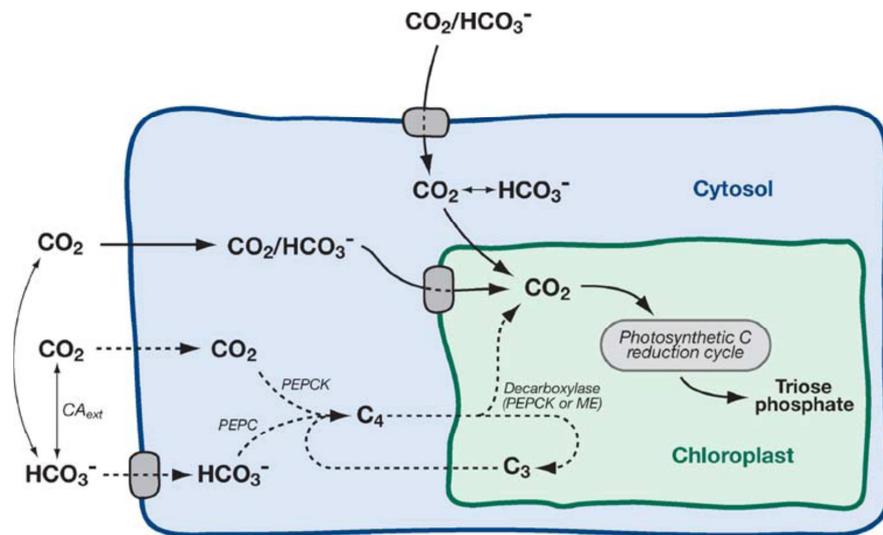


Figura 2. Esquema del transporte de carbono inorgánico y la acumulación de CO₂ en células de algas eucariotas. (Tomado de Giordano et al. 2005).

Además de la deshidratación de HCO₃⁻ catalizada por la presencia de CAs en la membrana celular y dependiente de las regiones ácidas creadas por la extrusión de H⁺ (Lucas 1983) se han descrito otros mecanismos de incorporación de Ci al interior celular. Un ejemplo es el transporte activo de CO₂ que propusieron Sültemeyer et al. (1989). No obstante, esta vía parece improbable, ya que la membrana lipídica es muy permeable al CO₂ (Kaplan y Reinhold 1999), con lo que no necesitaría de un transporte con gasto energético y el Ci en forma de CO₂ entraría principalmente por difusión a través de la membrana, ésta sin embargo no es más que una de las hipótesis sin demostrar que se orientan a enfocar futuras investigaciones. Otras vías posibles de entrada de Ci serían los canales transportadores de HCO₃⁻ como son: (a) transportadores de HCO₃⁻ dependientes de ATPasa (Raven y Lucas 1985); (b) los transportadores en simporte de H⁺/ HCO₃⁻ (Lucas 1983) o Na⁺/HCO₃⁻ (Espie y Kyasamy 1994); (c)

transportadores en antiporte de $\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$ o proteínas de intercambio aniónico (Lucas 1983).

1.4.- Los mecanismos de incorporación de HCO_3^- en macroalgas

Los mecanismos de incorporación de HCO_3^- mediados por transportadores han sido menos detallados en macroalgas (Smith y Bidwell 1989; Granbom y Pedersén 1999; Axelsson et al. 1999; Andría et al. 2001; Snoeijs et al. 2002; Ray et al. 2003; Klenell et al. 2004; Moulin et al. 2011) que los mecanismos de incorporación de CO_2 y HCO_3^- por mediación de las CAs (Bowes 1969; Haglund et al. 1992a, b; Israel y Beer 1992; Badger y Price 1994; Mercado et al. 1998; Elzenga et al. 2000). La cuestión es diferenciar la fuente de Ci predominante para las distintas especies de macroalgas, es decir, si usan solamente CO_2 tomado por difusión, o HCO_3^- que luego transforman a CO_2 , o bien, incorporan directamente HCO_3^- mediante transporte activo.

Maberly (1990) solucionó este problema mediante medidas del punto de compensación para el pH (PC_{pH}) estableciendo un umbral por debajo del cual se encontraban aquellas macroalgas que utilizaban CO_2 como única fuente de Ci. Por otra parte, según Mercado et al. (1998), las tasas de evolución de O_2 encontradas en otras especies de macroalgas son mayores que las tasas máximas que teóricamente podría explicar la formación de CO_2 en el medio por deshidratación espontánea de HCO_3^- , lo que sugiere que estas macroalgas pueden usar HCO_3^- como fuente de Ci (Lignell y Pedersén 1989; Maberly 1990; Surif y Raven 1989). Como posibles vías de entrada de este HCO_3^- se proponen enzimas como las CAs, canales aniónicos de membrana (Drechsler y Beer 1991; Drechsler et al. 1993; Larsson et al. 1997), transporte de HCO_3^- dependientes de Na^+ (Espie y Kandasamy 1994) y bomba de H^+ asociada a ATPasa (Raven y Lucas 1985).

La participación de las distintas enzimas CAs y los canales de incorporación de Ci en el uso de HCO_3^- durante la fotosíntesis se ha estudiado tradicionalmente mediante el uso de inhibidores específicos de las diferentes vías de incorporación de Ci (Tabla 1). La presencia de la CAext se ha comprobado de manera independiente mediante dos inhibidores: DBS (sulfonamida unida a dextrano), que no penetra la membrana plasmática de las células (Moroney et al 1985) y AZ (acetazolamida), que es capaz de

atravesar la membrana muy lentamente, por lo que se asume que ninguno de ellos penetra dentro de las células en la duración de experimentos cortos (Gehl et al. 1990, Sültemeyer et al. 1990; Williams y Turpin 1987). En este sentido, el porcentaje de inhibición de la fotosíntesis por DBS/AZ ha sido propuesto como una indicación del requerimiento de la CAext para el uso eficiente del Ci (Haglund et al. 1992a, b; Björk et al. 1992; Axelsson et al. 1995). Por otro lado, la presencia de CAint, se ha estudiado mediante la adición de EZ (Sültemeyer et al. 1993), un inhibidor de la anhidrasa carbónica total (CAtotal), incluyendo CAint y CAext, que penetra en el interior de la célula.

Tabla 1. Relación de inhibidores específicos de los canales de incorporación de Ci en células de algas eucariotas y diana de dichos inhibidores.

Inhibidor	Diana
AZ (Acetazolamida) DBS (Sulfonamida unida a dextrano)	Anhidrasa Carbónica externa (CAext)
EZ (6-etoxizolamida)	Anhidrasa Carbónica total (CAint y CAext)
DIDS (Ácido 4,4'- diisotiocianatostilbenato-2,2' disulfónico)	Canales aniónicos de membrana
MON (Sal sódica monensina)	Transporte de HCO_3^- en simporte con Na^+
VAN (Ortovanadato sódico)	Bomba de H^+ asociada a ATPasa tipo P

La presencia de otras vías de incorporación de Ci se ha evidenciado en la literatura con otros inhibidores supuestamente específicos: (a) Ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2' disulfónico (DIDS), que actúa como inhibidor de los canales aniónicos proteicos de la membrana plasmática (Dreschsler et al. 1993; Falke y Chan 1986); (b) Monensina (MON), ionóforo que destruye el gradiente de Na^+ entre la

célula y el medio (Pressman 1976; Pressman y Fahim 1982), con lo que se imposibilita dicho transporte y su efecto demuestra la existencia de transportadores de HCO_3^- en simporte con Na^+ ; (c) Ortovanadato sódico (VAN), que inhibe la bomba de H^+ -ATPasa tipo P localizada en la membrana plasmática (Gilmour et al. 1985; Karlsson et al. 1994).

La presencia de canales de incorporación activa (con consumo de energía) de Ci ya ha sido probada en algunas macroalgas mediante el uso de estos inhibidores específicos.

La bomba de H^+ -ATPasa se ha encontrado en varias macroalgas: clorófitas como *Ulva sp* (Larsson et al. 1997) y *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (Choo et al. 2002); heterocontófitas como *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. y *Saccharina latissima* (L.) Lane (Klenell et al. 2004); rodófitas como *Coccotylus truncatus* (Pall.) M. J. Wynne y J. M. Heine (Snoeijs et al. 2002) y caráceas como *Chara corallina* Klein ex. Willdenow. R. D. W. (Mimura et al. 1993) y *Chara tomentosa* L. (Ray et al. 2003).

En algunas especies de macroalgas verdes como *Ulva sp*, la fotosíntesis realizada a pH alto se ha relacionado con la asimilación de Ci por incorporación directa de HCO_3^- a través canales aniónicos de la membrana plasmática (Larsson et al. 1997).

En cuanto al transporte de HCO_3^- en simporte con Na^+ , a pesar de que existen estudios sobre su presencia en microorganismos (Espie y Kandasamy 1994; Miller et al. 1984; Shibata et al. 2002a, b), no ha sido aún descrita en macroalgas.

1.5.- Los mecanismos de incorporación de carbono en rodófitas de estuario

Si ya se ha señalado anteriormente el menor número de estudios sobre los mecanismos de incorporación de carbono en macroalgas, los trabajos relacionados en rodófitas son aún más escasos. Uno de los géneros más estudiados en este sentido ha sido *Gracilaria* (e.g. DeBusk y Ryther 1984; Lignen y Pedersén 1989; Haglund y Pedersen 1992; Haglund et al. 1992a, b; Israel y Beer 1992; García-Sánchez et al. 1993, 1994; Andría et al. 1999a, b, 2001; Mercado et al. 2000; Zou et al. 2004). Por otra parte, los ecosistemas estuáricos no han recibido mucha atención y existen pocas referencias relacionadas con los mecanismos de incorporación de Ci en macroalgas de estuario (Mercado et al. 1998; Mercado y Niell 1999, 2000; Andría et al. 2001; Mercado et al. 2009). El interés de los estuarios radica en sus condiciones fluctuantes en términos de

temperatura, turbulencia, irradiancia, salinidad, concentración de nutrientes, pH, tiempo de emersión durante el ciclo mareal y disponibilidad de Ci. El estuario del río Palmones, tomado como modelo de estudio (Mercado et al. 1998, 2009; Mercado y Niell 1999, 2000), es un sistema intermareal del Sur de España sujeto a fluctuaciones periódicas de las variables ambientales (Niell 1979), principalmente relacionadas con elevadas temperaturas y radiación, lo que puede inducir diferentes comportamientos fisiológicos de los organismos que habitan en él. Es importante también tener en cuenta que las especies de algas que crecen en el intermareal superior sufren largos periodos de desecación durante los ciclos de marea debido a su elevada posición en el mismo (Mercado y Niell 2000), con lo que su fuente de carbono en ese tiempo sería solamente el CO₂ del aire o el bicarbonato que queda en la capa de agua de imbibición durante la marea baja. Además, en algunas zonas del estuario, la influencia del agua del río supone una dilución de las sales e iones del agua de mar, por lo tanto, el rango de salinidades y los cambios de concentración de electrolitos que deben soportar las algas del intermareal estuárico es muy amplio (Clavero et al. 1997a).

Las dos especies de rodofíceas tomadas como modelo en este estudio, *Bostrychia scorpioides* (Hudson) Montagne y *Catenella caespitosa* (Withering) L. M. Irvine, crecen sobre los tallos leñosos de las plantas vasculares de marisma como son *Sarcocornia perennis* (Mill.) A. J. Scott y *Atriplex (Halimione) portulacoides* (L.) Aellen, formando una maraña de vegetación. Al encontrarse en una estrecha franja del intermareal, estas dos macroalgas están expuestas durante varias horas al día a la desecación y por tanto a amplios rangos de salinidad y cambios en las concentraciones iónicas del medio.

La zonación de estas dos especies de rodofíceas en el intermareal del estuario del río Palmones ocupa una franja de sólo 50 cm, donde se ha identificado una clara segregación entre ellas (Sánchez de Pedro et al. 2013): *B. scorpioides* se sitúa en la zona más alta, donde la irradiancia incidente es mayor, mientras que *C. caespitosa* se localiza en la zona más baja, con una menor irradiancia. Ambas especies coexisten en una zona intermedia. Esta distinta posición en el intermareal condiciona el efecto que las mareas tienen sobre dichas especies y, por consiguiente, el tiempo que permanecen en emersión, ya que *B. scorpioides*, al igual que *C. caespitosa* aunque en menor medida, puede llegar a permanecer completamente seca y cubierta de precipitados de cloruro sódico (NaCl) durante horas. Durante el proceso de desecación, se pueden producir

cambios en las propiedades físico-químicas del agua de mar que rodea a las algas como la temperatura, la salinidad y el pH, lo que puede influir en la disponibilidad del Ci. Por todo esto, es importante tener en cuenta la zonación de ambas especies en el intermareal a la hora de comprender su actividad fotosintética, así como las distintas adaptaciones o mecanismos desarrollados en relación con la incorporación de Ci del medio acuático.

En relación con estos mecanismos de incorporación de Ci, estudios previos dejan patente la existencia de CAext y CAint en *B. scorpioides* (Mercado y Niell 1999, 2000), mientras que, hasta la fecha, no se conocen trabajos que estudien la actividad CA en *C. caespitosa*.

Como ya se ha comentado anteriormente, varios autores (Giordano y Maberly 1989; Mercado et al. 1998), no encontraron una clara relación entre la actividad CAext y la capacidad de algunas macroalgas para utilizar HCO_3^- . Esto, unido a los resultados de Mercado y Niell (1999, 2000) en los que no se llega a concretar la función de esta enzima, presentan la posibilidad de que existan otras vías de incorporación de Ci en esta especie. Además, si tenemos en cuenta que estas dos especies estuáricas viven en ambientes con una gran variabilidad, la presencia de otros canales de incorporación de Ci alternativos a la actividad de las CAs, especialmente aquéllos dependientes de iones, podría permitir una mayor adaptación ante un ambiente tan fluctuante.

En este sentido, y a pesar de que se han estudiado diversos aspectos ecofisiológicos de *Bostrychia* sp. (e.g. Dawes y McIntosh 1981; Karsten y Kirst 1989a, b; Karsten et al. 1993, 1994a, b; Peña et al. 1999; Zuccarello et al. 2006), y de *Catenella* sp. (e.g. Munda y Gubensek 1986; Zablackis et al. 1993; Karsten et al. 1996; Narasimha Rao et al. 2008), y de ambas especies (Sánchez de Pedro et al. 2013, 2014), no se han publicado datos sobre la detección de los mencionados canales de incorporación de Ci en ninguno de estos dos géneros, más allá de las CAs en *B. scorpioides*. Por otro lado, la relación de los mecanismos de incorporación de Ci con la enzima Rubisco también es un tema afrontado por primera vez en este trabajo. Autores como Makino et al. (1983), Porter y Grodzinski (1984), Peet et al. (1986) y Majeau y Coleman (1994) postularon, basándose en estudios previos (von Caemmerer y Farquhar 1981, Makino et al. 1983), que existía una relación constante entre la expresión de la enzima CA y la Rubisco en guisantes y sugirieron que probablemente esta misma relación se podría dar en otras plantas C_3 . Aparentemente los cambios en el contenido en Rubisco se han estudiado

menos que la actividad CA en microalgas. Por ejemplo, Beer et al. (1990) e Israel y Hophy (2002) dieron datos de concentraciones de Rubisco y su actividad en algunas macroalgas. En las rodófitas estudiadas en el presente trabajo se ha especulado sobre la posible covariación de los mecanismos de incorporación de C_i y la concentración y actividad de la enzima Rubisco.

1.6.- Cambios en la osmolaridad y salinidad como variables reguladoras de los mecanismos de incorporación de Carbono en macroalgas de estuario

En la bibliografía podemos encontrar diversos estudios que tratan sobre la aclimatación de distintas especies de macroalgas a la salinidad desde puntos de vista muy diferentes. Algunos autores se centran en observar las diferencias existentes en un gradiente horizontal de salinidad en el medio natural (Kentula y DeWitt 2003). Otros como Gillham (1957) describen la zonación de las especies de plantas de marisma y macroalgas estuáricas en relación con el gradiente de salinidad. Por otro lado, trabajos como los de Martins et al. (1999) o McAvoy y Klug (2005) muestran el crecimiento de *Ulva intestinalis* L. en relación con el rango de salinidad, así como los efectos positivos y negativos que tiene el agua dulce sobre la distribución y abundancia de dicha especie debido a las variaciones en la salinidad y los nutrientes que supone su entrada al estuario. El estudio de la influencia de la salinidad se aborda en algunos trabajos desde el punto de vista antropocéntrico, puesto que las macroalgas se pueden ver afectadas negativamente por la variabilidad en las condiciones derivadas de las descargas de agua dulce antropogénicas (Brook 1981; Montague y Ley 1993). Biber e Irlandi (2006) demuestran cómo afecta el gradiente de salinidad impuesto por la actividad antropogénica a la composición, distribución, abundancia y crecimiento de algunas macroalgas. Por otro lado, muchos de los estudios relacionados con el efecto de la salinidad en rodófitas tienen un enfoque comercial, tratando de determinar las condiciones óptimas de distintas variables, entre ellas la salinidad, para el cultivo intensivo de especies como *Gracilaria* (Ekman et al. 1991; Dawes et al. 1999; Israel et al. 1999), *Eucheuma* o *Hypnea* (Dawes 1998), entre otras, para que la producción de agar (e.g. Macler 1988; Israel et al. 1999) o carragenatos (p. ej. Hayashi et al. 2010; Reis et al. 2011) sea la más rentable. Otros, relacionan los cambios en la salinidad con el crecimiento, la abundancia o las concentraciones de polialcoholes intracelulares,

como el D-sorbitol o el D-dulcitol, presentes en *Bostrychia* (Haas y Hill 1932; Karsten et al. 1990, 1994b, 1996). En esta memoria, se ha determinado el efecto de la salinidad y los cambios iónicos sobre la incorporación de Ci en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*.

Por otro lado, los estuarios soportan variaciones en las concentraciones iónicas de sus aguas por la influencia del agua de mar mezclada con agua del río. Estas variaciones afectan fundamentalmente a las concentraciones de Na^+ y al Cl^- , iones mayoritarios en el agua de mar. Si además tenemos en cuenta la posible presencia de canales de transporte de HCO_3^- en simporte con Na^+ , podemos hipotetizar que la presencia o ausencia de Na^+ en el medio puede afectar a los mecanismos de incorporación de Ci. Estos mecanismos no se han estudiado hasta la fecha en relación con la salinidad/osmolaridad a la que están sometidas *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, lo que aporta otro aspecto más de innovación al presente trabajo.

1.7.- Justificación del trabajo y objetivos

Existen estudios precursores del presente trabajo sobre los mecanismos de incorporación de Ci en macroalgas en los ecosistemas intermareales de la provincia de Cádiz. En concreto, el estudio de Mercado et al. (1998) se basa en la incorporación de Ci en forma de HCO_3^- a través de la enzima CAext en distintas especies de algas. Posteriormente, Mercado y Niell (1999, 2000) se centran en la actividad CA en *B. scorpioides*, presente en el intermareal del estuario del río Palmones. Más adelante, Carrasco (2006) y Carrasco et al. (2008), postulan que en un medio tan iónico, con dominancia de Na^+ , es posible la existencia de otras vías de incorporación de Ci, se identificaron distintos canales de incorporación de Ci en los tapetes microbianos de las lagunas presentes en la marisma de dicho estuario, donde la especie predominante es *Microcoleus chthonoplastes* Thuret. Por último, según observaciones puntuales sobre estas especies, se sospechaba que el bloqueo de la CA potenciaría la actividad de los canales alternativos y viceversa. Estos estudios son los antecedentes en los que se fundamenta el presente trabajo.

Teniendo en cuenta los estudios y observaciones mencionados y la gran variabilidad del estuario del río Palmones, sus características y localización, se planteó profundizar, desde el punto de vista ecofisiológico, en los mecanismos de incorporación

de *Ci* en *B. scorpioides*, y compararla con *C. caespitosa*, las cuales presentan una clara zonación en una estrecha franja, y son las dos rodofíceas más abundantes en el estuario. La originalidad de este estudio radica en la escasez de trabajos publicados en relación con los CCMs en dichas macroalgas, cuyas características ecofisiológicas están marcadas por la variabilidad de las condiciones ambientales de su hábitat.

La caracterización de la actividad de la enzima Rubisco, también es algo poco frecuente y que está recogido en este trabajo, para tener una visión completa de cada uno de los principales pasos del *Ci* en el proceso fotosintético en estas macroalgas.

En relación con los posibles canales de incorporación de *Ci*, cabría esperar que en estas especies, por habitar en un sistema tan variable en cuanto a las concentraciones iónicas, el Na^+ tuviera influencia de la incorporación de *Ci* y, por consiguiente, en la actividad fotosintética. Por eso, además de la existencia de canales de transporte de HCO_3^- en simporte con Na^+ , también se ha estudiado si la presencia o ausencia de este ión es importante para la función fotosintética y la incorporación de *Ci* en estas especies.

Es en este marco donde se plantean los siguientes objetivos:

- 1.- Comparar la actividad CA_{ext} y CA_{total} en *B. scorpioides* y en *C. caespitosa* y comprobar la existencia de otros canales involucrados en la incorporación de *Ci*.
- 2.- Definir cuál es la principal forma de *Ci* utilizadas por *B. scorpioides* y *C. caespitosa*.
- 3.- Cuantificar la cantidad y actividad de la Rubisco de estas especies y su concordancia con la actividad de las enzimas supuestamente involucradas en la incorporación de *Ci*.
- 4.- Evaluar el efecto de la osmolaridad/salinidad y presencia/ausencia de Na^+ en el medio sobre la fotosíntesis de estas macroalgas.

Introducción

Todo lo antedicho configura un objetivo general: profundizar, desde un punto de vista ecológico, en el estudio de la incorporación del Ci y su asimilación por la enzima Rubisco en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, así como comprobar si uno de los factores ambientales más fluctuantes del estuario, la concentración iónica, influye en la fotosíntesis de estas rodófitas.

2. -Material y Métodos

2.1.- Material biológico: *Bostrychia scorpioides* y *Catenella caespitosa*

Las especies de rodófitas intermareales utilizadas en los distintos experimentos fueron *Bostrychia scorpioides* (Hudson) Montagne y *Catenella caespitosa* (Withering) L. M. Irvine. La figura 3 muestra la morfología característica de ambas especies:

Bostrychia scorpioides es una rodófito que pertenece al orden de las Ceramiales, y a la familia Rhodomelaceae. Presenta frondes color púrpura oscuro, de 5-10 cm de longitud, formando entramados laxos donde se distinguen vástagos cladómicos principales que son cilíndricos, ligeramente aplanados dorsiventralmente. Tienen ramificación alterna subdicótoma en un mismo plano dispuesta a intervalos regulares terminadas en ápices, por lo general circinados, que poseen ramas finas que siguen el mismo patrón de ramificación. El talo está compuesto por un sifón central y entre 5 y 7 células pericentrales alargadas, rodeadas por una banda de pequeñas células corticales; las articulaciones del sifón central son de 4 a 5 veces tan largas como anchas. Los individuos gametofíticos, cuando están fértiles disponen de cistocarpos terminales en las ramas, urcinados con diferentes ostiolos y los tetrasporofitos presentan tetrasporangios tetraédricos, en una fila doble formando estiquidios fusiformes terminales.

Esta especie se encuentra en costas bajas sobre fondos lodosos, en marismas y acequias con agua salada cerca de la marca de pleamar, en estuarios y ríos, adherida o enredada en los tallos de plantas vasculares características de marisma. Se trata de una especie subcosmopolita, mayormente distribuida en la costa oeste de Europa, Sudáfrica, Sudamérica, en el Sur de Australia y Nueva Zelanda (Newton 1931).

Catenella caespitosa es una rodófito del orden de las Gigartinales, de la familia Caulacanthaceae. Se trata de una planta cespitosa de pequeño tamaño con frondes nacies de una masa de fibras reptantes, cilíndricas, en momentos aplastadas, de modo que pueden formar zonas lomentosas. La estructura interna presenta una red laxa de células medulares filamentosas extendidas longitudinalmente, rodeada por una periferia cortical con filamentos con terminaciones dicótomas, densamente compactados perpendiculares a la superficie. Sus cistocarpos son alargados, sésiles, prominentes sobre las ramas. Los anteridios se disponen en ramitas protuberantes, formadas de células superficiales; es una especie terminal con tetrasporofito independiente (Newton 1931).

Material y Métodos

Es una especie subcosmopolita, ampliamente distribuida en los mares templados y cálidos (Dixon e Irvine 1977; Dawes y Mathieson 2008). Aparece frecuentemente en zonas protegidas y umbrías (Batelli 2004), tanto en el intermareal superior de estuarios como en zonas altas del intermareal rocoso de las costas atlánticas (Niell 1978; Fernández y Niell 1982; Silva et al. 2010).

Su distribución geográfica es más amplia que la de *B. scorpioides*, encontrándose en otras regiones como el Mediterráneo o el mar Adriático (Batelli 2004).

En la Península ibérica encontramos citas de la comunidad de *Bostrychia scorpioides*-*Catenella caespitosa* en el intermareal rocoso de las costas cantábricas (Fernández y Niell 1982; Sánchez et al. 1996; Gorostiaga et al. 2004; Martínez-Gil 2007) y en el estuario del río Tajo (Henriques 2009).

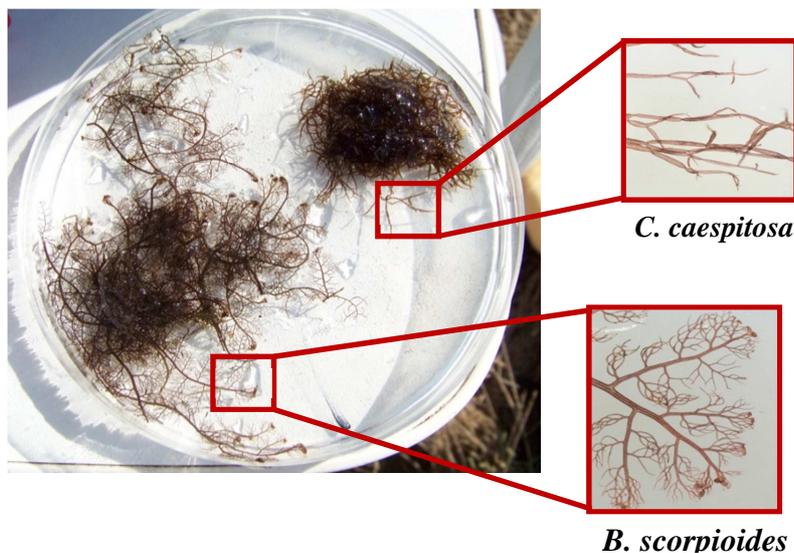


Figura 3. Imagen de *B. scorpioides* y *C. caespitosa* sobre una placa de Petri y detalle de las mismas.

2.2.- Lugar de muestreo, recolección y mantenimiento de las algas

Los ejemplares de *B. scorpioides* y *C. caespitosa* fueron recogidos en la zona intermareal del estuario del río Palmones (36°10'21"N, 5°20'22"W; Figura 4), localizado en el término municipal de los Barrios (Cádiz). Este estuario se caracteriza por tener una extensión total de 5.6 Km de longitud de canal, una anchura media de 75 m y una profundidad de entre 1.5 y 2 m en marea baja. Se clasifica como un estuario de mezcla parcial (Clavero et al. 1997), dominado por las mareas, que tienen una amplitud de entre 0.6 y 2 m (Izquierdo 2001) y con valores medios de salinidad entre 27 y 35, según Clavero et al. (1997), aunque a lo largo del presente estudio se registraron valores en un rango entre 15 y 37.

La marisma asociada al estuario tiene vegetación arbustiva de carácter halófilo, dominada por los géneros *Sarcocornia perennis* (Miller) A. J. Scott y *Arthrocnemum macrostachyum* (Moric.) Moris, así como las especies *Atriplex portulacoides* (L.) Allen (ex *Halimione portulacoides*) y *Juncus maritimus* Lam., esta última asociada a los canales de agua dulce (Palomo 2004). Además, se encuentran diversas especies de gramíneas del género *Spartina* entremezcladas con el resto de vegetación.



Figura 4. Situación geográfica y detalle del estuario, incluyendo la posición de la zona de muestreo. El núcleo urbano que se observa corresponde a la pedanía de Palmones, perteneciente al municipio de los Barrios (Cádiz).

Material y Métodos

Las muestras se tomaron en marea baja debido a que ambas especies cohabitan, en el intermareal del estuario, bajo el dosel de vegetación halófila que sirve de sustrato de fijación para estas especies epífitas, situadas en los márgenes del estuario. *Catenella caespitosa* ocupa una posición relativamente más baja y cercana al lecho del sedimento que *B. scorpioides*, la cual domina la zona más alta del intermareal estuárico. No obstante, existe una franja intermedia en la que ambas especies coexisten. Por otro lado, su posición bajo el dosel de quenopodiáceas les permite estar protegidas del exceso de insolación (Figura 5).



Figura 5. Disposición de *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en el intermareal del estuario del río Palmones.

Una vez tomadas las muestras, éstas se introdujeron en botes de 1L a los que se añadió agua del propio canal del estuario y se transportaron al laboratorio en una nevera para mantener su temperatura.

Bostrychia scorpioides y *C. caespitosa* fueron aclimatadas a las condiciones del laboratorio, desde el día de su recolección hasta el momento de los ensayos, en una cámara de cultivo a temperatura controlada ($15 \pm 1^\circ\text{C}$), en cilindros de plexiglas, de 3 L de capacidad con agua de mar natural filtrada mediante filtros Millipore GF/F, a una salinidad de 36. Se les sometió a un flujo constante de aire de 1 L min^{-1} , a una irradiancia de $40 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, suministrada por fluorescentes blancos (F-18W/54-765 SYLVANIA) con un fotoperiodo de 12:12 (luz:oscuridad). La irradiancia fue medida con un sensor esférico (Spherical Micro Quantum Sensor US-SQS/L) conectado a un radiómetro (LI-250A Light Meter LI-COR).

2.3.- Diseño experimental

La figura 6 esquematiza los distintos tipos de experimentos realizados en este trabajo mediante los cuales se han respondido a una serie de preguntas sobre los mecanismos de incorporación de Ci presentes en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*.

¿Cuáles son los mecanismos de incorporación de Ci?

En primer lugar se procedió a la cuantificación y comparación de la actividad ACAext y ACAint en ambas especies. Además, se identificó la presencia de los distintos canales de incorporación de Ci mediante el uso de inhibidores específicos de dichas vías de entrada. Se realizaron cinéticas de cada inhibidor para averiguar la concentración mínima necesaria con la que se obtiene la máxima inhibición de la fotosíntesis, como evolución de O_2 y de la ACAext. También se determinó la inhibición de la incorporación de Ci mediante un analizador de gases infrarrojos (IRGA) a dicha concentración mínima para cada inhibidor.

¿Qué forma de Ci incorporan principalmente?

Una vez comprobado el efecto de los inhibidores de las distintas vías de incorporación de Ci en la fotosíntesis, se determinó qué forma o formas de Ci son incorporadas principalmente por ambas rodófitas, mediante varias aproximaciones. Para

ello, en primer lugar se realizó una caracterización de la fotosíntesis mediante las curvas fotosíntesis – carbono (P-C) y los parámetros que las caracterizan. Además, se realizaron medidas de la deriva del pH a lo largo del tiempo, así como medidas de la variación de la alcalinidad del medio debida a la fotosíntesis. A partir de estas medidas de pH se estimaron el punto de compensación para el pH y para el CO₂ y la tasa de deshidratación espontánea del HCO₃⁻. También se midió directamente la deriva del CO₂ en el tiempo y se estableció de manera experimental el punto de compensación para el CO₂. Además, se realizaron medidas de discriminante isotópico $\delta^{13}\text{C}$ que también aportan información sobre la forma de Ci que incorporan las distintas especies.

¿Están relacionados los mecanismos de incorporación de Ci y la enzima Rubisco?

Se realizaron medidas tanto de la cantidad como de la actividad Rubisco en muestras de campo, aclimatadas al laboratorio e incubadas con distintos inhibidores de los mecanismos de incorporación de Ci, para el estudio del acoplamiento entre la incorporación de Ci y la actividad Rubisco.

¿Existe una relación entre la incorporación de Ci y las características iónicas y osmóticas del medio?

Por último, se planteó la posibilidad de que la variabilidad osmótica e iónica pudiera estar relacionada con la incorporación de Ci. Por eso, se realizaron medidas de la fotosíntesis y la ACAext a distintas salinidades. Finalmente, se comprobó si la presencia o ausencia de los iones Na⁺ y/o Cl⁻ a osmolaridad constante tenía algún efecto sobre la fotosíntesis y la ACAext de las especies objeto de estudio.

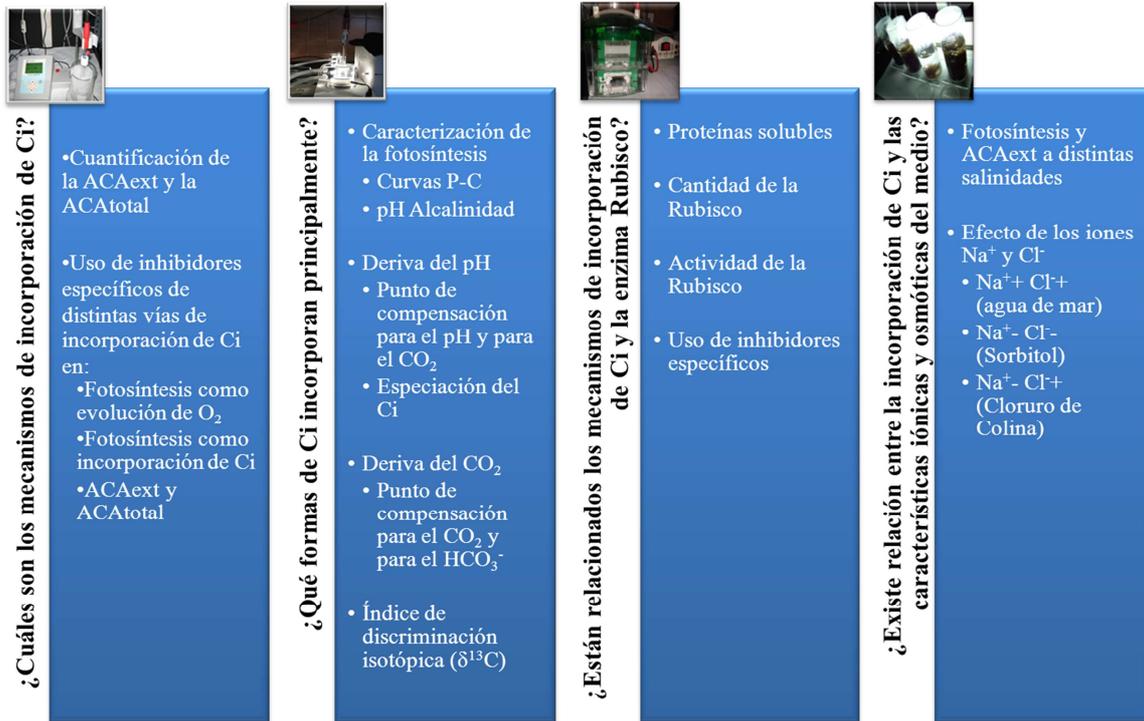


Figura 6. Esquema de los experimentos realizados en el presente trabajo.

2.4.- Medida de la actividad fotosintética con inhibidores de distintos mecanismos de incorporación de Ci

La tasa de fotosíntesis neta (TFN) se midió en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* utilizando inhibidores de los mecanismos de incorporación de Ci a distintas concentraciones. Se comprobó el efecto de dichos inhibidores (Tabla 1) sobre la TFN en la medida de la evolución de la concentración de O₂ y en los ensayos de incorporación de Ci en el IRGA.

2.4.1.- Medida de la fotosíntesis como desprendimiento de O₂

La TFN como desprendimiento de O₂ se midió en cámaras transparentes de metacrilato Hansatech de 2.5 mL de capacidad (Figura 7), equipadas con un electrodo de oxígeno tipo Clark modelo DW1/AD (Oxygraph system, Liquid-Phase Oxygen Electrode Chamber, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). Como fuente de luz se utilizó una

Material y Métodos

lámpara halógena (Schott KL 1500 Compact) que proporcionó luz saturante a los experimentos ($230 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La temperatura se mantuvo constante a 15°C con la ayuda de un baño termostático (Julabo F25-ED).



Figura 7. Fotografía del sistema para la medida de fotosíntesis como evolución de O_2 .

2.4.2.- Efecto de inhibidores de los mecanismos de incorporación de carbono sobre la fotosíntesis (evolución de O_2)

Para los ensayos con inhibidores se utilizaron 15-20 mg de peso fresco (PF) de alga que fueron sumergidas en 1.5 mL de agua de mar natural filtrada y tamponada a pH 8.1 (MOPS 5mM y BTP 4mM). Los distintos inhibidores fueron añadidos a la cámara de fotosíntesis mediante una jeringa de cristal Hamilton de $40 \mu\text{L}$.

Se utilizaron concentraciones crecientes de los inhibidores de los distintos mecanismos de incorporación de carbono inorgánico para comprobar su efecto sobre la tasa de fotosíntesis. En primer lugar se determinó el efecto de varios inhibidores de la CA: Sulfonamida unida a dextrano (DBS, Ramidus AB), acetazolamida (AZ, Sigma Aldrich) y etoxizolamida (EZ, Sigma Aldrich). De todos ellos se prepararon soluciones

en hidróxido sódico 0.05 N a una concentración de 40 mM de DBS, 20 mM en el caso de AZ y 10 mM para EZ.

Se estudió la presencia de otras vías de incorporación de Ci con inhibidores específicos de dichas vías postulados en la literatura (Tabla 1): (a) Ácido 4,4'-diisotiocianatostilbena-2,2' disulfónico- (DIDS, Sigma Aldrich), del que se preparó una solución madre a una concentración 20 mM en agua bidestilada. (b) Monensina (MON, Sigma Aldrich), que se preparó a una concentración de 10 mM en etanol y se conservó a -20°C. (c) ortovanadato sódico (VAN, Sigma Aldrich), del que se preparó una solución madre de 200 mM en HCl 0.05N.

Las concentraciones finales utilizadas fueron: 6.5, 12.5, 25, 50 y 100 μM de AZ; 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 μM de DBS; 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 μM de EZ; 10, 20, 30, 50, 100 y 150 μM de MON; 10, 50, 250, 500 y 1000 μM de DIDS; 50, 100, 200, 500 y 1000 μM de VAN. Dada la elevada variabilidad entre réplicas de este diseño experimental, se utilizaron 4 muestras independientes (diferentes talos) para cada concentración, así como para el control (sin inhibidor).

Los resultados se muestran como porcentaje de inhibición respecto al control. En aquellos casos en los que se pudo ajustar la respuesta fotosintética a un modelo de saturación, se calculó la concentración del inhibidor a la que se saturaba la inhibición. Cuando no se pudo realizar dicho ajuste, la concentración de inhibidor necesaria para alcanzar la máxima inhibición se estimó visualmente de los resultados obtenidos.

2.4.3.- Medida de la fotosíntesis como incorporación de Ci en agua

La TFN por incorporación de Ci se midió mediante un Analizador de gases Infrarrojos (IRGA, Sensor de CO₂ modelo Li-820) operando en modo abierto y conectado a un ordenador. Para ello se burbujeó aire comprimido con una concentración de CO₂ de 444 ± 13 ppm a una tasa constante de 50 mL min^{-1} en una cámara termostatzada de 75 mL de volumen. La cámara contenía 30 mL de agua de mar natural previamente filtrada con un filtro Millipore GF/F y tamponada (MOPS 5mM y BTP 4mM) hasta conseguir un pH final de 8.1. La entrada constante de aire a lo largo de todo el experimento evitó que hubiera limitación de Ci disuelto para la planta (Figura 8). Una vez que se alcanzó el equilibrio entre la concentración de CO₂ del aire y el Ci disuelto en el agua, se

Material y Métodos

introdujeron 0.30 g PF de alga en la cámara. Las medidas se hicieron primero en oscuridad, estimando así la TR, y seguidamente en luz saturante de 230 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por una lámpara halógena (OSRAM 150W 24V). Cada medida tuvo una duración de 50 minutos, momento en el que se consideró que la tasa de respiración o de fotosíntesis era constante. La temperatura, en estas medidas, se mantuvo constante a 20°C en lugar de 15°C a lo largo de todo el experimento, para evitar la condensación en el interior del circuito del IRGA.



Figura 8. Fotografía del analizador de gases Infrarrojos (IRGA, Sensor de CO₂ modelo Li-820) en modo abierto.

2.4.3.1.- Cálculo para la obtención de las tasas de fotosíntesis en el IRGA en modo abierto

La TR se calculó restando el valor inicial de la concentración de CO₂ en ppm al valor medio de los 5 últimos minutos de la medida en oscuridad donde el valor ya era estable. La tasa fotosintética bruta (TFB) se obtuvo restando el valor medio de los 5 últimos minutos de la medida en luz, al valor medio de los 5 últimos minutos de la medida en oscuridad. Restando la TR de la TFB se calculó la TFN. Estos datos en ppm se transformaron en $\mu\text{moles CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ mediante la ley de los gases ideales:

$$\frac{\left[\frac{\Delta \text{ppm} \times \text{flujo}}{\text{PF}} \right] \times P}{R \times T} = \mu\text{moles CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$$

Donde:

Δppm es el incremento de ppm_v de CO_2 cuyas unidades son equivalentes a $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$

Flujo es el flujo de aire inyectado (0.05 L min^{-1} expresado en horas, es decir, 0.3 L h^{-1})

PF es el peso fresco del alga

P es la presión (1 atm)

T es la temperatura (293 K)

R es la constante universal de los gases ideales ($0.082 \text{ atm L K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

2.4.4.- Efecto de inhibidores de los mecanismos de incorporación de carbono sobre la fotosíntesis (incorporación de Ci)

El efecto de los diferentes inhibidores sobre la fotosíntesis se comprobó en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, en el IRGA en modo abierto, tal y como se especificó en el apartado anterior. Las medidas de incorporación de Ci se realizaron siguiendo el esquema representado en la Figura 9. Se burbujó aire a un flujo constante de 50 mL min^{-1} en el agua de mar natural filtrada y tamponada (MOPS 5mM y BTP 4mM) y se esperó el tiempo necesario para conseguir el equilibrio entre el Ci disuelto y el CO_2 del aire. Una vez alcanzado, se introdujo el alga en la cámara, cerrándose inmediatamente y se mantuvo en oscuridad (R1). Inmediatamente después, y sin abrir la cámara, se expuso el alga a luz saturante (F), con lo que se obtuvo la primera tasa de fotosíntesis (TFN). Seguidamente se dejó de nuevo el alga en oscuridad (R2) y a continuación se inyectó el inhibidor en la cámara de medida con una jeringa de plástico de 1 mL. De nuevo se encendió la luz por segunda vez (Fi) y se midió la tasa de fotosíntesis en presencia del inhibidor correspondiente (TFNi). La inhibición de la fotosíntesis se calculó como el porcentaje de variación de TFNi con respecto a TFN. Cada medida de respiración y fotosíntesis tuvo una duración de 50 minutos y para los cálculos de las tasas fotosintéticas se tomaron los últimos 5 minutos de cada intervalo, donde los valores de CO_2 eran estables (Figura 9). En estos ensayos se utilizaron muestras de alga independientes para cada réplica ($n=3$). Previo a la realización del experimento, se llevó a cabo un experimento control de igual duración y tratamientos luz-oscuridad en ausencia de

inhibidores, no observándose cambios en las sucesivas tasas de fotosíntesis y respiración debido al procedimiento experimental.

Los inhibidores se utilizaron a una única concentración, correspondiente a la de máxima inhibición en los experimentos de fotosíntesis por evolución de O_2 . Las soluciones madre preparadas para cada uno de ellos fueron las mismas que las detalladas en el apartado anterior y sus concentraciones finales en el medio fueron las siguientes: 400 μM DBS, 100 μM AZ, 100 μM EZ, 1 mM DIDS, 100 μM MON, 200 μM VAN.

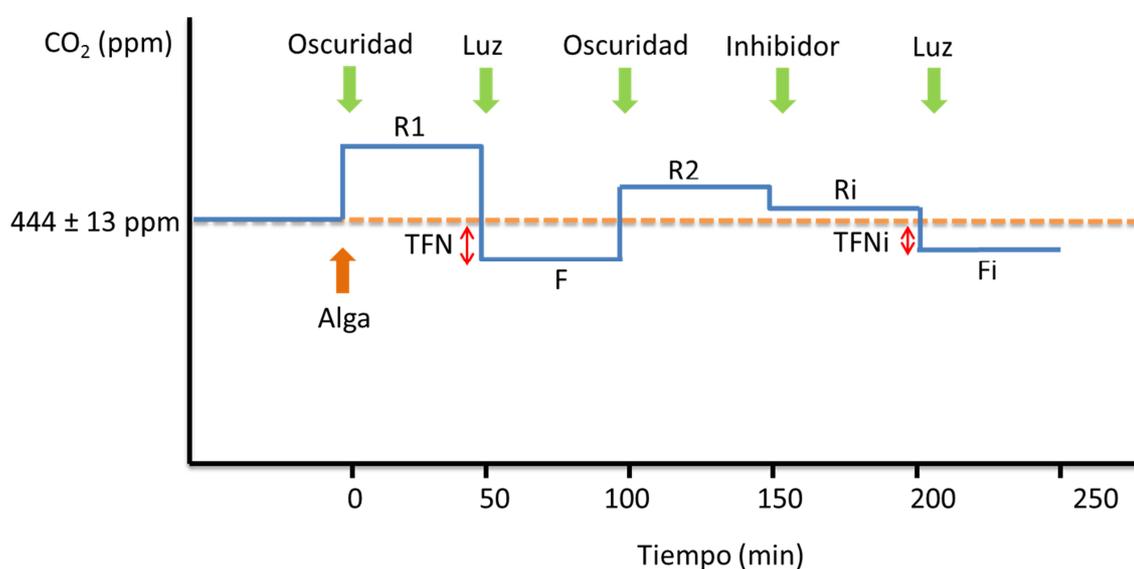


Figura 9. Esquema del diseño experimental en el estudio del efecto de los inhibidores sobre la incorporación de C_i en el IRGA. R1, R2 y Ri son los valores de CO_2 en ppm en oscuridad mientras que F y Fi son los valores de CO_2 en luz. La tasa de fotosíntesis neta sin inhibidor (TFN) y con inhibidor (TFNi) se calculó como diferencias entre valores estables en ppm entre los periodos de luz y la concentración de entrada de CO_2 suministrada continuamente.

2.4.5.- Medida de la fotosíntesis como incorporación de C_i en emersión

La TFN como incorporación de C_i en aire se midió mediante un IRGA portátil (LICOR modelo 6400 XT, Nebraska, USA; Figura 10). Para ello se colocaron en la cámara de medida o pinza del IRGA 0.120 g PF de alga previamente aclimatadas a las

condiciones de salinidad, luz y temperatura habituales para el resto de experimentos. Dichas algas se secaron ligeramente con papel para evitar el exceso de agua que pudiera interferir en la medida en el rango del infrarrojo. En primer lugar, se mantuvo a las algas en oscuridad durante 10 minutos dentro de la pinza para obtener la tasa de respiración, y posteriormente se realizó la medida en luz ($n=3$) a $230 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, proporcionados por la fuente de luz LED incorporada en la pinza termostatazada (20°C). Además, se utilizó un flujo de $200 \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$ y el ventilador en nivel 1V para evitar que el alga se secase rápidamente.



Figura 10. Imagen del equipo utilizado para las medidas de TFN como incorporación de Ci en emersión.

2.5.- Ensayos de Actividad Anhidrasa Carbónica

2.5.1.- Ensayos de la Actividad Anhidrasa Carbónica Externa (ACAext)

La medida de la ACAext se realizó utilizando el método potenciométrico (Figura 11) de Wilbur y Anderson (1948), adaptado para medir dicha actividad en fragmentos de alga (Haglund et al. 1992a). Este método está basado en medir el tiempo necesario para que el pH disminuya una unidad tras inyectar CO_2 en un recipiente que contiene medio tamponado. La disminución de pH se acelera cuando la CA se añade al tampón antes de la inyección de CO_2 . La actividad se determina comparando el tiempo necesario para la caída del pH en el control (sin CA) y en la muestra (con CA). La medida de la actividad

Material y Métodos

obtenida, relaciona la actividad de la CA presente en el alga con la tasa de hidratación espontánea del CO₂.

El tampón empleado fue el mismo descrito por Haglund et al. (1992a) compuesto por 50 mM de Trizma Base (Tris), 5 mol m⁻³ de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 25 mM de ácido ascórbico. Se dispusieron 3 mL del tampón en un recipiente de unos 10 mL de volumen, y se añadió 1.5 mL de agua destilada refrigerada a 0-1°C y saturada en CO₂. Se definió como t₀ el tiempo que tardó en descender el pH 0.4 unidades en un rango de 8.4 a 7.4. Para determinar el t₁ se siguió el mismo protocolo en presencia de 0.08 g PF de alga aproximadamente. La actividad fue expresada en unidades relativas de actividad enzimática (REA) dividida por el peso fresco expresado en gramos:

$$\text{Actividad enzimática (REA/g}^{-1}\text{ PF)} = \frac{\left[\left(\frac{t_0}{t_1}\right) - 1\right]}{\text{peso fresco (g)}}$$

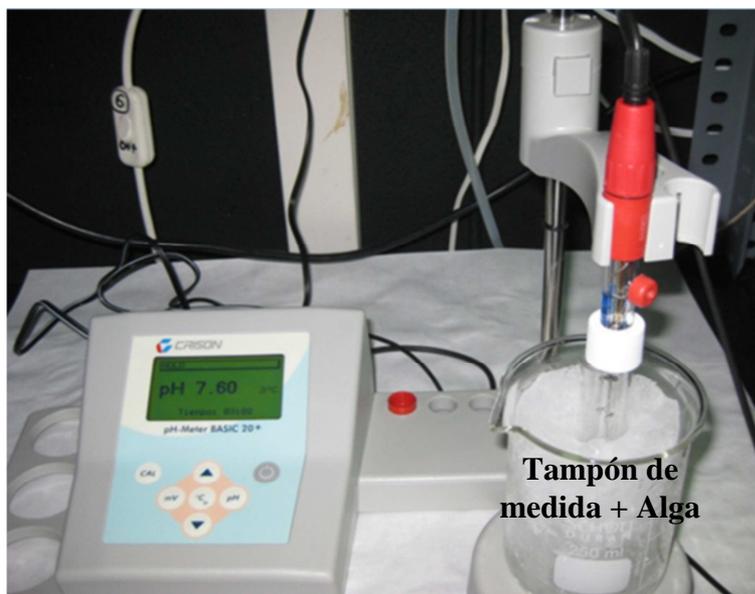


Figura 11. Imagen del equipo empleado en la estimación de la ACA.

2.5.2.- Inhibición de la Actividad Anhidrasa Carbónica Externa

Se estudió el efecto de los distintos inhibidores sobre la ACAext en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. Especímenes de ambas se incubaron en agua de mar filtrada y tamponada a pH 8.1 (MOPS 5mM y BTP 4mM) a la que se le añadieron concentraciones crecientes de los inhibidores. Dichas incubaciones se llevaron a cabo en tubos Falcon de 50 mL durante 15 minutos (AZ, EZ, DIDS y MON), 30 minutos (DBS) o 60 minutos (VAN), atendiendo a la velocidad de actuación de los distintos compuestos sobre las algas, dado que el gran tamaño de algunas moléculas hacen que su penetración sea más lenta (obs. pers.).

Las concentraciones finales utilizadas fueron: 50, 200, 400 y 800 μM de AZ; 100, 200, 400 y 800 μM de DBS; 2.5, 10, 25, 50 y 100 μM de EZ; 50, 100, 150 y 300 μM de MON; 100, 250, 500 y 1000 μM de DIDS; 50, 100, 200, 500 μM de VAN. Se utilizaron 4 ó 5 muestras independientes (diferentes talos) para cada concentración así como para el control (sin inhibidor). Los resultados se muestran como porcentaje de inhibición respecto a control.

2.5.3.- Ensayo de la Actividad Anhidrasa Carbónica Total (ACAtotal)

Al igual que en el caso de la ACAext, la actividad total de esta enzima, es decir, teniendo en cuenta las fracciones tanto externa como interna, se estimó mediante el método potenciométrico de Haglund et al. (1992). En este caso los fragmentos de alga utilizados (0.015 g PF) se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis para evitar la degradación de las enzimas. Posteriormente, las muestras congeladas fueron triturados en un molino RETSCH MM400 con ayuda de nitrógeno líquido (dos ciclos de 30 s^{-1} durante 1.5 minutos). Al extracto obtenido se le añadieron 3 mL de tampón de medida descrito en el apartado anterior, e inmediatamente se midió la actividad ACAtotal añadiendo 1.5 mL de agua destilada saturada en CO_2 . Se realizaron 5 réplicas de cada especie que se tomaron como control y los resultados se expresaron como $\text{REA g}^{-1}\text{ PF}$.

2.5.4.- Inhibición de la Actividad Anhidrasa Carbónica Total

La inhibición de la ACA_{total} se midió utilizando distintos inhibidores a una sola concentración. Estas concentraciones finales coinciden con la de mayor inhibición según las cinéticas realizadas para la ACA_{ext} y fueron: AZ 800 μM ; DBS 400 μM ; EZ 100 μM ; MON 300 μM ; DIDS 1000 μM ; VAN 200 μM . Para cada tratamiento se realizaron 4 medidas y el resultado se expresó como el porcentaje de inhibición de cada tratamiento con respecto al control sin inhibidores.

2.6.- Determination of the inorganic carbon form used by different experimental methods

2.6.1.- Photosynthetic response to different C_i concentrations

The photosynthetic response of both species to increasing C_i ($CO_2+HCO_3^-$) concentrations allowed determining the kinetic parameters for C_i . Samples of 0.010-0.015 g fresh weigh (FW) of alga were used to obtain the net photosynthetic rate (NPR) at saturation light ($230 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; Sánchez de Pedro et al. 2014) as a function of C_i concentration (P-C curve). Algae were incubated in a Hansatech O_2 evolution chamber containing 2 mL of C_i -free artificial seawater (0.5 M NaCl, 0.01 M KCl, 0.01 M $CaCl_2$, 7 mM $MgCl_2$, 0.03 M $MgSO_4$; Beer et al. 1990). C_i was removed from the medium by reducing the pH to less than 4 with the addition of 0.5 M HCl followed by bubbling with NaOH saturated air overnight. Finally the pH in the seawater was adjusted to pH 8.1 with 0.5 M NaOH solution. Biological buffers were added to maintain pH stable in the absence of HCO_3^- (MOPS y BTP 20 mM). Algae were allowed to photosynthesize to consume all the C_i present in the medium and in the algal cells until no further O_2 evolved, which took about 20-30 minutes. Once the NPR was zero, different aliquots of $NaHCO_3$ stock solution (0.01M for low concentrations and 0.05 for the higher ones) were then injected into the electrode chamber by means of a 40 μL glass Hamilton syringe, to obtain the increasing C_i concentrations from 0.05 to 4 mM.

2.6.1.1.- K_m (TIC) and conductance (g_p) calculations

The photosynthetic conductance (g_p) has been proposed as a useful parameter for determining the ability to extract C from seawater (Johnston et al. 1992). The conductance was obtained from the initial slope of C_i uptake curves by expressing the photosynthetic rates on an area basis (Johnston et al. 1992). The estimation of fresh matter per unit surface area relationship was 212.8 g m^{-2} for *B. scorpioides* and 86.2 g m^{-2} for *C. caespitosa* (Sánchez de Pedro et al. 2014). The photosynthetic conductance for CO_2 was also estimated by calculating the corresponding CO_2 concentration for each C_i concentration at pH 8.1, using the values of dissociation constants in Mehrbach et al. (1973), by means of the program CO_2 System Calculation ($CO_2\text{sys}$) for MS Excel (Pierrot et al. 2006).

From the P-C curve, the half-saturated rate of photosynthesis (K_m) was obtained from the Michaelis-Menten kinetic in the P-C curve. The curve fit was performed by means of the computer program Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software) with the following equation:

$$V(S) = V_{max} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

where K_m is the C_i concentration at which half of the maximum photosynthesis rate is reached and V_{max} is the maximum photosynthetic rate achieved.

2.6.2.- pH and alkalinity measurements

The time course changes of pH and alkalinity were carried out to control the variations in the C_i forms in the medium due to photosynthetic activity and to help to understand the C_i uptake in the species of our study. For that, thalli of *B. scorpioides* and *C. caespitosa* of 0.3 g FW were placed in 50 mL Erlenmeyer flasks (E-flasks) containing 65 mL filtered natural seawater (NSW). The E-flasks were sealed gas-tight with parafilm avoiding any bubbles and placed on an orbital shaker at 15°C and saturating light ($230 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by daylight fluorescent tubes (F-18W/54-765 SYLVANIA, Brussels, Belgium). Three flasks from a total of 21 were randomly selected at 0, 30, 60, 90, 180, 360 and 600 minutes where alkalinity and pH were measured. The pH was monitored with a pH meter (CRISON Basic 20+, Alella, Spain) connected to a pH-electrode (CRISON 52 00, Alella, Spain). Alkalinity was measured using the classical Gran potentiometric method (Gran 1952). A volume of 50 mL GF/C (Whatman) of filtered samples was titrated with a strong acid (HCl 0.01N) to pH4. The volume of titrant used is proportional to the alkalinity of the sample:

$$\text{Alkalinity (mequiv mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{titrant volume} \times \text{titrant Normality}}{\text{Sample volume}}$$

2.6.3.- pH-drift measurements

A very useful variable in the study of Ci uptake by algae is the pH compensation point. It was calculated from pH-drift curves, performed by measuring simultaneously the pH increase in a closed vessel and the O₂ evolution in non-buffered NSW. A pH electrode (CRISON 52 09, Alella, Spain) connected to a pH data logger was tightly attached to a 2.5 mL Hansatech Oxygraph photosynthetic chamber (Hansatech Ltd, Northfolk, UK; Figure 12). pH was recorded every 2 minutes for 12 hours, while O₂ evolution data were recorded every second. The chamber was completely filled with non-buffered NSW, avoiding air bubbles, and 0.010-0.015 g FW of algae were placed into the chamber and incubated at 15°C (n=3) and 230 μmol photons m⁻² s⁻¹, supplied by a halogen lamp (KL 1500 compact Schott, Mainz, Germany). The water in the vessel was continuously homogenized by a magnetic stirrer, carefully kept apart from the algae to avoid mechanical damage. The pH compensation point was considered to be reached when pH was stable for at least 1 hour. To avoid any possible physiological differences among replicates, every pH-drift experiment started at the same time every day.

2.6.3.1.- Photosynthetic quotient (PQ)

The photosynthetic efficiency of the species in this study was determined by the comparison of the initial NPR as CO₂ uptake and O₂ evolution. From pH-drift data, the initial rate was calculated as CO₂ uptake transforming the initial pH data into CO₂ data by means of the CO₂sys. The first two minutes of the experiment were used for the NPR calculations since this was the minimum time interval pH data logger could record. The Photosynthetic Quotient (PQ) indicates the net rate of CO₂ fixed per O₂ evolved on a molar basis and it is expressed as CO₂/O₂. The PQ was obtained from the pH-drift experiment data, i.e. the calculated CO₂ and O₂ evolution NPRs. Three independent replicates of the measurements were used for the calculations.

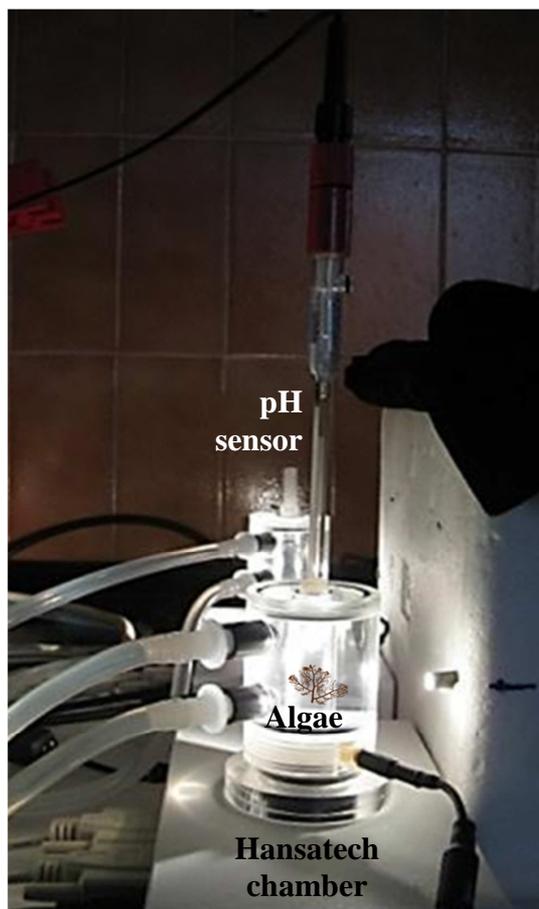


Figure 12. Picture of a pH-meter connected to a Hansatech chamber in order to measure simultaneously O₂ evolution and pH drift.

2.6.3.2.- *Speciation of the C_i forms, calculated CO₂ compensation point and spontaneous HCO₃⁻ dehydration*

Total inorganic carbon and its species concentrations were calculated from pH, alkalinity, salinity and temperature in the NSW of the pH-drift experiments and the values for dissociation constants in Mehrbach et al. (1973), by means of the computer program CO₂ System Calculation for MS Excel (Pierrot et al. 2006). The CO₂ compensation point was also calculated from pH of the pH-drift experiments, salinity, temperature and alkalinity using the CO₂sys.

The spontaneous dehydration of HCO_3^- in seawater, for a given salinity, temperature and pH, was calculated according to Johnson (1982), taking into consideration the following constants:

$$\frac{d\text{CO}_2}{dt} = (k_d \cdot h + k_{\text{HCO}_3^-}) \cdot [\text{HCO}_3^-]$$

where the values of rate constants were obtained from Johnson (1982),

$$k_d = 1.89 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$h = 10^{-\text{pH}}$$

$$k_{\text{HCO}_3^-} = 0.49 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

2.6.4.- CO₂-drift

The CO₂ uptake was measured by means of a closed InfraRed Gas Analyzer (IRGA) type LICOR Li-820 (Browse 1985). Air from a compressed air bottle (Figure 13) was bubbled into a closed 75 mL vessel containing 15 mL of buffered NSW using a membrane pump KF type (NMP 0158) at a constant rate of 50 mL min⁻¹. When the equilibrium between air and water was achieved, 0.125 g FW of alga were carefully inserted into the chamber and rapidly closed. Then, the air supply was shut down, starting from an initial CO₂ concentration of 443.5 ± 12.9 ppm. The chamber received an irradiance of 230 μmol photons m⁻² s⁻¹ provided by a halogen lamp and the temperature was set at 20°C. The depletion of CO₂ was measured for 12 hours by a computerized IRGA device. The final CO₂ concentration in the air of the chamber, which is in equilibrium with the C_i in the water was used to calculate the dissolved CO₂ final concentration (CO₂ compensation point) in the seawater by means of the computer program CO₂ System (assuming that the effect of the buffers on the inorganic carbon speciation was negligible). This CO₂ compensation point was estimated as the stable value of CO₂ where its uptake and release are the same, or, in other words, when the NPR measured as CO₂ uptake is zero. The values of the CO₂-compensation point obtained by

this method are the potential ones, since there was no limitation of the photosynthesis by increasing pH. Three replicates were performed on each species.

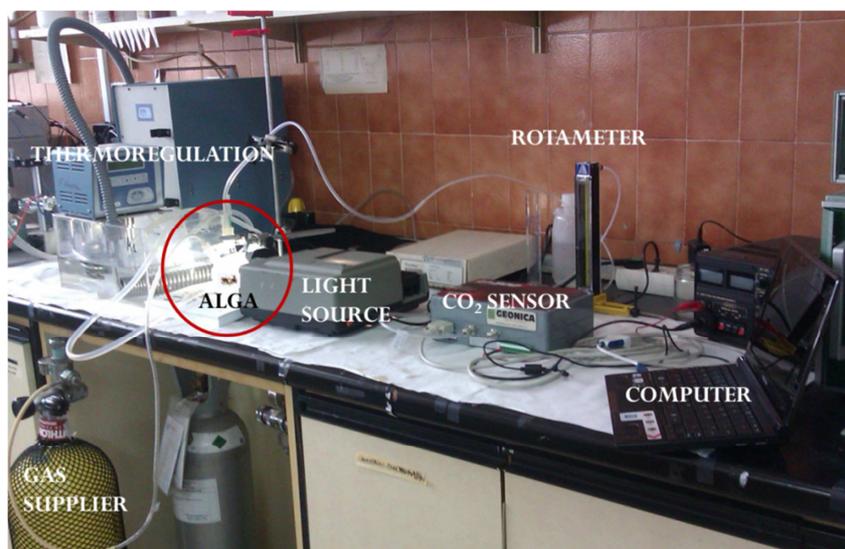


Figure 13. IRGA closed system, as described by Browse (1985).

2.6.5.- Isotopic discriminants as Ci uptake markers

Carbon isotopic discriminant ratio ($\delta^{13}\text{C}$) was measured in the species of this study since it has been proved to be useful in determining the Ci form utilized by photosynthetic organisms (Maberly et al. 1992; Raven et al. 1995; Korb et al. 1998; Raven et al. 2002; Carvalho et al. 2009).

Before any analytical procedure, the selected algal material brought from the field along the year, was thoroughly rinsed with seawater to remove sediments and epiphytes and rinsed with distilled water, oven dried at 60°C to constant weight and ground to a fine powder. For the ($\delta^{13}\text{C}$) determination, samples of 0.2-0.6 mg dry weight (DW) were introduced in stain capsules, tightly closed and placed in the autosampler (MAS200R, Thermo Electron Corporation). Then, the natural abundance of ^{13}C relative to ^{12}C was analyzed by combustion in an elemental analyzer Flash EA 1112 and an isotopic relations mass spectrometer (IRMS) Delta V Advantage, connected by an interface Confío IV, Thermo Electron Corporation (Bremen, Germany). The combustion took place in a reactor of chromium oxide (III), reduced chrome and $\text{Co}_3\text{O}_4/\text{Ag}$ at 1020°C in the presence

of oxygen. The chromatographic column was maintained at 45°C. The transporter gas (Helium) flow rate was 100 mL min⁻¹ and the reference gas (CO₂) was used at 250 mL min⁻¹. Primary standards were supplied by the International Atomic Energy Agency (IAEA) and the National Institute of Standards and Technology (NIST).

The ¹³C isotopic discrimination in the algal samples ($\delta^{13}\text{C}_{\text{alga}}$) was expressed in the unit notation as deviations from the ¹³C/¹²C ratio of the Pee-Dee Belemnite CaCO₃ (PDB) calculated according to:

$$\delta^{13}\text{C} = [({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{sample}}/({}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C})_{\text{PDB}} - 1] \cdot 10^3$$

2.7.- Efecto de inhibidores de los mecanismos de incorporación de Ci en la concentración y actividad de la enzima Rubisco

2.7.1.- Incubaciones de las algas con los inhibidores

El efecto de distintos inhibidores de los mecanismos de incorporación de Ci sobre la enzima Rubisco y su actividad se comprobó incubando muestras de 0.4 g PF de *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en tubos Falcon de 50 mL con NSW tamponada a 15°C de temperatura. Estos se expusieron a luz saturante (230 $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y agitación continua durante 2 horas. Se utilizó la concentración de mayor inhibición según las cinéticas de la fotosíntesis en cada una de las dos especies y se hicieron además, dos controles sin inhibidores, uno de ellos previo a la aclimatación en el laboratorio (consideradas como muestras de Campo, CC), y otro 48 horas después de la aclimatación (consideradas como muestras Control, C). Las concentraciones finales de los inhibidores fueron: DBS 0.8 mM, AZ 0.1 mM, EZ 0.1 mM, MON 0.1 mM. Una vez realizadas dichas incubaciones, las muestras de alga se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de agua y se congelaron a -80°C para su posterior procesado. De cada muestra se analizó la cantidad de proteínas solubles, así como la cantidad y actividad de la enzima Rubisco.

2.7.2.- Extracción de la enzima

Tras la incubación se procedió a pulverizar las algas en un molino RETSCH MM400 (Figura 14) con ayuda de nitrógeno líquido (dos ciclos de 30 s^{-1} durante 1.5 minutos). Seguidamente se añadieron 1.5 mL de tampón de extracción (EB) compuesto por 100 mM Bicina-NaOH a pH 8, 20 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidina, 1 mM Ácido Aminocaproico (ACAc), 20 mM NaHCO_3 , al que también se adicionaron 5.25 μL de β -Mercaptoetanol 50 mM, 30 μL de Ditiotreitól (DTT) 10 mM, 30 μL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM y 37.5 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2.5 % (p/v). Se dio un nuevo ciclo de molienda en frío y los extractos obtenidos se centrifugaron a 10000 x g, durante 15 minutos en una centrífuga Eppendorf (modelo 5804R) a 4°C. Se tomaron los sobrenadantes, que se alicuotaron y almacenaron a -20°C para el posterior análisis de la concentración de proteínas solubles y de la enzima Rubisco mediante geles de electroforesis, y a -80°C para las medidas de actividad de la Rubisco mediante el método espectrofotométrico de Kubien et al. (2011).

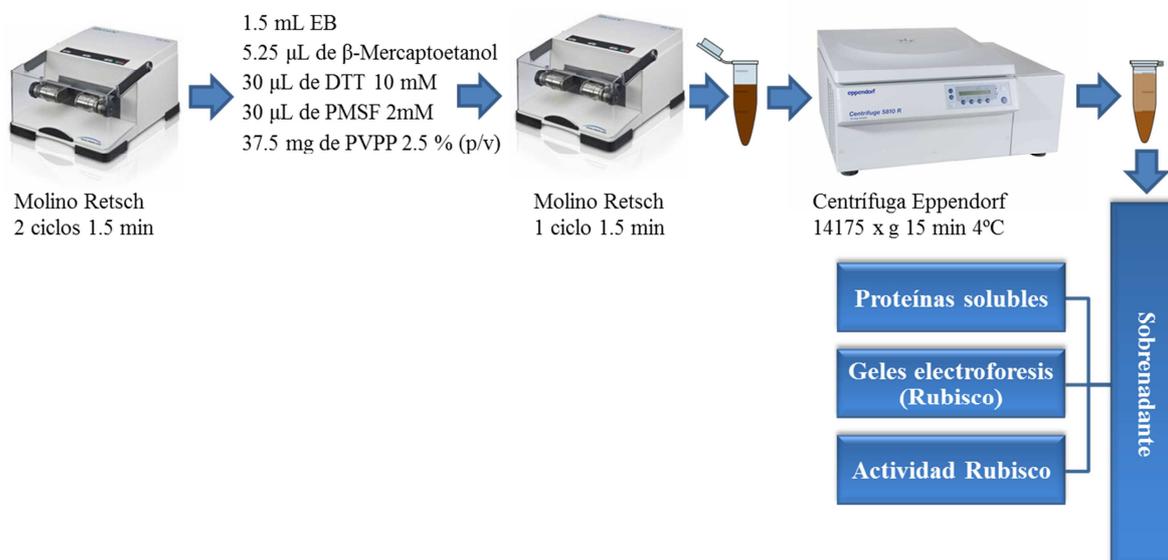


Figura 14. Esquema del procedimiento de preparación de las muestras de alga para el posterior análisis de la enzima Rubisco.

2.7.3.- Determinación de la concentración de Proteínas solubles

La determinación de la concentración de proteínas solubles se realizó a partir del sobrenadante del extracto crudo en tampón de extracción mediante el método Bradford (1976). Este método consiste en la formación de un enlace entre el colorante azul de Comassie-250G y la proteína en medio ácido, con lo que se forma un complejo con un coeficiente de extinción a 595 nm. El reactivo Bradford se preparó a partir de 0.1 mg mL^{-1} de Comassie Brilliant Blue, 0.05% de Etanol 96% (v/v) y 0.1% de ácido ortofosfórico 85% (p/v). A continuación, a cada 0.1 mL de cada una de las muestras, se le añadió 1 mL de reactivo Bradford y se dejó reaccionar durante 10 minutos, después, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Thermo modelo Biomate 5. La recta patrón se elaboró a partir de albúmina bovina ($\text{BSA } 1 \text{ mg mL}^{-1}$) en un rango de $0\text{-}200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de la proteína. Para transformar los datos de peso fresco a peso seco de alga, se multiplicó el valor de peso fresco por 0.278 en el caso de *B. scorpioides* y por 0.153 para *C. caespitosa*. Este factor fue determinado

Material y Métodos

experimentalmente para cada especie para 28 réplicas de cada especie pesándolas antes y después de secarlas en la estufa a 60°C durante 24 horas.

2.7.4.- Determinación de la concentración de la enzima Rubisco

Se utilizaron geles de poliacrilamida para separar la enzima Rubisco del resto de proteínas solubles y estimar su concentración en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970). Se trata de una técnica analítica en la que se separan las moléculas según su peso bajo la acción de un campo eléctrico. El método permite separar proteínas haciéndolas pasar a través de una resina de Acrilamida-BisAcrilamida, que genera una matriz en la cual se quedan retenidas.

Tabla 2. Soluciones empleadas para la electroforesis y composición de los geles.

	MINIGELES	
	GEL DE SEPARACIÓN (20mL para dos geles)	GEL DE APILAMIENTO (5mL para dos geles)
* ¹ Tampón de separación pH 8.8	5 mL	--
* ² Tampón de apilamiento pH 6.8	--	1.25 mL
* ³ Acrilamida-BisAcrilamida	6.66 mL	0.5 mL
Agua destilada	8.33 mL	3.25 mL
Persulfato amónico (20%)	66.6 µL	33.3 µL
TEMED	6.6 µL	3.3 µL

*¹ **Tampón de separación:** 56.8 g de Tris en 250 mL, pH 8.8

*² **Tampón de apilamiento:** 37.8 g de Tris en 250 mL, pH 6.8

*³ **Acrilamida-BisAcrilamida (30:0.8):** 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en 100 mL de agua destilada.

*⁴ **Tampón de electroforesis (x10):** 144.2 g de glicina, 30.3 g de Tris, 10 g de SDS en 1 L de agua destilada.

*⁵ **Tampón de carga:** 1.25 mL TRIS-HCl 1.25 M pH 6.8, 2 mL SDS 10%, 1 mL Glicerol 10%, 0.5 mL 2 β-mercaptoetanol, 0.25 mL bromofenol 0.05%, en 10 mL.

Las placas de electroforesis se montaron sobre su soporte donde se preparó el gel de separación (Figura 15), cuya composición se detalla en la Tabla 2*¹ y se añadió una pequeña cantidad de butanol al 50%. Una vez polimerizado se retiró el butanol y, por encima del gel de separación ya polimerizado, se añadió la mezcla del gel de apilamiento (Tabla 2*²) que se selló con un peine para conseguir diez pocillos de 1.5 mm de grosor. Tras su polimerización, y la retirada del peine, los pocillos se llenaron de los extractos de las muestras de algas (40 μ L) y de los patrones de Rubisco de espinaca purificada (Sigma Aldrich), entre 3.5 y 28 μ g, con la ayuda de una jeringa Hamilton. Previamente, a todas las muestras se les añadió tampón de carga al 40% (Tabla 2*⁵) y fueron desnaturalizadas durante 5 minutos a 100°C en un Thermoblock VWR modelo 12621-088.

La electroforesis (Figura 15) se llevó a cabo en tampón TRIS-Glicina (Tabla 2*⁴; 0.025M Tris/0.192M Glicina/0.1% SDS) a una intensidad de 80 mV. Posteriormente, los geles se tiñeron durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación orbital suave. La solución de tinte estaba compuesta por azul de Comassie R-250 (1% p/v), ácido acético (10 % v/v) y metanol (40% v/v). Para desteñir los geles se utilizó la misma solución sin azul de Comassie hasta que se eliminó al máximo el azul de fondo.

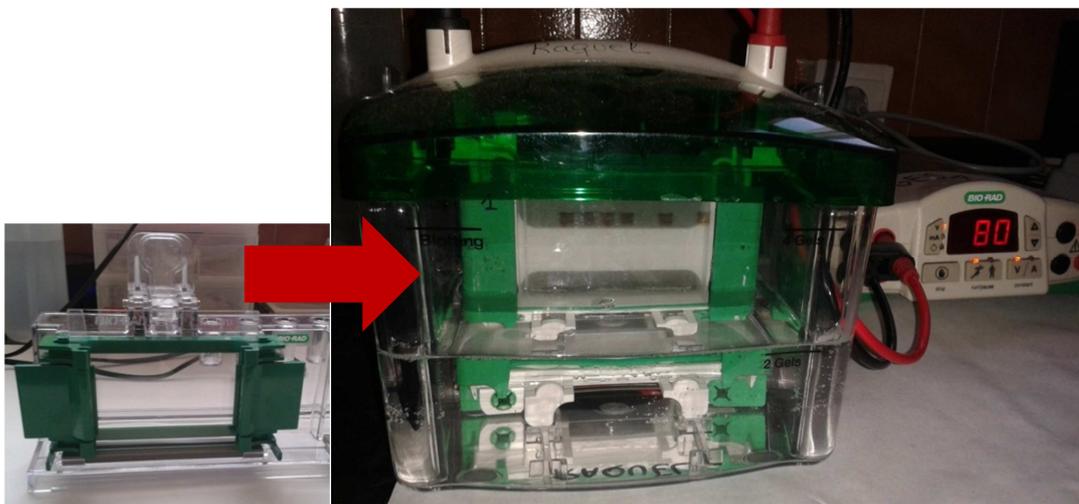


Figura 15. Fotografía de la polimerización del gel de separación y posterior electroforesis a una intensidad de 80 V.

Material y Métodos

Una vez desteñidos, los geles con las bandas se escanearon (Figura 16), obteniendo una imagen en formato .jpg, compatible con el programa de análisis de imagen Image J (Schneider et al. 2012), mediante el cual se midieron los valores de intensidad y el área de las bandas correspondientes a la subunidad grande de los patrones de Rubisco, así como de los extractos de los tratamientos. La recta patrón se obtuvo multiplicando el valor de la intensidad por el área de cada banda de concentración conocida. La cantidad de Rubisco en cada extracto se calculó interpolando en la recta patrón el valor del área por la intensidad de cada banda y se expresó como porcentaje de Rubisco con respecto a las proteínas solubles de la muestra.

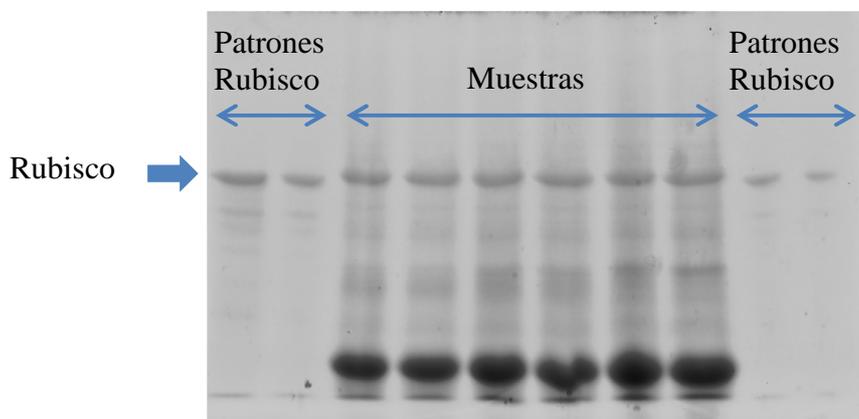


Figura 16. Imagen escaneada de uno de los geles de electroforesis a partir del cual se realizó la cuantificación de la enzima Rubisco. En las calles 1, 2, 9 y 10 se inyectaron los patrones de Rubisco de espinaca de mayor a menor (28, 14, 7 y 3.5 μg de Rubisco respectivamente). Las calles centrales del gel se utilizaron para las muestras.

2.7.5.- Descripción del método espectrofotométrico para el cálculo de la actividad Rubisco

La actividad Rubisco de los extractos se midió en 15 μl del sobrenadante de *B. scorpioides* y 25 μl del de *C. caespitosa*, ambos procedentes de la extracción de proteínas, a los que se les añadió EB hasta 50 μl en ambos casos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos, para la activación de la enzima. Mientras tanto, en la cubeta de cuarzo del espectrofotómetro se mezclaron los siguientes reactivos:

- *730 μ l de tampón de ensayo (EME; 100mM EPPS-NaOH pH 8 + 20 mM $MgCl_2$ + 1 mM Na_2 -EDTA)
- *20 μ l de NADH (stock 10 mM, concentración final 200 μ M)
- *40 μ l de $NaHCO_3$ (stock 500 mM, concentración final 20 mM)
- *100 μ l de ATP/Fosfocreatina (ATP/PPC; solución madre 10/50 mM, concentración final 1/5 mM)
- *20 μ l de Cóctel de enzimas (CE) detallado en el apartado 7.5.1.
- *40 μ l de Ribulosa Bisfosfato (RuBP; stock 25 mM, concentración final 1 mM)

2.7.5.1.- Preparación del cóctel de enzimas

El cóctel requerido (CE; Kubien et al. 2011) contuvo las enzimas detalladas en la Tabla 3. Primero se mezclaron las enzimas disueltas en $(NH_4)_2SO_4$ (3-fosfoglicerato kinasa y Triosa-P Isomerasa/Glicerol-3-P dehidrogenasa) y se centrifugaron a 10000 x g y a 4°C durante 20 minutos. Después se disolvió el pellet en 1.2 mL de tampón del cóctel de enzimas (EED; 50 mM EPP-NaOH; 1mM EDTA; 1 mM DTT). Tras esto, se añadieron el resto de enzimas y se dializaron en tampón EED a 4°C durante 8-12 horas. Tras este tiempo, se recogió el volumen dializado del interior de la membrana, se centrifugó (en las condiciones indicadas anteriormente), se midió el volumen de sobrenadante obtenido, y se añadió glicerol en un 20% (v/v). Se prepararon pequeñas alícuotas (200 μ L) y se almacenaron a - 80°C.

Tabla 3. Cantidad de enzimas requeridas para la elaboración del cóctel. Todas las enzimas son de la marca comercial Sigma-Aldrich. El volumen final preparado fue de 1,6 mL, incluyendo un 20% (v/v) de glicerol.

Enzima	Código	Cantidad	*U mL ⁻¹
Creatina fosfoquinasa	C3755	6.348 mg	25
Anhidrasa carbónica	C3934	8 mg	>250
Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	G2267	22 mg	25
3-fosfoglicerato kinasa	P7634	0.34 mL	25
Triosa-P-Isomerasa/ Glicerol-3-P-Deshidrogenasa	G1881	1.544 mL	200/20

*Unidades mL⁻¹; correspondiente a 40 μ l de cóctel por cada mL de ensayo.

Material y Métodos

Al cabo de 15 minutos de incubación, se añadieron los 50 μL del extracto activado (muestra diluida con EB a temperatura ambiente) a la cubeta del espectrofotómetro, se agitó durante unos segundos para mezclarlo con el resto de reactivos e inmediatamente después se inició la medida de absorbancia a 340 nm durante 400-500 segundos. De las gráficas de variación de absorbancia con respecto al tiempo, se eligió una región lineal de descenso de la absorbancia y se calculó la tasa de descenso de absorbancia en esa zona ($A \text{ s}^{-1}$). Asumiendo un coeficiente de extinción de $6.18 \mu\text{moles mL}^{-1}$ para la oxidación del NADH a 340 nm, la tasa de consumo de Ribulosa Bisfosfato (RuBP) fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Uso de RuBP} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}} \right) = \frac{(A_{t_0} - A_{t_1}) \text{Vol}}{6.18 * 4 * (t_0 - t_1)}$$

siendo “Vol” el volumen introducido en la cubeta del espectrofotómetro (1 mL), “ t_0 ” y “ t_1 ” el tiempo inicial y final respectivamente, y “A” la absorbancia en el tiempo elegido.

Por último, el valor de uso de RuBP calculado, se utilizó para estimar la actividad Rubisco de las muestras mediante la siguiente ecuación:

$$V_{cmax} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{gpf} * \text{s}} \right) = \frac{\text{Uso de RuBP} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}} \right) * EV (\mu\text{L})}{\text{Peso de la muestra (gPF)} * \text{Vol. muestra} (\mu\text{L})}$$

siendo “EV” el volumen en el que se extrajeron las proteínas.

2.8.- Medida de la tasa fotosintética y la actividad CAext en relación con las fluctuaciones iónicas del medio

2.8.1.- Medida de la tasa fotosintética y la actividad CA externa a distintas salinidades

Se tomaron muestras de *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en el intermareal que fueron inmediatamente transportadas al laboratorio y preaclimatadas a las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente. Una vez aclimatadas a estas condiciones,

0.8 g PF de alga por réplica (n=3-4) se incubaron durante 12h en agua de mar artificial (ASW; Tabla 4) a distintas salinidades (10, 20, 25, 30, 36 y 45). Para alcanzar dichas salinidades se diluyó ASW a salinidad 36 con agua destilada en el caso de las salinidades más bajas, y se añadió NaCl hasta conseguir la salinidad más alta. En este caso no se tuvo en cuenta la diferente osmolaridad de cada medio.

Tabla 4. Composición del agua de mar artificial empleada en los experimentos de salinidad.

Agua de mar artificial	
NaCl	0.5 M
KCl	0.01 M
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0.01 M
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	7 mM
MgSO ₄	0.03 M
NaHCO ₃	2.5 mM

De cada uno de los tratamientos se midió la tasa de fotosíntesis por evolución de O₂ a una irradiancia de 230 μ moles de fotones m⁻² s⁻¹, como se detalla en el apartado 4.1. “Medida de fotosíntesis por desprendimiento de O₂”. Además se estimó la ACAext (REA g⁻¹ PF) a cada una de las salinidades por el método potenciométrico, descrito en el apartado 5.1. “Ensayos de la Actividad Anhidrasa Carbónica Externa (ACAext)”.

2.8.2.- Medida de la tasa fotosintética y la actividad CAext en medio con distinta carga iónica

El efecto de la salinidad y osmolaridad se relacionó con la posible presencia de canales de incorporación de Ci dependientes de iones en las especies estuáricas del presente estudio. Las algas, previamente aclimatadas como se indica en apartados anteriores, fueron incubadas durante 12 horas en cilindros de plexiglás, a 15°C de temperatura, a una irradiancia de 230 μ moles de fotones m⁻² s⁻¹. Se proporcionó además agitación constante mediante burbujeo de aire a un flujo de 1 L min⁻¹. Las incubaciones se hicieron en tres condiciones de salinidad diferentes: 20, 36 y 45, como se observa en la figura 17. Para ello se preparó ASW a una salinidad de 36, según la receta de la tabla 4, y se diluyó con agua destilada y se añadió NaCl para alcanzar las salinidades de 20 y 45,

Material y Métodos

respectivamente. A cada una de estas tres salinidades le corresponde una osmolaridad de 0.6, 1.1 y 1.5 Osmol kg⁻¹, que se midió con un osmómetro crioscópico (Osmomat 030, Gonotec GmbH).

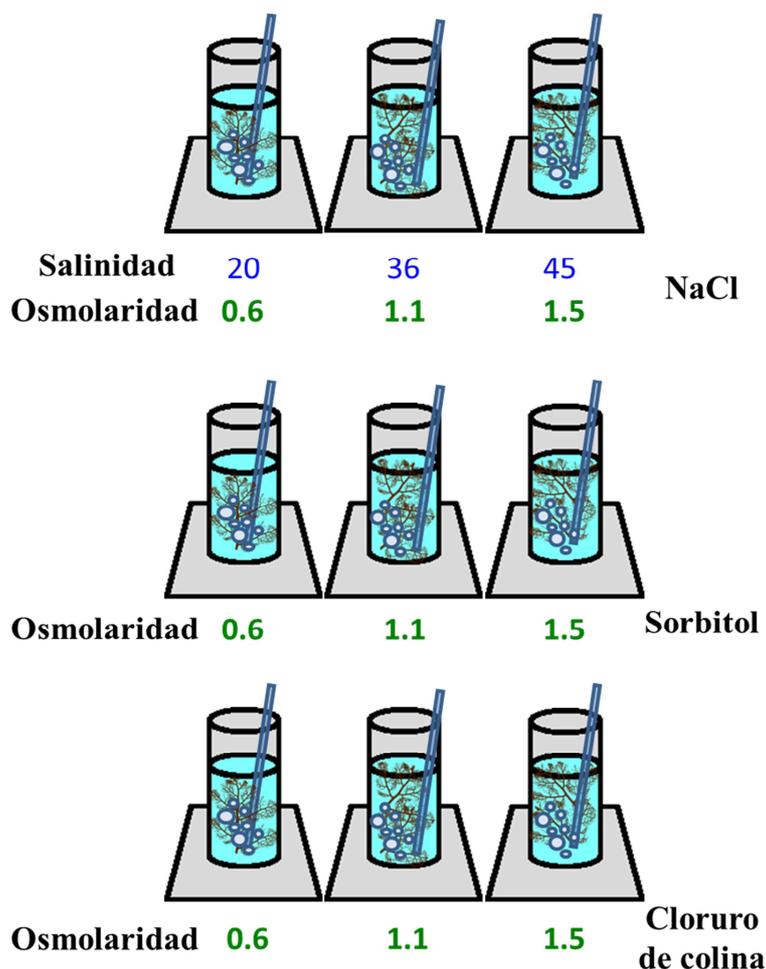


Figura 17. Esquema de los cultivos con distintos tratamientos (NaCl, Sorbitol y Cloruro de colina) y a la osmolaridad correspondiente a las salinidades 20, 36 y 45 utilizados para medir su tasa fotosintética como evolución de O₂ e incorporación de Ci y para estimar su ACAext.

Además, se utilizó sorbitol, un polialcohol que se encuentra de forma natural en las algas rojas, para simular las osmolaridades correspondientes a cada una de las salinidades ensayadas, eliminando los iones Cl⁻ y Na⁺ del medio. Para la preparación de

este medio se utilizó la receta detallada en la Tabla 5, que corresponde aproximadamente a un 1 Osmol kg⁻¹. Se diluyó con agua destilada y se añadió sorbitol para conseguir las osmolaridades de 0.6, 1.1 y 1.5 Osmol kg⁻¹. Por último, se usó cloruro de colina, compuesto orgánico inocuo para las plantas que posee el anión Cl⁻ y está desprovisto del catión Na⁺, con el que también se ajustó la osmolaridad a los valores dados por las distintas salinidades. En este caso, el medio de ensayo fue el descrito en la Tabla 6, consiguiendo una osmolaridad de 1.1 Osmol kg⁻¹. Añadiendo agua destilada se alcanzó la osmolaridad de 0.6 Osmol kg⁻¹, mientras que la osmolaridad de 1.5 Osmol kg⁻¹ se consiguió añadiendo cloruro de colina hasta alcanzar una concentración de 0.75 M y en este caso hubo que añadir una pequeña cantidad de sorbitol para alcanzar la osmolaridad deseada sin aumentar la concentración de iones Cl⁻.

Tabla 5. Composición del agua de mar con sorbitol empleada en los experimentos a osmolaridad constante en ausencia de iones Na⁺ y Cl⁻.

Medio con Sorbitol	
Sorbitol	0.8 M
K ₂ SO ₄	0.01 M
CaSO ₄ * 2H ₂ O	0.01 M
MgSO ₄	0.037 M
KHCO ₃	2.5 mM

Una vez incubadas las algas a las distintas condiciones de salinidad y/o osmolaridad, de cada cilindro se tomaron: 0.08 g PF por réplica (n=4) para el análisis de la ACAext por el método potenciométrico descrito anteriormente. Por otra parte, se utilizaron 0.015-0.020 g PF por réplica (n=3) para la medida de la tasa de fotosíntesis como evolución de O₂ en las cámaras Hansatech, utilizándose para ello 1.5 mL del mismo medio en el que se había incubado el alga en cada medida. Por último, se utilizaron 0.30 g PF por réplica (n=3) para la medida de la tasa de fotosíntesis como incorporación de Ci utilizando un IRGA en modo abierto, usándose en este caso se utilizaron 30 mL del mismo medio en el que se había incubado cada réplica.

Tabla 6. Composición del agua de mar con cloruro de colina empleada en los experimentos a osmolaridad constante en ausencia de iones Na^+ .

Medio con Cloruro de colina	
Cloruro de colina	0.5 M
KCl	0.01 M
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 M
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7 mM
MgSO_4	0.03 M
KHCO_3	2.5 mM

2.9.- Tratamiento estadístico de los datos

Todos los valores se presentan como la media de entre 3 y 4 medidas obtenidas de muestras independientes. Las medias se presentan junto con la desviación estándar (SD). Para comparar las medias de los distintos inhibidores y ambas especies, se usaron ANOVAs de dos vías seguidos por un test a posteriori (Student- Newman- Keuls, SNK).

Se empleó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías para los experimentos realizados en el IRGA con los distintos inhibidores. Para el análisis de la concentración de Rubisco se realizó un ANOVA de dos vías y un test a posteriori (SNK). En los experimentos de salinidad se utilizaron ANOVAs de dos vías para las medidas de ACAext y fotosíntesis a distintas salinidades y de tres vías para las medidas de ACAext y tasa de fotosíntesis y respiración a tres osmolaridades utilizando sorbitol y cloruro de colina.

Todas las pruebas y procedimientos estadísticos usados han sido descritos por Sokal y Rohlf (1995). Para todo ello se utilizó el programa estadístico Sigmaplot 11 (Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA). El nivel de significación considerado fue $\alpha = 0.05$.

3. - Resultados

3.1.- Características generales de la zona de muestreo

Las características climáticas del estuario del río Palmones, con precipitaciones medias y suaves temperaturas en invierno y escasas lluvias y temperaturas máximas superiores a 30°C en verano, son, si no únicas, particulares. Es además un estuario mediterráneo con mareas apreciables, con notable influencia atlántica en sus elementos y comunidades naturales. Dichas características facilitan la presencia de algas atlánticas en esta región biogeográfica, como *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, que están adaptadas a vivir bajo régimen mareal y a soportar amplios rangos de salinidad, como consecuencia de la fuerte evaporación y consiguiente concentración de sales en la superficie de sus talos, y supuestamente de pH al mezclarse CO₂ atmosférico en el agua básica que contiene principalmente bicarbonatos. Estos cambios tienen un componente regular y predecible relacionado con el ritmo mareal, y otro aleatorio en relación con escalas de espacio y de tiempo menores que las que pautan las mareas.

Dichas condiciones influirán en las funciones vitales, al menos en la fotosíntesis y en los mecanismos de incorporación de carbono de las especies objeto de estudio, como se refleja en los resultados que se presentan a continuación, y que consisten en medir la fotosíntesis directamente como emisión de O₂ y como incorporación de Ci, o bien indirectamente a través de la actividad de las enzimas que incorporan sus sustratos potenciales, o de modo aún más indirecto, a través de las variaciones de pH del medio, que informan sobre las especies de Ci que utilizan.

3.2.- Actividad Anhidrasa Carbónica en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*

En la tabla 7 se recogen los valores de ACAext y ACAtotal en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. La ACAext, determinada usando talos intactos de las dos especies, varió significativamente a lo largo de las medidas realizadas en distintos meses durante dos años. Se diferenciaron claramente dos rangos de valores, obtenidos como promedio de alrededor de 20 medidas para cada uno de los rangos, que no guardaron correspondencia con la época del año o la temperatura (datos no mostrados). No se trató, por tanto, de una variación estacional de la ACAext, pero se observó que en todas las medidas realizadas, la ACAext de *B. scorpioides* fue mayor que la de *C. caespitosa*. Mientras que en algunos de los muestreos las medidas de ACAext alcanzaron valores de 29.43 ± 8.26 REA g⁻¹ PF

Resultados

en *B. scorpioides* y 9.31 ± 2.91 REA g⁻¹ PF en *C. caespitosa*, en otras ocasiones, dicha actividad enzimática fue significativamente menor, de 8.82 ± 2.08 REA g⁻¹ PF en *B. scorpioides* y 1.65 ± 0.48 REA g⁻¹ PF en *C. caespitosa*. Sin embargo, no se dieron diferencias en la ACAtotal, con valores cercanos en ambos casos a 200 REA g⁻¹ PF, con lo que casi toda la ACA de ambas especies se localiza en el interior celular.

Tabla 7. Valores de Actividad Anhidrasa Carbónica Externa y Total (REA g⁻¹ PF) en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre ambas especies.

Especie	Actividad CAext (REA g ⁻¹ PF)		Actividad CAtotal (REA g ⁻¹ PF)
<i>B. scorpioides</i>	29.43 ± 8.26*	8.82 ± 2.08*	197.88 ± 26.83
<i>C. caespitosa</i>	9.31 ± 2.91*	1.65 ± 0.48*	190.81 ± 9.76

3.3.- Efecto de la adición de concentraciones crecientes de varios inhibidores sobre la fotosíntesis y la ACA

Se utilizaron concentraciones crecientes de inhibidores específicos de distintos procesos sobre la tasa fotosintética medida como evolución de O₂ y sobre la ACAext. Así se obtuvo la mínima concentración de cada inhibidor a la que se daba la mayor inhibición de cada variable para ambas especies.

Dicha concentración se utilizó posteriormente para estudiar el efecto de dichos inhibidores sobre la medida directa de tasa de fotosíntesis como incorporación de Ci y también sobre la ACAtotal.

3.3.1.- Efecto de la adición de concentraciones crecientes de varios inhibidores sobre la fotosíntesis, como evolución de O₂

3.3.1.1.-Efecto de la inhibición de la CA

Como se observa en las figuras 18 y 19 (a, b y c), en la mayoría de los casos, la adición de distintas concentraciones de inhibidores específicos de la ACAext (AZ y DBS) y total (EZ), inhibió sólo parcialmente la actividad fotosintética de *B. scorpioides* y *C. caespitosa*.

Tras el tratamiento con AZ, se observó que la inhibición máxima alcanzada en la tasa fotosintética con respecto al control fue del 51.01 ± 4.36 % en *B. scorpioides* (Figura 18a) y del 59.92 ± 1.91 % en *C. caespitosa* (Figura 19a). Ambos valores fueron significativamente distintos entre sí y se alcanzaron a una concentración final de AZ 100 μ M.

La adición de DBS supuso una disminución de la tasa fotosintética en *B. scorpioides*, en este caso de un 30.94 ± 9.16 % (Figura 18b), siendo este porcentaje significativamente menor que en el caso de AZ. Por el contrario, el efecto observado tras la aplicación de DBS en *C. caespitosa* (Figura 19b) no fue la inhibición de la tasa fotosintética sino la estimulación de ésta en un porcentaje elevado (71.71 ± 8.53 %).

La adición de EZ, que afecta tanto a la AC externa como a la interna por ser la membrana plasmática ciertamente permeable a esta sustancia, redujo significativa aunque no totalmente la actividad fotosintética de ambas especies. En este caso, al igual que para AZ, fueron necesarios 100 μ M de EZ para alcanzar la máxima inhibición, siendo ésta sólo del 63.22 ± 2.19 % en *B. scorpioides* (Figura 18c) y del 68.51 ± 8.13 % en *C. caespitosa* (Figura 19c) con respecto al control. El efecto producido por dicho inhibidor sobre la tasa fotosintética como evolución de O₂ en ambas especies no fue significativamente distinto.

3.3.1.2.- Efecto de la inhibición de los mecanismos de incorporación de HCO_3^- en simporte con Na^+

Los efectos de la MON sobre la evolución de O_2 fotosintético han sido representados en las figuras 18d y 19d. Se observó que el inhibidor de los canales en los que existe simporte $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$ tiene un efecto negativo sobre la TFN en ambas especies. El máximo porcentaje de inhibición que presentan se alcanza a una concentración final de 100 mM de MON, siendo este porcentaje significativamente mayor en *B. scorpioides* (99.23 ± 1.10 %) que en *C. caespitosa* (74.20 ± 9.21 %). Cabe destacar, sin embargo, que a bajas concentraciones de este inhibidor, se observó un ligero, aunque no significativo, incremento de la tasa fotosintética, que comenzó a verse inhibida solamente a partir de 0.03 mM, coincidiendo esta concentración inhibitoria en ambas especies.

3.3.1.3.-Efectos de la inhibición de los canales aniónicos

Los resultados obtenidos con la adición de DIDS indican que ninguna de las dos especies posee canales aniónicos o que son muy poco activos, porque la inhibición de la fotosíntesis fue muy baja, del 9.28 ± 1.17 % en *B. scorpioides* (Figura 18e). En *C. caespitosa* (Figura 19e) el efecto del inhibidor sobre la tasa fotosintética no mostró tendencias claras aunque sí se observó un incremento de la evolución de O_2 .

3.3.1.4.-Efecto de la inhibición de la bomba de H^+ -ATPasa tipo P

El VAN actúa de forma específica sobre la bomba H^+ -ATPasa tipo P. Tanto en la figura 18e como en la figura 19e se observa un incremento de la fotosíntesis de ambas especies tras la adición de Vanadato. Los porcentajes de este aumento en el desprendimiento de O_2 oscilaron entre 0.51 ± 1.83 % y 13.82 ± 0.96 % en *B. scorpioides* y entre 14.75 ± 4.16 % y 39.18 ± 4.83 % en *C. caespitosa*, siendo dicho incremento de la fotosíntesis significativamente mayor en el caso de *B. scorpioides*.

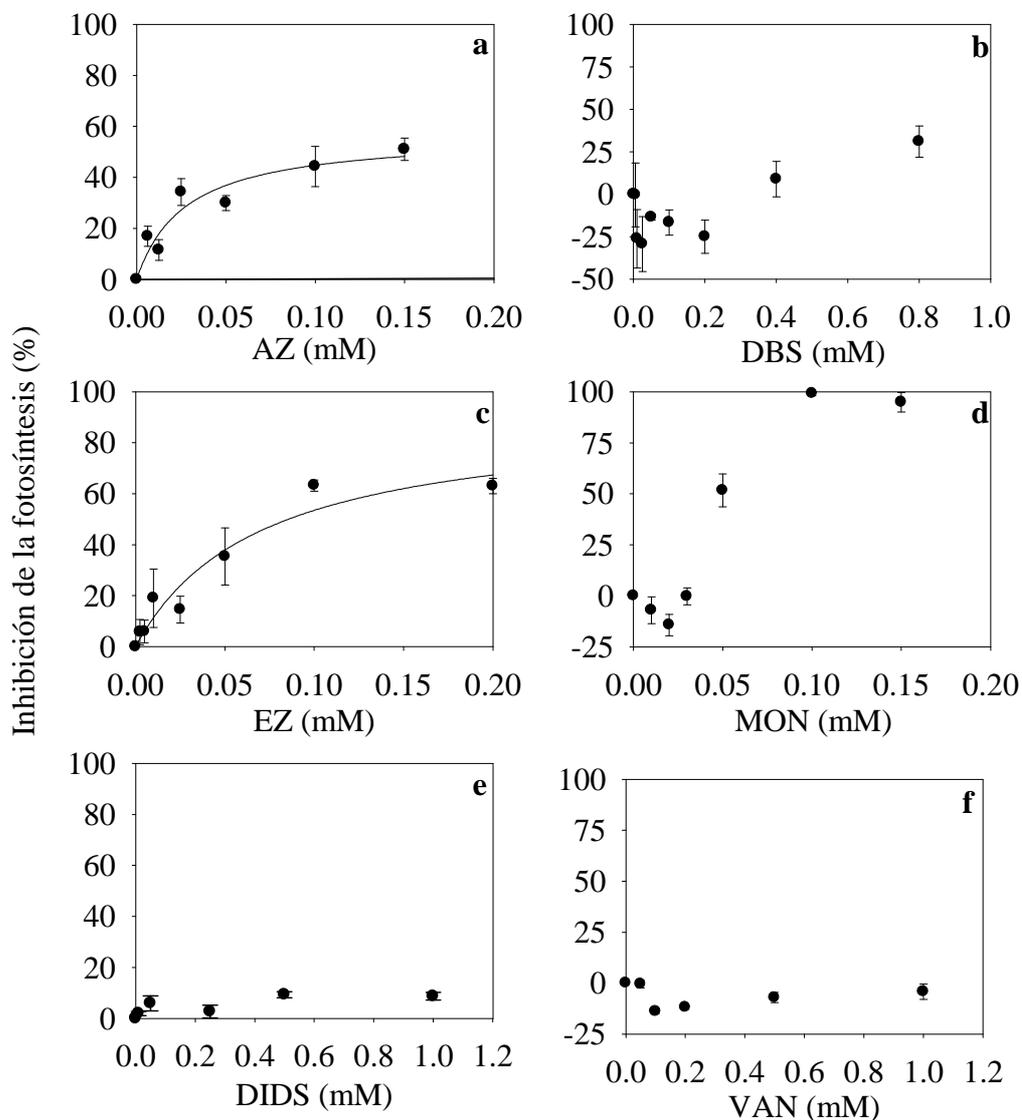


Figura 18. Porcentaje de inhibición de la tasa de fotosíntesis (evolución de O_2) en *B. scorpioides* con respecto al control, con concentraciones crecientes de inhibidores específicos de la enzima CAext (AZ; a y DBS; b), de la CAtotal (EZ; c), de los canales por los que el HCO_3^- entra en simporte con Na^+ (MON; d), de los canales aniónicos (DIDS; e) y de la bomba H^+ -ATPasa tipo P (VAN; f). Las barras verticales representan la desviación estándar (n=4).

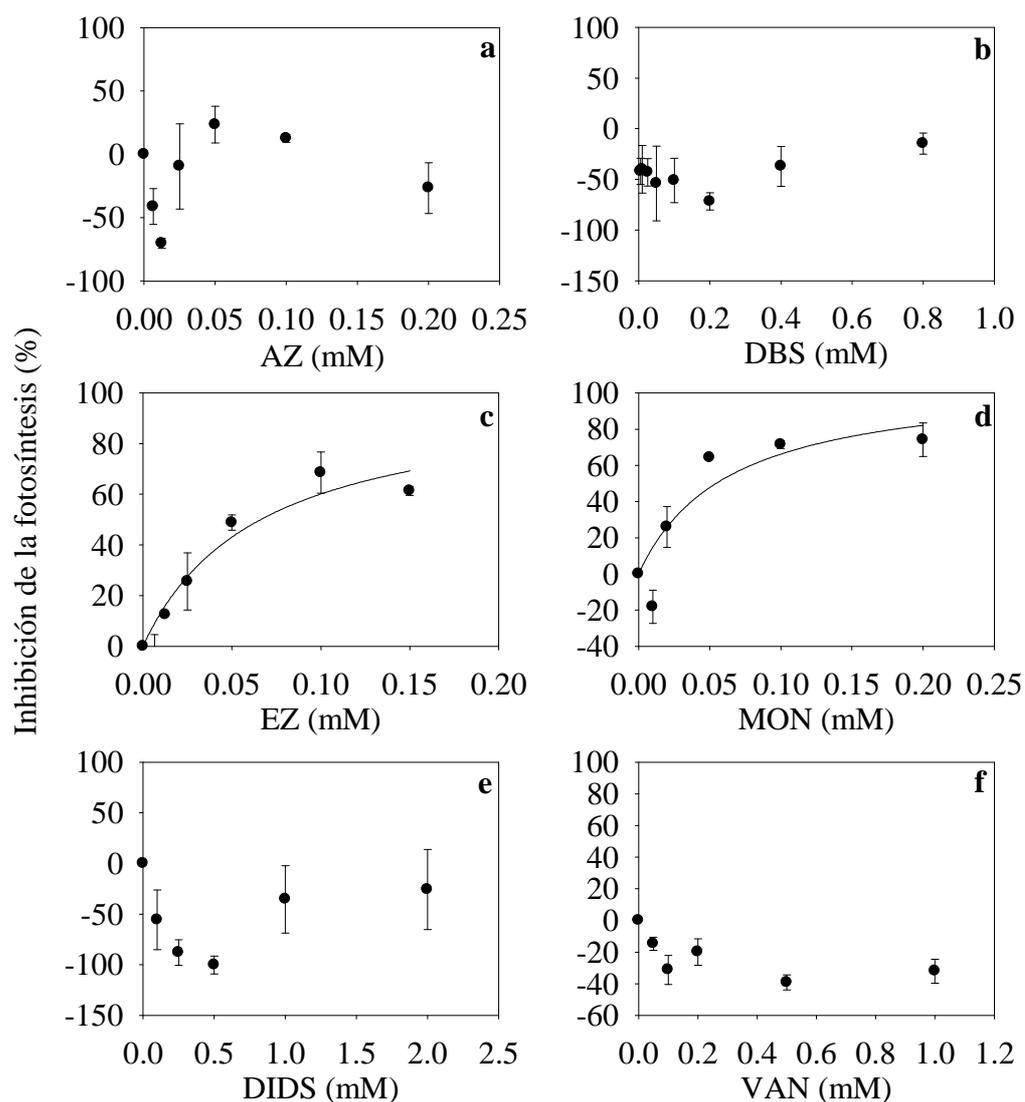


Figura 19. Porcentaje de inhibición de la tasa de fotosíntesis (evolución de O_2) en *C. caespitosa* con respecto al control, frente a concentraciones crecientes de inhibidores específicos de la enzima CAext (AZ; a y DBS; b), de la CAtotal (EZ; c), de los canales por los que el HCO_3^- entra en simporte con Na^+ (MON; d) de los canales aniónicos (DIDS; e) y de la bomba H^+ -ATPasa tipo P (VAN; f). Las barras verticales representan la desviación estándar (n=4).

3.3.2.- Efecto de la adición de concentraciones crecientes de varios inhibidores sobre la actividad anhidrasa carbónica externa (ACAext)

3.3.2.1.- *Efecto de los inhibidores de la ACAs*

La inhibición directa de la incorporación de Ci usando inhibidores de las ACAs por AZ, DBS y EZ fue parcial (Figuras 20 y 21 a, b). Con AZ, se observaron respuestas significativamente distintas en *B. scorpioides* y en *C. caespitosa*. La máxima inhibición fue de un 73.01 ± 28.98 % en *B. scorpioides* y sólo un 18.28 ± 30.28 % en *C. caespitosa*. Ambos valores se alcanzaron a una concentración de 0.8 mM de AZ, es decir, con la máxima ensayada. Por otro lado, el uso de DBS supuso, al igual que con AZ, una mayor inhibición de la ACAext en *B. scorpioides* que en *C. caespitosa*. En esta última, sólo se consiguió una inhibición significativa a una concentración de DBS de 0.2 mM (39.57 ± 4.17 %), mientras que a mayores concentraciones se dio un aumento de la ACAext. En *B. scorpioides*, la máxima inhibición se alcanzó a una concentración de DBS de 0.4 mM y con un porcentaje del 64.12 ± 3.12 % (Figura 20b). En cuanto al efecto de EZ sobre la ACAext, los valores de inhibición no fueron significativamente distintos en ambas especies. Los porcentajes máximos alcanzados fueron 71.67 ± 9.04 % en *B. scorpioides* y 52.81 ± 26.18 % en *C. caespitosa* (Figura 20c y 21c). Dicha inhibición se logró con una concentración de 50 μ M del inhibidor. La inhibición máxima inducida por EZ fue superior a la observada para AZ en el caso de *C. caespitosa*, lo cual confirma que la fracción interna de la CA tiene un papel importante en esta especie. En resumen, la inhibición de las actividades enzimáticas CA por sus inhibidores específicos no fue regular y siguió pautas que no permiten una descripción de su efecto de modo general.

3.3.2.2.- *Efecto del inhibidor de la incorporación de HCO_3^- en simporte con Na^+*

En las figuras 20d y 21d, se muestran las cinéticas de ACAext con MON. Los resultados de su efecto sobre la ACAext obtenidos para *B. scorpioides* muestran que dicha actividad aumentó en presencia de la MON. Por el contrario, en *C. caespitosa* la ACAext alcanzó un porcentaje máximo de inhibición del 52.34 ± 24.13 % para una concentración de 300 μ M de MON.

3.3.2.3.- Efecto del inhibidor de los canales aniónicos

El inhibidor DIDS, a diferencia de lo que ocurría con su efecto sobre la tasa de fotosíntesis por evolución de O₂, produjo una reducción de la ACAext en *B. scorpioides* de un 70.13 ± 18.1% a una concentración de 1 mM (Figura 20e), mientras que en *C. caespitosa* la ACAext no se vio afectada por dicho inhibidor (Figura 21e).

3.3.2.4.-Efecto del inhibidor de la bomba de H⁺-ATPasa

Por su elevado tamaño la molécula de Ortovanadato sódico penetra con dificultad en la célula, lo que produce resultados variables tras su aplicación en los distintos individuos utilizados, de ahí la elevada varianza de los valores de porcentaje de inhibición (especialmente en *B. scorpioides*). El efecto de dicho compuesto sobre la ACAext fue muy irregular, mientras que a algunas de las concentraciones ensayadas (0.05 y 0.2 mM) se obtuvo un incremento de la fotosíntesis, en otras (0.1 y 0.5 mM) su efecto fue prácticamente nulo, repitiéndose este patrón en ambas especies (Figuras 20f y 21f).

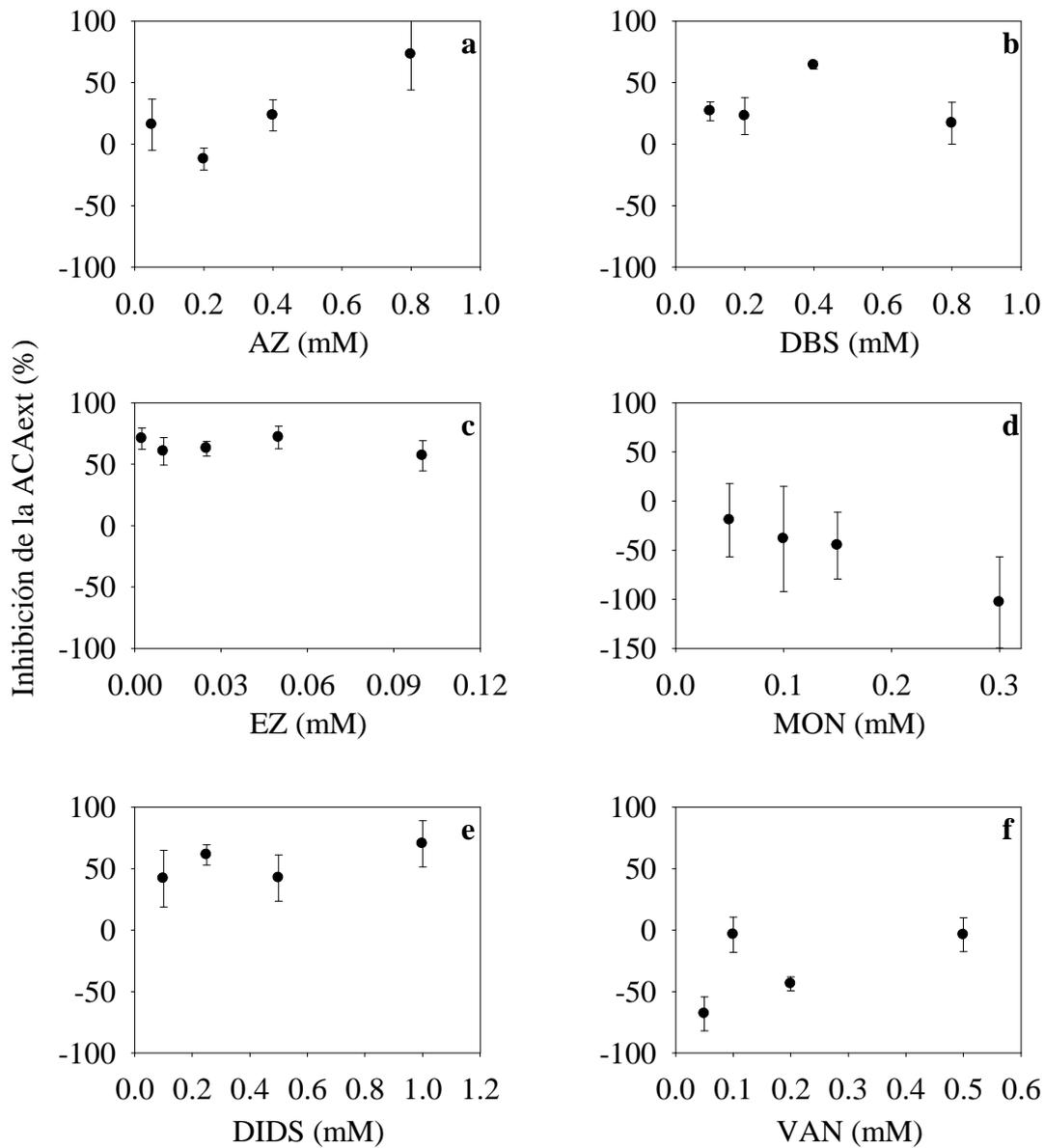


Figura 20. Porcentaje de inhibición de la ACAext (REA g⁻¹ PF) de la especie *B. scorpioides* en presencia de concentraciones crecientes de inhibidores específicos de la enzima CAext (AZ; a y DBS; b), de la CAtotal (EZ; c), de los canales por los que el HCO₃⁻ entra en simporte con Na⁺ (MON; d), de los canales aniónicos (DIDS; e) y de la bomba H⁺-ATPasa tipo P (VAN; f).

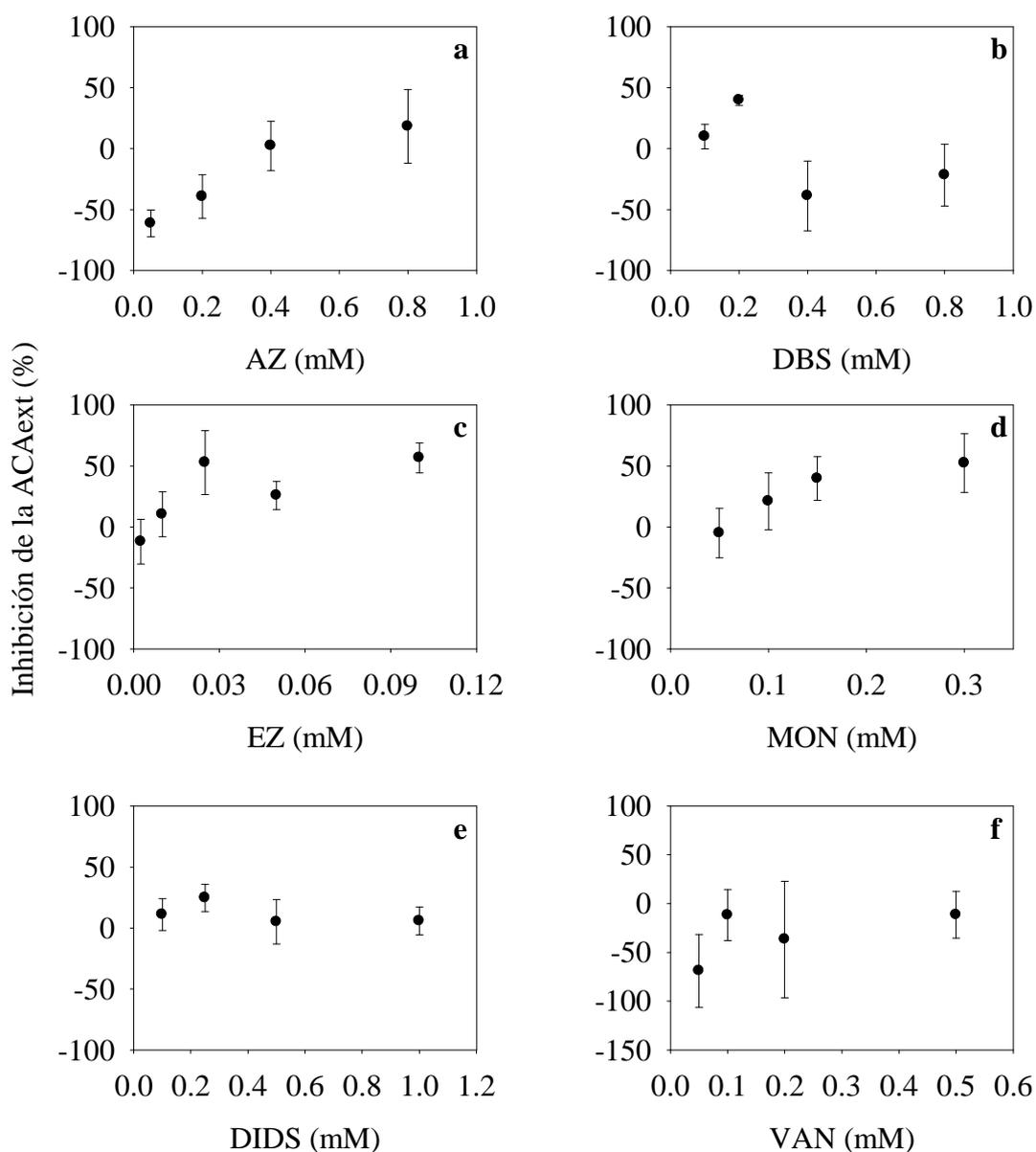


Figura 21. Porcentaje de inhibición de la ACAext (REA g⁻¹ PF) en *C. caespitosa* en presencia de concentraciones crecientes de inhibidores específicos de la enzima CAext (AZ; a y DBS; b), de la CATotal (EZ; c), de los canales por los que el HCO₃⁻ entra en simporte con Na⁺ (MON; d), de los canales aniónicos (DIDS; e) y de la bomba H⁺-ATPasa tipo P (VAN; f).

3.3.3.- Efecto de los inhibidores sobre la actividad ACAtotal

Se utilizó la concentración de mayor inhibición según las cinéticas de la ACAext para estudiar el efecto de cada inhibidor sobre la ACAtotal. En *B. scorpioides* se observaron los mayores porcentajes de inhibición de la ACAtotal con respecto al control al incubar las algas con AZ (88.2 ± 4.27 %) y EZ (78.24 ± 3.43 %). Estos valores fueron significativamente mayores que los observados con DBS, MON y DIDS, los cuales disminuyeron la ACAtotal solamente en un 20% (27.26 ± 9.61 %, 20.41 ± 2.65 % y 18.97 ± 13.24 %, respectivamente; Figura 22).

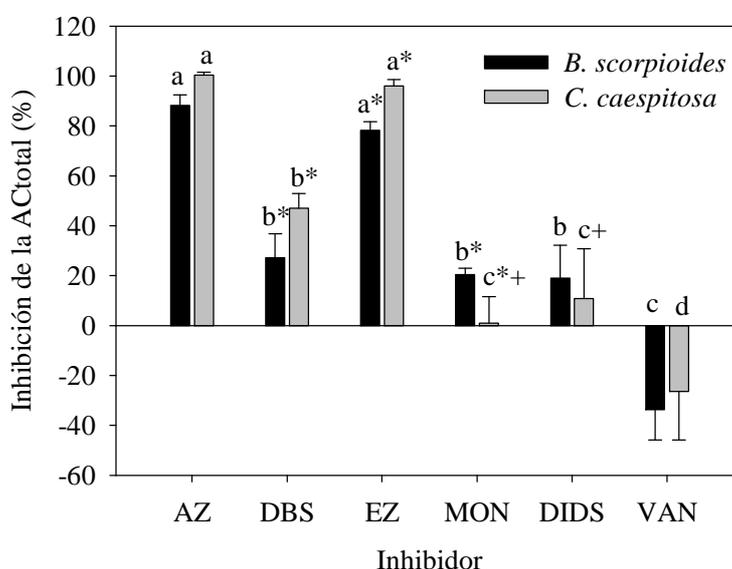


Figura 22. Porcentaje de inhibición de la ACAtotal (REA g^{-1} PF) con respecto al control en ambas especies. Los valores son medias de entre 4 y 5 réplicas \pm SD. Las diferencias significativas entre inhibidores están expresadas mediante letras, y mediante un asterisco (*) se han indicado las diferencias significativas entre ambas especies. Además se ha utilizado un símbolo (+) para señalar aquellos casos en los que no existen diferencias con el control.

Los resultados en *C. caespitosa* muestran al igual que en *B. scorpioides*, el mayor tanto por ciento de inhibición debido a AZ (100.41 ± 1.24 %) y EZ (95.75 ± 2.76 %), lo que supone una inhibición completa de la ACAtotal en esta especie. Por otro lado, el uso

Resultados

de DBS produjo una inhibición significativamente menor y parcial de esta actividad, con valores de 47.08 ± 5.89 %. El efecto observado en MON y DIDS fue muy inferior, 0.97 ± 10.69 % y 10.81 ± 20.02 %, respectivamente, no siendo esta actividad significativamente diferente del control. Por el contrario, el VAN presentó de nuevo una respuesta inespecífica y distinta al resto de compuestos en ambas especies, con un incremento de la ACAtotal de un 33.64 ± 12.14 % en *B. scorpioides* y del 26.38 ± 19.54 % en *C. caespitosa*.

En cuanto a las diferencias entre ambas especies, la inhibición con DBS y EZ fue significativamente mayor en *C. caespitosa* que en *B. scorpioides*, mientras que con MON se encontró lo contrario, siendo la inhibición en *C. caespitosa* casi nula. No se encontraron diferencias significativas entre ambas especies para el resto de tratamientos.

3.3.4.- Efecto de los inhibidores sobre la tasa de fotosíntesis como intercambio de Ci

El porcentaje de inhibición de la incorporación de Ci tras la adición de inhibidores específicos de los canales de incorporación del mismo se muestra en la figura 23. En ambas especies, AZ, EZ y DBS tuvieron un efecto significativo sobre la incorporación de CO₂, mientras que no se observó ningún efecto significativo al adicionar MON, DIDS y VAN. En concreto, la incorporación de Ci disminuyó alrededor de un 80% con el uso de inhibidores de la ACAext y/o total (AZ y EZ) en *B. scorpioides*. En *C. caespitosa* la mayor inhibición se observó al añadir AZ, con un 80.1 ± 7.7 %, no siendo significativamente diferente del obtenido con EZ (72.5 ± 3.3 %). El DBS supuso una disminución del 65.5 ± 1.2 %, valor significativamente inferior al obtenido por AZ a pesar de que ambas sustancias bloquean específicamente la ACAext, que como ya se describió anteriormente es muy baja para esta especie. No se observaron, sin embargo, diferencias significativas entre ambas especies.

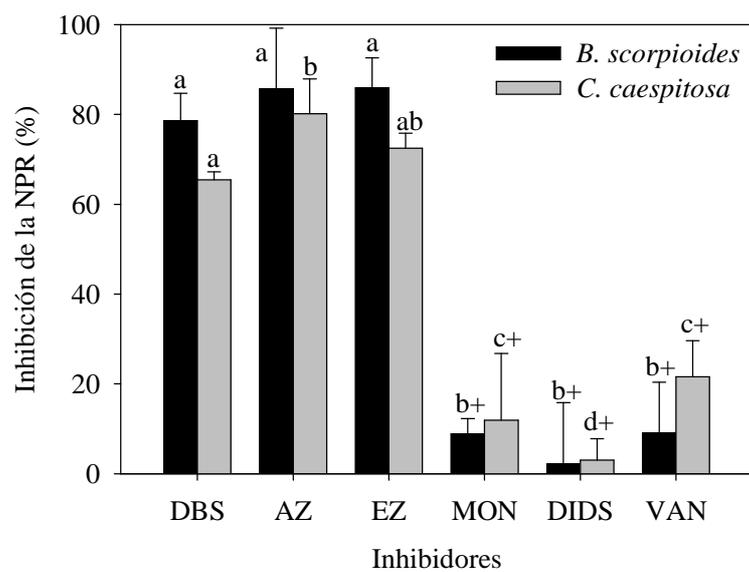


Figura 23. Efecto de los distintos inhibidores sobre la TFN (incorporación de Ci), expresado como porcentaje de inhibición respecto al control ($n=3 \pm SD$). Las diferencias significativas entre inhibidores se representan con letras, mientras que el símbolo (+) indica aquellos inhibidores cuyo efecto no difiere del control.

3.4.- Inorganic Carbon Uptake

3.4.1.- P-C curves

The response of photosynthesis to increasing C_i concentrations in *B. scorpioides* and *C. caespitosa* is shown in figure 24. Photosynthesis saturation was not achieved at an inorganic C_i concentration of 2.1 mM, the expected natural concentration in natural seawater at pH 8.1, in any of the two species. The saturation was reached at 4 mM, the highest C_i concentration tested, which is twice the natural seawater concentration.

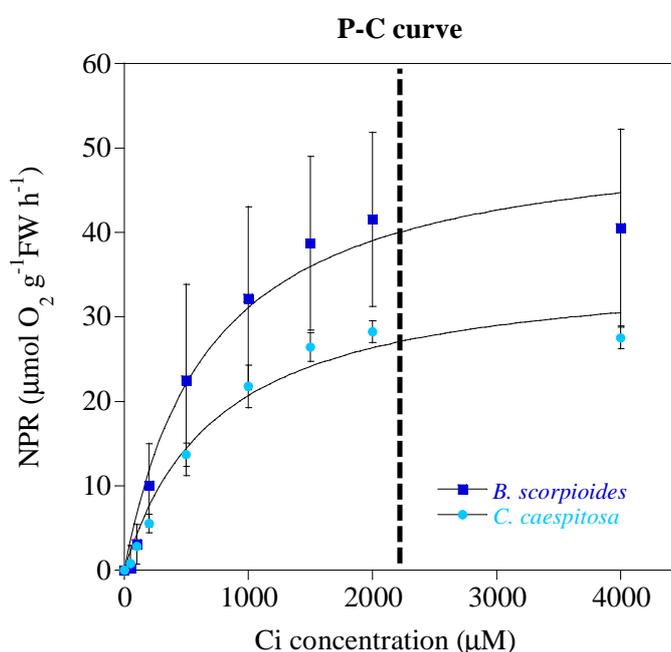


Figure 24. Response of photosynthesis to increasing inorganic carbon concentration in *B. scorpioides* and *C. caespitosa*. Curves were fitted to the Michaelis–Menten model. Photosynthetic conductance for C_i and K_m were obtained from the model. The vertical line indicates the theoretical NSW C_i concentration (2.1-2.2 mM).

The maximum net photosynthetic rate (NPR_{max}) reached was not significantly different between both species (t-test; $P > 0.05$; Table 8). Likewise, no differences were found among the K_m averages (Table 8) since a very high variability was observed, especially for *B. scorpioides*. The photosynthetic conductance (g_p) for C_i obtained for *B. scorpioides* was higher than for *C. caespitosa*. However, no significantly differences

were observed among conductances for CO₂, which values were higher than those for Ci (Table 8).

In short, the photosynthetic response to Ci was very similar in both species, with the only difference found in the conductance for Ci.

Table 8. Maximum net photosynthetic rate, half-saturation point for inorganic carbon (Ci) and photosynthetic conductance for Ci and CO₂ obtained from the P–C curves. Data are means of 3 independent replicates ± SD. Values of conductances are x10⁻⁶. Asterisks refer to differences between both species.

Species	NPR _{max} (μmol O ₂ g ⁻¹ FW h ⁻¹)	K _m (Ci) (μM)	g _p Ci (m s ⁻¹)	g _p CO ₂ (m s ⁻¹)
<i>B. scorpioides</i>	55.55 ± 18.63	844.3 ± 614.6	0.93 ± 0.15*	143.17 ± 36.50
<i>C. caespitosa</i>	36.32 ± 1.20	759.9 ± 70.8	0.68 ± 0.05*	111.09 ± 9.29

3.4.2.- pH and alkalinity

The evolution of pH and alkalinity of the medium where *B. scorpioides* and *C. caespitosa* were measured. An expected increase of the pH in the NSW was recorded as a consequence of the algal photosynthesis in all the experiments. Alkalinity in the NSW remained stable throughout the assay with similar values in both species (2.30 ± 0.07 mmol L⁻¹; n=6; P>0.05).

3.4.3.- pH compensation point calculated from pH-drift experiments

Three variables are plotted in figure 25: (a) NPR recorded as oxygen evolution calculated every two minutes from every second measurements; (b) pH values from the incubation medium measured every second and (c) NPR as CO₂ uptake, calculated from pH data.

Resultados

An initial increase was observed in the NPR reaching the highest values along the experiment of $53.74 \pm 12.29 \mu\text{mols O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ for *B. scorpioides* and $32.61 \pm 5.44 \mu\text{mols O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ for *C. caespitosa*. These averaged values are in agreement with those obtained previously in the P-C curves, but in this case they were significantly higher in *B. scorpioides* than in *C. caespitosa*. After the maximum NPR value was achieved, it progressively decreased to zero in about 7 hours for *B. scorpioides* and faster in *C. caespitosa* (in about 4 hours).

In relation to the initial pH of 8.1, the increase of pH was faster in *B. scorpioides*, in agreement to a higher NPR (O_2). Moreover, the final pH achieved by this two species was significantly higher in *B. scorpioides* than in *C. caespitosa*. This final pH values, reached after about 12 hours in a closed system, were considered to be the pH compensation points since they remained in steady state for one hour. The pH compensation points for *B. scorpioides* and *C. caespitosa* were 9.03 ± 0.03 and 8.91 ± 0.01 , respectively. Although it could have been considered that the pH compensation point was reached when the NPR was zero, from 5 to 10 hours for *B. scorpioides* and from 1 to 3 hours in *C. caespitosa*, the pH continued increasing for 12 hours until a constant value was achieved (Figure 25).

CO_2 uptake rates were significantly lower than O_2 evolution rates during all the experiments. The higher values were achieved during the first 40 minutes of the experiments for both species and then they decreased down to values near zero. Therefore, the net gas exchange in the final phase of the experiment was zero (Figure 25).

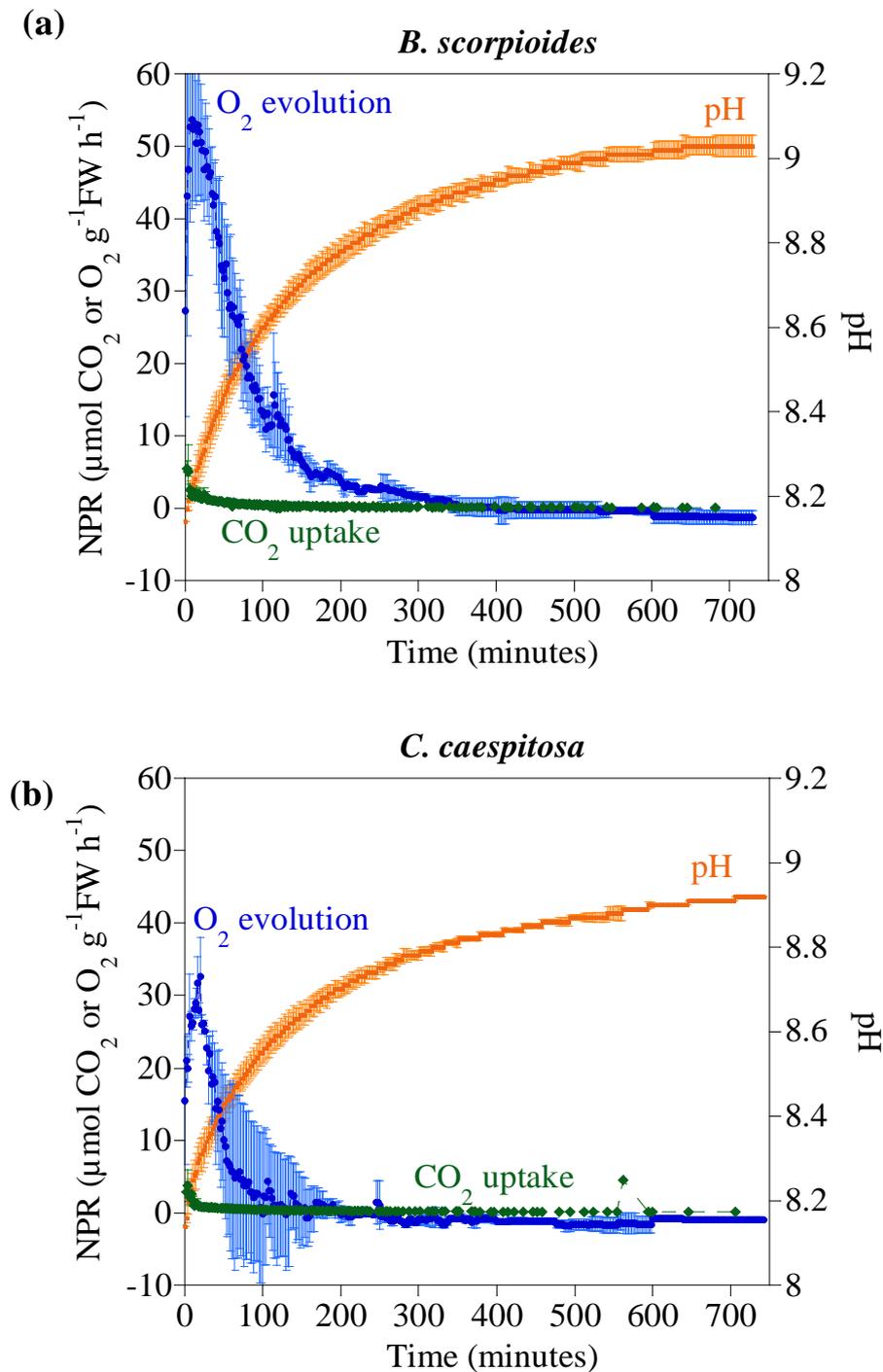


Figure 25. Changes in the pH and net photosynthetic rate (NPR) as O₂ evolution and CO₂ uptake along 12 hours in the NSW incubated with *Bostrychia scorpioides* (a) and *Catenella caespitosa* (b). pH compensation point for both species was calculated from these results. Data are represented every 2 minutes as the mean of 3 independent replicates \pm SD.

3.4.3.1.- Photosynthetic quotient (PQ)

The photosynthetic quotient, calculated from the first two minutes of NPR of the pH-drift measurements, is presented in table 9. It was assumed that the pH of the water where the algae were incubated remained stable for this time. NPR values presented in table 9 showed differences between the measured O₂ evolution and the CO₂ uptake calculations being the O₂ evolution significantly higher ($P < 0.05$) than the corresponding calculated CO₂ ones. From the mentioned values of initial NPRs, PQ was calculated showing no significant differences between both species ($P > 0.05$).

Table 9. Initial NPR (net photosynthetic rate) estimated as O₂ evolution and also as CO₂ uptake (first two minutes), from the pH-drift experiments, and photosynthetic quotient (PQ) in *B. scorpioides* and *C. caespitosa*. Data were calculated as mean values of 3 replicates \pm SD. Values of NPRs with different letter are significantly different for each species. Asterisks refer to differences between both species.

Species	O ₂ evolution rate ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$)	Calc CO ₂ uptake rate ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$)	PQ
<i>B. scorpioides</i>	35.15 \pm 3.29 ^{a*}	5.06 \pm 0.94 ^{b*}	0.14 \pm 0.04
<i>C. caespitosa</i>	18.59 \pm 4.48 ^{a*}	2.82 \pm 1.33 ^{b*}	0.17 \pm 0.09

3.4.3.2.- Changes in Ci species concentration along the pH-drift experiment

As it is showed in figure 26, the most abundant Ci form along the whole experiment was HCO₃⁻ since the range of pH at which it was performed was 8.14 - 9.03 for *B. scorpioides* and 8.14 - 8.91 for *C. caespitosa*. As time passed by, the pH in the water increased due to the photosynthetic activity and the HCO₃⁻ concentration gradually decreased, due to HCO₃⁻ uptake and/or spontaneous dehydration of this Ci form. After almost 12 hours of incubation, initial values of 1850 μM HCO₃⁻ diminished to 756.4 \pm 30.1 μM in *B. scorpioides* which corresponds to a 59.3 % of the HCO₃⁻ decrease and to 910.5 \pm 9.24 μM in *C. caespitosa* which means a 51 % reduction. This final HCO₃⁻ value is considered the HCO₃⁻ compensation point and was significantly lower in *B. scorpioides*

than in *C. caespitosa*. To discern whether the C_i uptake was due to the plant activity or to the HCO_3^- spontaneous dehydration (HCO_3^- SpD), this rate of HCO_3^- SpD was calculated. No significant differences were observed between the HCO_3^- concentrations calculated from pH-drift and those corresponding to the HCO_3^- SpD. Therefore, the disappearance of HCO_3^- in the incubation medium was not caused by the photosynthetic activity of algae, but by the chemical process.

The CO_2 concentration drastically decreased in the first 100 minutes of the experiment, where the pH increased reaching values around 8.6 (Figure 25). Whilst both CO_2 and HCO_3^- decreased along the experiment, the CO_3^{2-} concentration increased. The initial value of CO_3^{2-} was $200.3 \mu M$ and it progressively increased to $637.5 \pm 11.5 \mu M$ for *B. scorpioides*, being significantly higher than the value of $582.9 \pm 3.6 \mu M$ obtained for *C. caespitosa*.

Moreover, from the pH-drift data, the CO_2 compensation point was calculated. A significantly lower CO_2 compensation point was performed by *B. scorpioides* ($0.56 \pm 0.04 \mu mol L^{-1}$) than for *C. caespitosa* ($0.98 \pm 0.14 \mu mol L^{-1}$), as shown in table 10. Values of CO_2 compensation point measured by the IRGA given in table 4 will be described and compared to the calculated ones further on.

Table 10. CO_2 compensation points ($CO_2 CP$): calculated from the pH-drift experiment and from the IRGA experiment. Data are mean of 3 replicates \pm SD.

Species	Calculated $CO_2 CP$ ($\mu mol L^{-1}$)	IRGA $CO_2 CP$ ($\mu mol L^{-1}$)
<i>B. scorpioides</i>	0.56 ± 0.04	6.47 ± 0.79
<i>C. caespitosa</i>	0.98 ± 0.14	8.95 ± 0.55

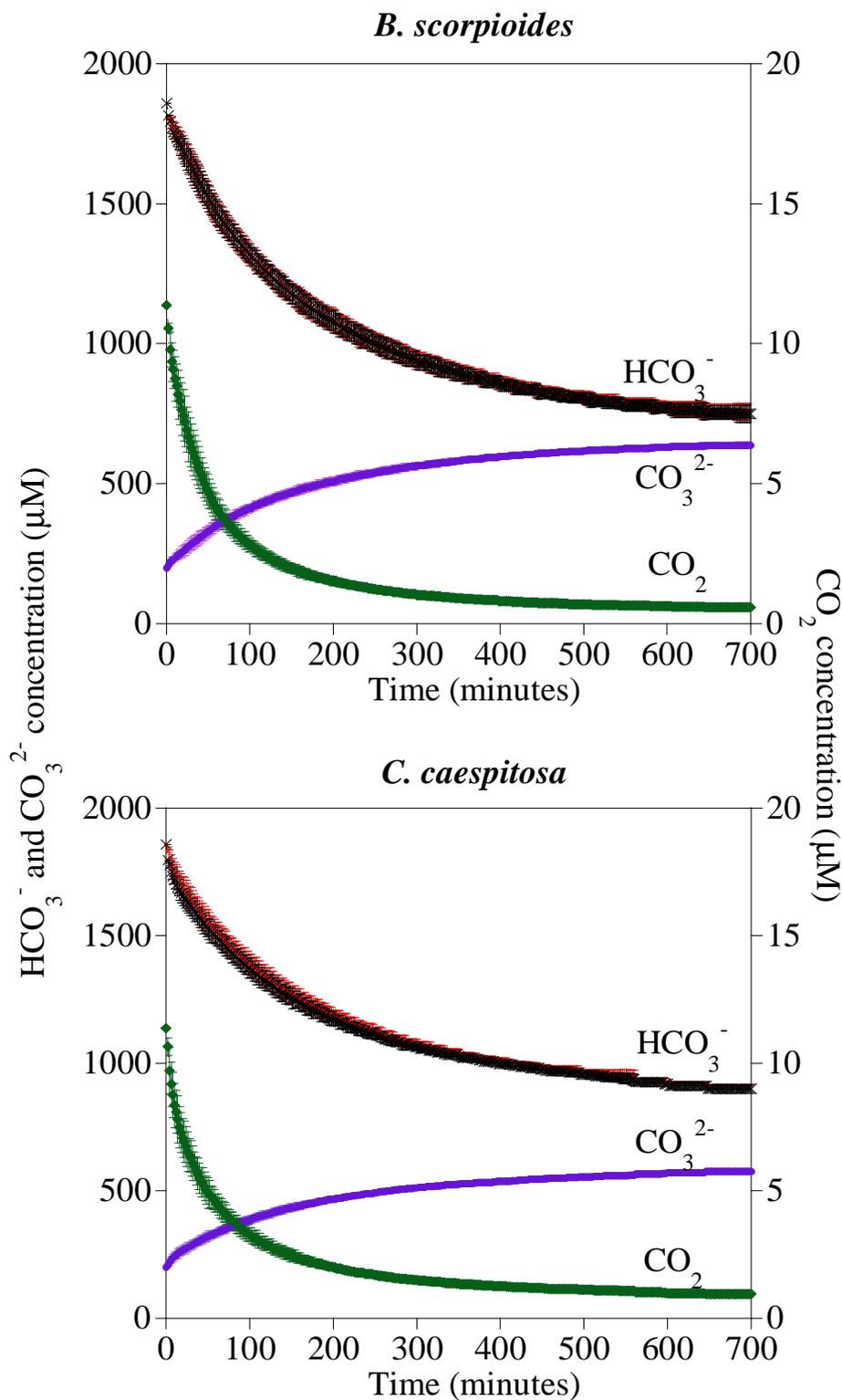


Figure 26. Change in the concentration of the different Ci forms along the pH- drift experiments. Data have been calculated from pH, alkalinity, salinity and temperature by means of the computer program CO₂system. The HCO₃⁻ drift (black line) has also been calculated using the spontaneous dehydration rate at each pH (Johnson 1982).

3.4.4.- CO₂-drift experiments

Figure 27 represents CO₂ depletion values from the CO₂-drift experiments. These data were obtained from incubations of algae in buffered NSW in an IRGA closed system. Regarding these results (Figure 27), a decrease in the CO₂ concentration in the water was observed for both species. The higher decrease was performed during the first 2 hours with no significant differences between *B. scorpioides* and *C. caespitosa*. The initial NPR values, calculated from the first two minutes of measurements where the pH is assumed to be stable, were $1.99 \pm 1.04 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ in *B. scorpioides* and $1.65 \pm 1.32 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ in *C. caespitosa*. The drop in the CO₂ concentration became less pronounced especially after 3 hours and the CO₂ values happened to be almost constant from 8 to 11 hours. Although the decrease of CO₂ was less important in *C. caespitosa*, it was not significantly different from *B. scorpioides*. The final CO₂ concentrations in seawater after 11 hours of experiments, when the CO₂ values were stable, were 6.47 ± 0.79 for *B. scorpioides*, significantly lower than the value of 8.95 ± 0.55 observed in *C. caespitosa* (Figure 27).

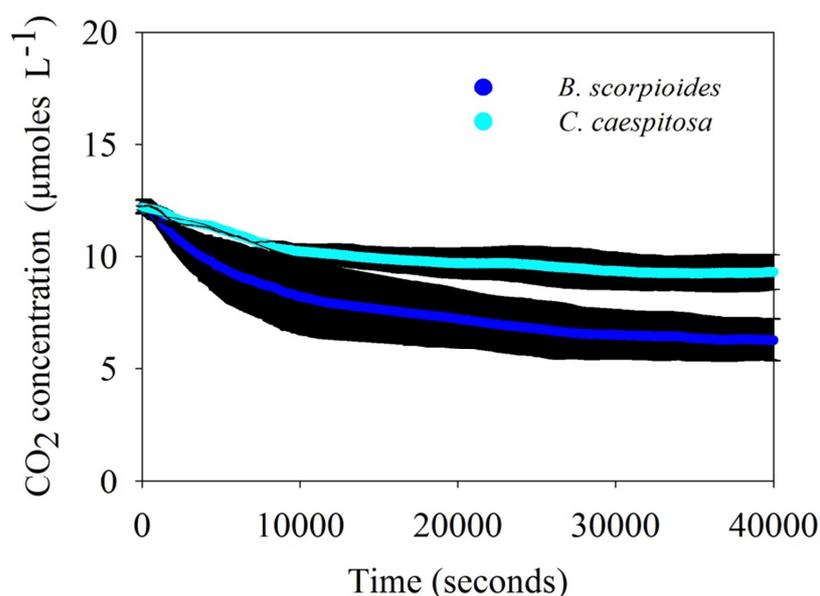


Figure 27. CO₂ depletion in the incubation medium for about 11 hours, in *B. scorpioides* (a) and *C. caespitosa* (b). Values are mean of 3 replicates \pm SD.

Resultados

The CO₂ compensation points calculated from the pH-drift experiments were one order of magnitude lower than those recorded by the IRGA (Table 10), about 12 and 9 times lower in *B. scorpioides* and in *C. caespitosa*, respectively. On the other hand, the IRGA results show that the CO₂ compensation point was significantly lower for *B. scorpioides* than for *C. caespitosa* (Table 10). The results indicate that about 48 % of the initial CO₂ was taken up by *B. scorpioides* and only 24 % by *C. caespitosa* after 11 hours. Furthermore, the CO₂ compensation point was achieved about 3 hours before in *C. caespitosa* than in *B. scorpioides*.

3.4.5.- Ci uptake rate in emersion

Ci uptake rates measured in air in *B. scorpioides* and *C. caespitosa* were $13.25 \pm 3.86 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ and $19.56 \pm 2.94 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$, respectively. No significant differences were found between the two values.

3.4.6.- Carbon Isotopic Discrimination

Both species presented highly negative $\delta^{13}\text{C}$ values with an average of $-32.23 \pm 2.06\text{‰}$ for *B. scorpioides* and $-32.88 \pm 1.98\text{‰}$ for *C. caespitosa*, which were not significantly different.

3.5.- Efecto de los inhibidores de transporte de HCO_3^- sobre la concentración y actividad de la enzima Rubisco

3.5.1.- Variación en la concentración de la enzima Rubisco

En la figura 28 se muestra la concentración de Rubisco expresada como porcentaje respecto a la proteína soluble, en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en muestras tomadas directamente del campo, tras su aclimatación durante 48 horas en el laboratorio (control) y tras su incubación durante 2 horas con distintos inhibidores de la incorporación de HCO_3^- . El contenido en Rubisco con respecto a las proteínas solubles en *B. scorpioides* en las muestras de campo fue de $11.42 \pm 0.93\%$ y en el control en la misma especie fue de $9.48 \pm 0.74\%$, ambos valores no fueron significativamente distintos entre sí. Tampoco se observaron diferencias entre las muestras de campo y el control de *C. caespitosa*, con valores de $19.72 \pm 5.27\%$ y $22.87 \pm 7.60\%$, respectivamente. Estos porcentajes fueron significativamente superiores llegando a ser casi el doble en *C. caespitosa* que en *B. scorpioides*, tanto en los controles como en los distintos tratamientos. Con respecto a esta última especie, la menor concentración de Rubisco se alcanzó al inhibir la ACAext, mientras que se observó un máximo tras la incubación con MON. Sólo se observaron diferencias significativas entre estos dos inhibidores, mientras que los controles y el resto de tratamientos fueron similares entre sí. Al contrario que en *B. scorpioides*, en *C. caespitosa* el mayor porcentaje de Rubisco se obtuvo en el tratamiento con AZ, significativamente superior al resto de tratamientos, y siendo éste casi cuatro veces mayor en *C. caespitosa* que en *B. scorpioides* con el mismo inhibidor. Por otro lado, el mínimo valor de concentración de Rubisco estuvo en torno al 20% en las muestras de campo y cuando se trataba el alga con DBS. El resto de inhibidores y el control dieron valores que oscilaron alrededor del 25-30% de Rubisco con respecto a proteínas solubles (Figura 28).

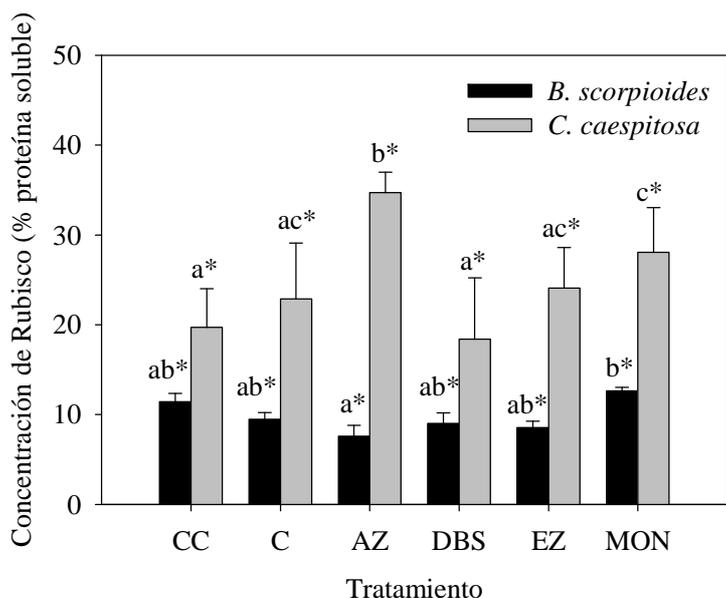


Figura 28. Concentración de la enzima Rubisco, expresada como porcentaje respecto a la proteína soluble, en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en el campo (CC) y tras su aclimatación durante 48 horas en el laboratorio (C), así como después de su incubación con distintos inhibidores (AZ, DBS, EZ y MON). Los valores son medias de tres réplicas \pm SD. Las diferencias significativas entre distintos tratamientos dentro de una misma especie se indican con letras, mientras que las diferencias entre especies se señalan con un asterisco (*).

3.5.2.- Variación en la actividad de la enzima Rubisco

Los resultados que se presentan a continuación (Figura 29) muestran la actividad de la enzima Rubisco expresada como $V_{c_{max}}$ ($\text{nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ prot sol s}^{-1}$). Los valores de actividad Rubisco encontrados en muestras recién tomadas del campo fueron $283.9 \pm 97.6 \text{ nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ prot sol s}^{-1}$ en *B. scorpioides* y $1118.0 \pm 665.3 \text{ nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ prot sol s}^{-1}$ en *C. caespitosa*, siendo estos valores de $V_{c_{max}}$ significativamente menores en *B. scorpioides* que en *C. caespitosa*. No se observaron, sin embargo diferencias significativas en la actividad de *C. caespitosa* con los distintos tratamientos ni con los controles de campo o tras la aclimatación en laboratorio. Los valores medios de actividad en *C. caespitosa* oscilaron entre $1000 \pm 66 \text{ nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ prot sol s}^{-1}$ encontrado en el tratamiento con AZ y $1595 \pm 1125 \text{ nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ prot sol s}^{-1}$ observado con EZ. Por el contrario, en *B. scorpioides* se presentaron algunas diferencias entre tratamientos. Se observó un mínimo de actividad en el control tras la aclimatación en el laboratorio, que,

aunque no fue significativamente distinto del control del campo, sí fue menor que los valores máximos observados tras las incubaciones con DBS y MON. El resto de tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí. Los valores medios de actividad Rubisco en *B. scorpioides* oscilaron entre 114 ± 28 nmol CO₂ g⁻¹ prot sol s⁻¹ del control en laboratorio y 454 ± 151 nmol CO₂ g⁻¹ prot sol s⁻¹ obtenidos con MON, observándose por tanto una estimulación de la actividad enzimática con dicho inhibidor.

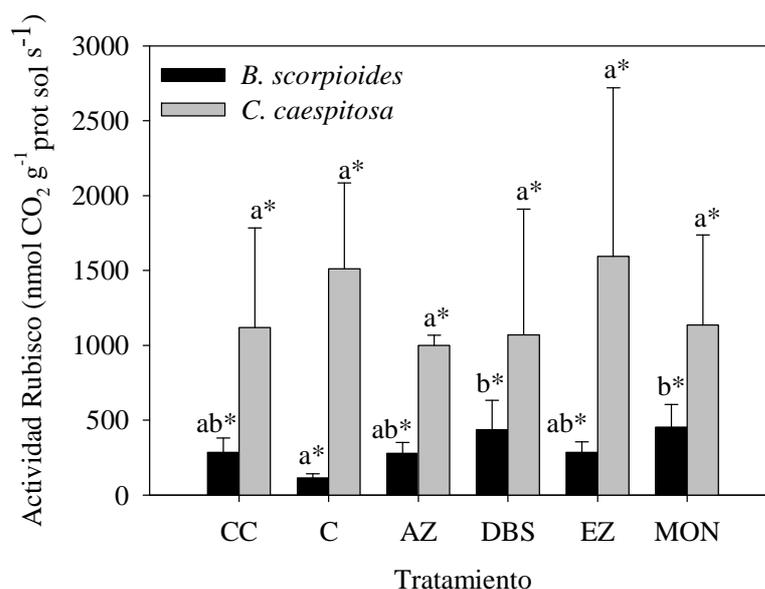


Figura 29. Actividad de la enzima Rubisco expresada como nmol de CO₂ por gramo de proteína soluble y unidad de tiempo (segundos) en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en el campo (CC) y tras su aclimatación durante 48 horas en el laboratorio (C), así como después de su incubación con distintos inhibidores (AZ, DBS, EZ y MON). Los valores son medias de tres réplicas \pm SD. Las letras muestran las diferencias entre los tratamientos dentro de una misma especie. Mediante asteriscos (*) se indican las diferencias significativas entre las ambas especies.

3.6.- Respuesta fotosintética a la salinidad

Se pretende determinar el papel iónico del sodio y de la osmolaridad en la respuesta fotosintética como desprendimiento de O₂ e incorporación de Ci y en la ACAext. Cabe destacar que a cada salinidad ensayada le corresponde un valor de osmolaridad, y que, por lo tanto, las diferencias encontradas entre los distintos tratamientos en las dos especies en estudio puede deberse tanto a la concentración en sales como a la osmolaridad. En este apartado también se incluyen los resultados correspondientes a los experimentos relacionados con la influencia del Na⁺ sobre la fotosíntesis y la ACAext, manteniendo la osmolaridad dentro de cada grupo de tratamientos correspondiente a una salinidad y diferenciándose así el efecto salino del osmótico.

3.6.1.- Efecto de distintas salinidades y osmolaridades sobre la tasa fotosintética expresada como evolución de O₂

La figura 30 representa el efecto de distintas salinidades sobre la tasa de fotosíntesis. Los valores medios de TFN a distintas salinidades fueron entre 1.5 y 2 veces superiores en *B. scorpioides* que en *C. caespitosa* en todo el rango de salinidades ensayadas (Figura 30). En *B. scorpioides*, el menor valor de TFN se dio a la salinidad de 10 con un valor de $42.04 \pm 3.80 \mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$, siendo significativamente más bajo que el resto de tasas fotosintéticas, mientras que entre 20 y 45 unidades de salinidad los valores oscilaron entre 56.65 ± 35.92 y $70.87 \pm 45.25 \mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$, no encontrando diferencias significativas en este rango de salinidad. En *C. caespitosa*, la menor tasa fotosintética fue de $22.35 \pm 1.01 \mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ a la salinidad más baja, aunque este valor sólo presentó diferencias significativas con la tasa fotosintética a la salinidad de 36, donde se dio el óptimo para esta especie, con un valor de TFN de $45.25 \pm 3.39 \mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$.

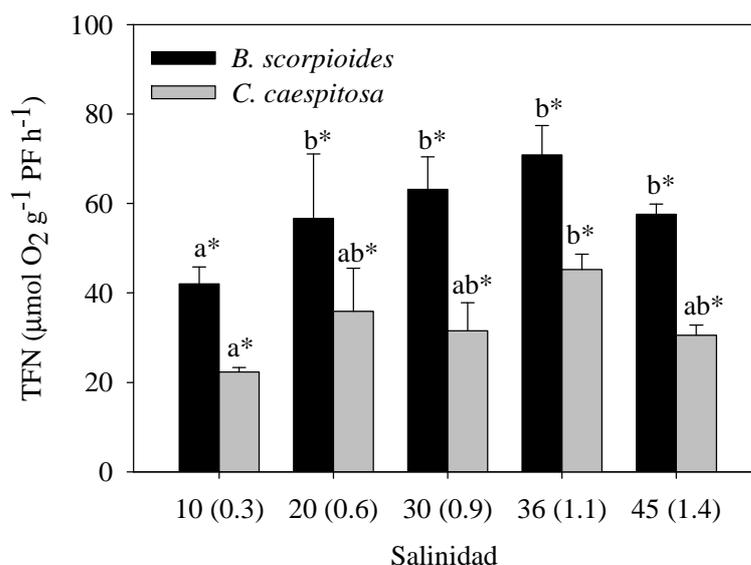


Figura 30. Tasa de fotosíntesis neta expresada como evolución de O_2 a distintas salinidades (10, 20, 30, 36 y 45) y sus correspondientes osmolaridades (0.3, 0.6, 0.9, 1.1 y 1.4 $Osmol\ kg^{-1}$; valores entre paréntesis) en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. Las barras son la media de tres réplicas \pm SD. Los valores con distinta letra indican diferencias entre las salinidades. Mediante el asterisco se muestran las diferencias entre ambas especies dentro de una misma salinidad.

3.6.2.- Efecto de distintas salinidades y osmolaridades sobre la ACAext

Los valores de ACAext obtenidos para *B. scorpioides* fueron significativamente mayores, entre 3 y 6.5 veces, que para *C. caespitosa* (Figura 31), en concordancia con los valores previamente registrados de la actividad enzimática. Dicha ACAext no varió significativamente en *B. scorpioides* a las distintas salinidades y sus valores oscilaron aproximadamente entre 12 y 23 $REA\ g^{-1}\ PF$. Para *C. caespitosa* los valores de REA observados para las distintas salinidades oscilaron entre 2 y 7 $REA\ g^{-1}\ PF$. En esta especie, la ACAext a las distintas salinidades no presentó diferencias significativas entre sí, excepto a las salinidades de 30 y 36, donde se alcanzaron actividades significativamente superiores al resto de las salinidades.

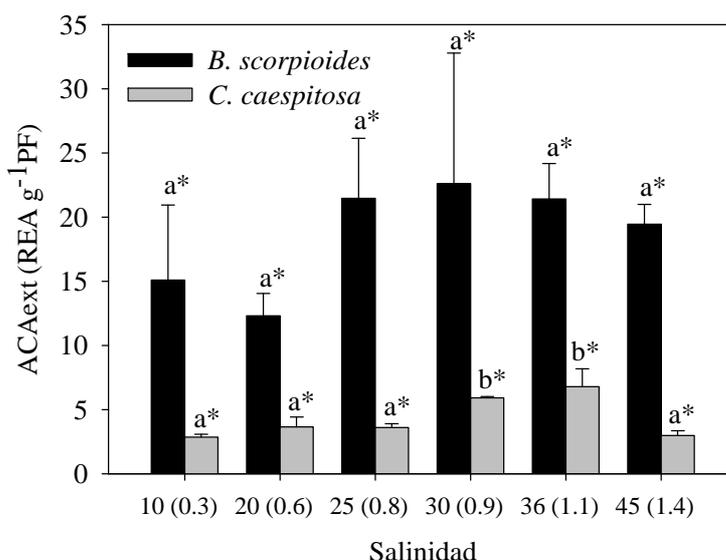


Figura 31. Actividad Anhidrasa Carbónica externa a distintas salinidades (10, 20, 25, 30, 36 y 45) y por tanto a distinta osmolaridad (0.3, 0.6, 0.8, 0.9, 1.1 y 1.4 Osmol kg⁻¹; valores entre paréntesis). Se presentan los valores medios de tres réplicas ± SD. Los valores con distinta letra indican diferencias entre las salinidades. Mediante el asterisco se muestran las diferencias entre ambas especies dentro de una misma salinidad.

3.6.3.- Efecto de los iones Na⁺ y/o Cl⁻ sobre la tasa de fotosíntesis y de respiración como intercambio de O₂

El efecto de la presencia o ausencia de los iones Na⁺ y/o Cl⁻ sobre la tasa de fotosíntesis como evolución de O₂ y como incorporación de Ci, así como sobre la ACAext, se comprobó con independencia de los cambios de osmolaridad. Para ello, se utilizaron tres salinidades (20, 36 y 45) y se simuló la osmolaridad correspondiente a cada una de ellas con Cloruro de colina y con Sorbitol. La TFN como evolución de O₂ no mostró valores significativamente distintos en *B. scorpioides* y en *C. caespitosa* a las distintas salinidades ensayadas y con distintos medios (NaCl, Sorbitol y Cloruro de colina; Figura 32 a y b). Sin embargo, sí se encontró una respuesta en la TR de ambas especies (Figura 32 c y d). Los valores de respiración en *B. scorpioides* fueron mayores a 20 de salinidad que a 36 o 45, excepto en el tratamiento con Cloruro de colina, cuyos valores fueron iguales a las tres salinidades del experimento. En *B. scorpioides*, se observó que a la menor de las osmolaridades (0.6 Osmol kg⁻¹), los valores de TR fueron

significativamente mayores con NaCl y Sorbitol que a las demás osmolaridades y unas 7 veces superiores a los valores obtenidos con Cloruro de colina. En las incubaciones con este último, no hubo cambios a las tres osmolaridades ensayadas en esta especie. En *C. caespitosa*, las diferencias entre la TFN a distintas salinidades o con los distintos tratamientos no fueron significativas. Los tratamientos con NaCl y con Cloruro de colina mantuvieron constantes los valores de TR a las tres salinidades. Sin embargo, la incubación con Sorbitol sí produjo cambios en la TR, siendo significativamente mayor a la menor osmolaridad y también con respecto a los tratamientos con NaCl y Cloruro de colina.

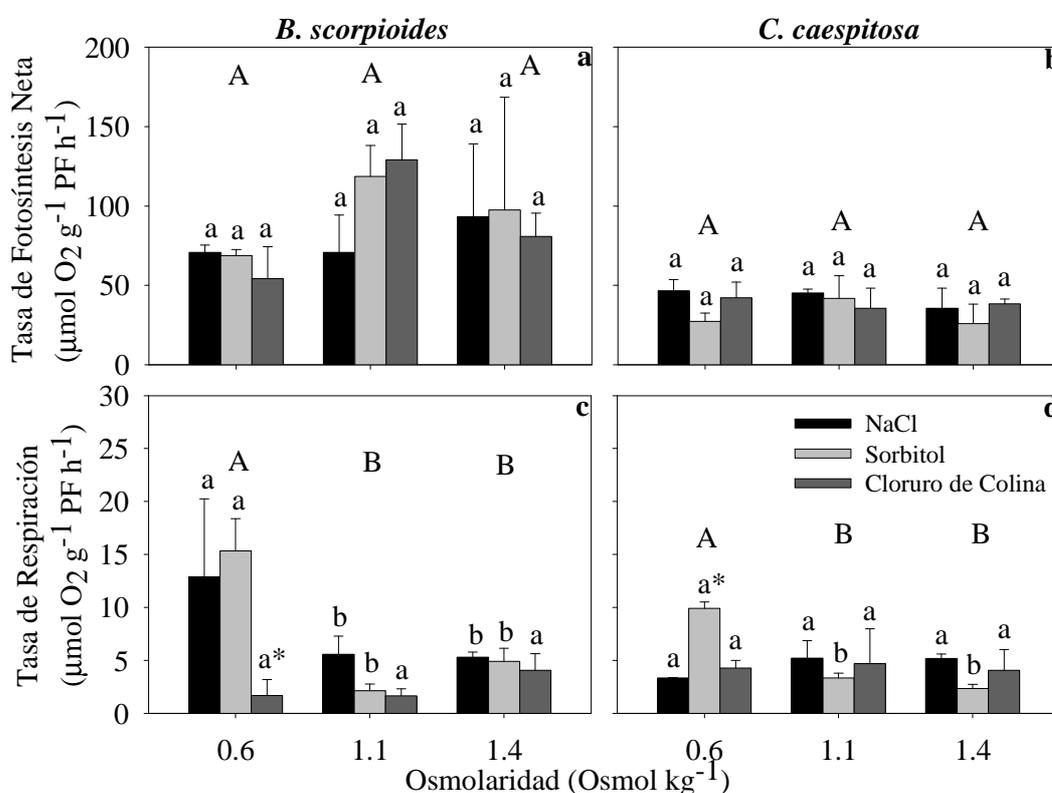


Figura 32. Efecto de tres osmolaridades (0.6, 1.1 y 1.4 Osmol kg⁻¹) correspondientes a las salinidades 20, 36 y 45, en medio con NaCl, Sorbitol o Cloruro de colina sobre la TFN (a y b) y la TR (c y d) como intercambio de O₂ en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. Los valores son media de tres réplicas ± SD. Las diferencias entre osmolaridades se indican con letras mayúsculas. Las diferencias dentro de cada tratamiento (NaCl, Sorbitol y Cloruro de colina) a distintas osmolaridades se indican con letras minúsculas. Los asteriscos muestran las diferencias entre los tratamientos dentro de cada osmolaridad.

Resultados

3.6.4.- Efecto del ión Na^+ y/o Cl^- sobre la tasa de fotosíntesis y de respiración como intercambio de Cl^-

Dado que los resultados obtenidos en las medidas de fotosíntesis, como intercambio de O_2 no arrojaron resultados concluyentes con el uso de Cloruro de colina, en este caso se optó por el uso de NaCl y Sorbitol a la hora de comprobar el efecto del Na^+ sobre la fotosíntesis como incorporación de Cl^- a osmolaridad constante.

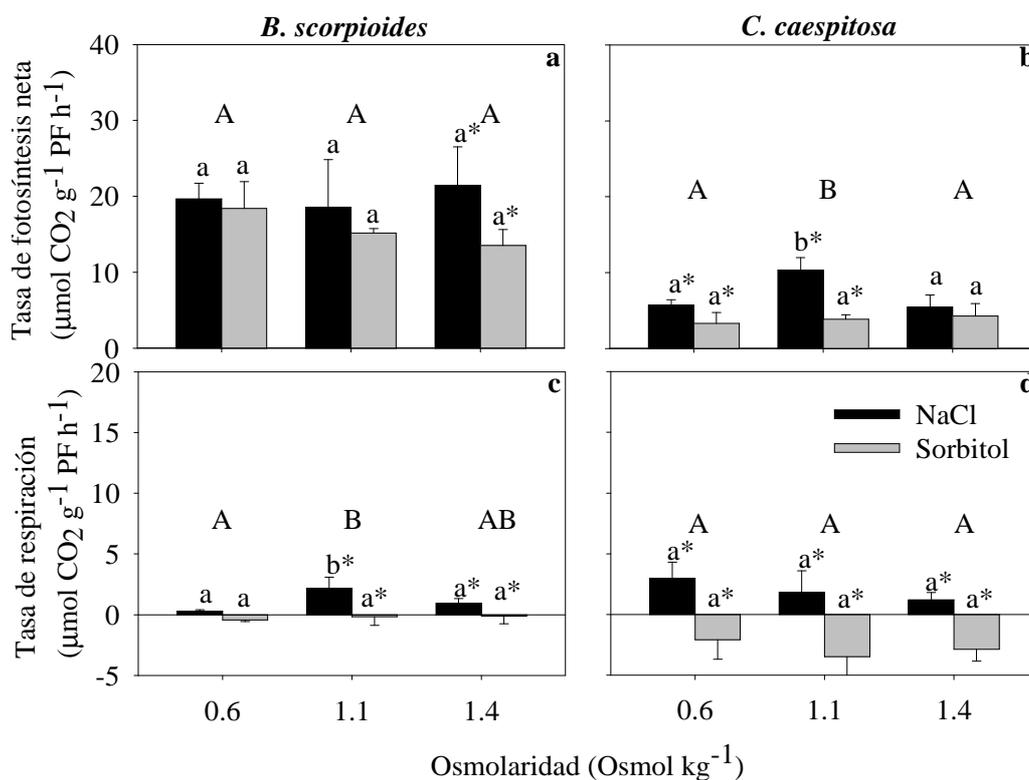


Figura 33. Efecto de tres osmolaridades (0.6, 1.1 y 1.4 Osmol kg^{-1}) correspondientes a las salinidades 20, 36 y 45, en medio con NaCl o Sorbitol sobre la TFN (a y b) y la TR (c y d) como incorporación de Cl^- en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. Los valores son media de tres réplicas \pm SD. Las diferencias entre osmolaridades se indican con letras mayúsculas. Las diferencias dentro de cada tratamiento (NaCl, Sorbitol) a distintas osmolaridades se indican con letras minúsculas. Los asteriscos muestran las diferencias entre los tratamientos dentro de cada osmolaridad.

Las mayores tasas de incorporación de Ci se encontraron en *B. scorpioides* mientras que la TR fue mayor en *C. caespitosa* (Figura 33). En *B. scorpioides* las incubaciones con NaCl y con Sorbitol no presentaron diferencias significativas a distintas osmolaridades, excepto a la osmolaridad mayor (1.4 Osmol kg⁻¹) donde el Sorbitol dio lugar a una menor incorporación de Ci. En *C. caespitosa*, se dio un máximo de TFN como incorporación de Ci a la osmolaridad intermedia con NaCl. Los valores tanto de TR como de TFN con Sorbitol fueron iguales a las tres osmolaridades ensayadas y significativamente menores que con NaCl a las dos osmolaridades más bajas.

En *B. scorpioides*, se observó una TR significativamente más baja a la osmolaridad intermedia, mientras que el tratamiento con Sorbitol dio lugar a una TR negativa, es decir, se estimuló la incorporación de Ci en oscuridad en presencia de Sorbitol. Este mismo fenómeno ocurrió en *C. caespitosa*, donde la TR alcanzó valores de $-3.46 \pm 1.73 \mu\text{moles CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$. Por otro lado, la TR con NaCl no presentó diferencias significativas a distintas osmolaridades en esta especie.

3.6.5.- Efecto de Na⁺ y/o Cl⁻ sobre la ACAext

El efecto de la presencia o ausencia de los iones Na⁺ y/o Cl⁻ sobre la ACAext se ha representado en la figura 34. En *B. scorpioides* los menores valores de ACAext se observaron a la mayor osmolaridad ensayada (1.4 Osmol kg⁻¹). Los tratamientos con Sorbitol y Cloruro de colina mostraron diferencias significativas con respecto al NaCl tanto a la menor osmolaridad (0.6 Osmol kg⁻¹) como a la intermedia (1.1 Osmol kg⁻¹), observándose una estimulación de la ACAext con Sorbitol con respecto al NaCl en ambos casos. Dicha estimulación también se dio con Cloruro de colina a la osmolaridad intermedia. En *C. caespitosa*, los valores de ACAext fueron significativamente menores que los de *B. scorpioides*. Al igual que *B. scorpioides*, *C. caespitosa* presentó los menores valores de ACAext a la mayor osmolaridad. La incubación con Cloruro de colina dio como resultado una menor ACAext que el Sorbitol a cualquiera de las tres osmolaridades, y que el NaCl a las osmolaridades de 0.6 y 1.1 Osmol kg⁻¹.

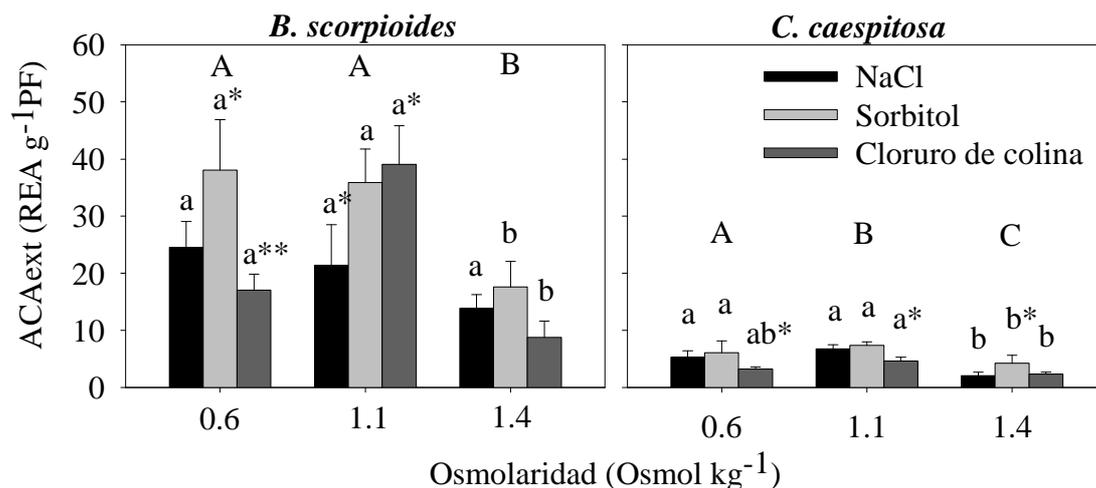


Figura 34. Efecto de tres osmolaridades (0.6, 1.1 y 1.4 Osmol kg⁻¹) correspondientes a las salinidades 20, 36 y 45, en medio con NaCl, Sorbitol o Cloruro de colina sobre la ACAext. Los valores son media de tres réplicas \pm SD. Las diferencias entre osmolaridades se indican con letras mayúsculas. Las diferencias dentro de cada tratamiento (NaCl, Sorbitol y Cloruro de colina) a distintas osmolaridades se indican con letras minúsculas. Los asteriscos muestran las diferencias entre los tratamientos dentro de cada osmolaridad.

4. - Discusión

4.1.- Origen de este estudio y determinación de los canales de incorporación de Ci

La discusión de los resultados se hará de modo dialéctico, es decir en el orden de la evolución de las hipótesis que se formularon y se comprobaron. En primer lugar, este trabajo nació de la observación de que la aplicación de inhibidores convencionales de la CA, afectaban a la fotosíntesis de modo incompleto como se había comprobado en los tapetes de *Microcoleus chthonoplastes* (Carrasco et al. 2008). Se podía suponer, por dicha inhibición parcial, que la transformación de HCO_3^- mediante la CAext no era la única vía de incorporación de Ci , puesto que la fotosíntesis continuaba en presencia de limitaciones de la misma.

Esta inhibición parcial, sin embargo no ha sido discutida por los autores que la describen, puesto que se emplea de modo cualitativo para señalar que los procesos menguan aunque no quedan anulados del todo. La deficiente predicción de la acción inhibitoria hace que ésta se deba considerar como una técnica de utilidad parcial.

El segundo hecho que llamó la atención fue la aparente complementariedad que existía al menos entre la inhibición de la actividad de la CAext con DBS y el incremento de la evolución de O_2 en *C. caespitosa* y, a concentraciones del inhibidor inferiores a 0.4 mM, en *B. scorpioides*. También resultó llamativo que el VAN, al inhibir los canales de ATPasa, incrementaba la fotosíntesis en *C. caespitosa*. Es por esto, que no era descabellado pensar que la inhibición de algunas vías estimulaba respuestas metabólicas aparentemente complementadas por la CA. Larsson et al. (1997) puntualizan que el uso de inhibidores específicos para uno de estos mecanismos de utilización de HCO_3^- permite detectar la capacidad de otros. Partiendo de esta premisa, hay estudios que utilizan alguno o varios de los mencionados inhibidores en cianobacterias como *Microcoleus chthonoplastes* (Carrasco et al. 2008), en microalgas (e.g. Colman et al. 2002; Huertas et al. 2005) y en macroalgas, como *Sargassum henslowianum* C. Agardh (Zou et al. 2011) o *Enteromorpha intestinalis* L. (Larsson et al. 1997) entre muchos otros. También en algas rojas, varios autores demostraron el uso de HCO_3^- por la CAext mediante el uso de inhibidores (Smith y Bidwell 1987, 1989; Gómez-Pinchetti et al. 1992; Haglund et al. 1992a; Mercado et al. 1997a, b), de modo que la relación de actividad anhidrasa carbónica u otros canales de transporte y el uso de bicarbonato se consideraron inequívocas. En algunos casos la actividad fotosintética no desaparecía completamente con la adición de uno de los inhibidores de la CAext (AZ o

DBS), lo que se interpretó como que en estas ocasiones, al menos, la existencia de otros mecanismos de incorporación de HCO_3^- distintos de la CAext era probable.

Por otra parte, en lo que se refiere a un uso poco riguroso de los inhibidores, las concentraciones de los distintos inhibidores utilizadas en diferentes especies no se justifica con detalle en la literatura. En general, en la bibliografía se suele tomar un valor establecido para cada inhibidor sin tener en cuenta la especie sobre la que se va a aplicar. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, sólo unos pocos autores, como Moroney et al. (1985) en *Clamydomonas reinhardtii* o Carrasco et al. (2008) en *Microcoleus chthonoplastes* probaron distintas concentraciones de varios inhibidores. También Smith y Bidwell (1987) estudiaron el efecto de varias concentraciones de AZ y DBS sobre la fotosíntesis como incorporación de Ci. La mayoría de ellos, utilizaron concentraciones estándar para macroalgas, como Choo et al. (2002) quienes usaron AZ, DIDS y VAN a las concentraciones de 0.2, 0.3 y 0.2 mM, respectivamente en *Cladophora glomerata*. Estas mismas concentraciones de AZ y DIDS fueron las aplicadas por Granbom y Pedersén (1999) en experimentos con *Eucheuma denticulatum*. Otros autores, sin embargo, optaron por concentraciones menores de los inhibidores como Pérez-Llorens et al. (2004), quienes utilizaron AZ y EZ a 0.1 mM en *Gracilariopsis longissima* y *Enteromorpha intestinalis*, o Zou y Gao (2004) que emplearon la misma concentración de AZ en *Hizikia fusiforme*. Mercado y Niell (1999) se decidieron por concentraciones incluso menores, de 0.05 mM de AZ y EZ en *B. scorpioides*. En definitiva, para cada especie se utilizó una concentración de inhibidor que se consideró suficiente sin comprobar si dicha concentración producía la máxima inhibición o si estaba en exceso. La concentración mínima de inhibidores de los mecanismos de incorporación de Ci necesaria para obtener la máxima inhibición en macroalgas podría depender de varios factores, entre ellos la morfología del alga y la permeabilidad de su membrana, aunque no hay estudios específicos sobre estos aspectos. Por otro lado, la concentración necesaria para inhibir la actividad de la enzima CAext fue más elevada que para la fotosíntesis en algunos de los inhibidores empleados. Esta discrepancia también fue observada por Flores-Moya y Fernández (1998) en *Phyllariopsis purpurascens* quienes utilizaron 0.2 mM de DBS y mostraron que el doble de dicha concentración implicaba un efecto inhibitorio mayor en la ACAext sin cambios en la evolución de O_2 fotosintético.

El conocimiento de la inhibición, se ha abordado en esta memoria con la realización de una cinética completa de cada inhibidor en cada especie. De este modo que se ha obtenido la acción de cada concentración para diseñar los experimentos de inhibición con las concentraciones más eficientes, es decir, las mínimas para obtener la máxima inhibición representativa de la ACA y de la fotosíntesis como evolución de O₂ para cada una de las dos especies. Al comparar las cinéticas de los distintos inhibidores para la ACAext y la tasa fotosintética observamos que existen marcadas diferencias en la concentración óptima necesaria de algunos inhibidores como la AZ, lo que conduce a pensar que el comportamiento de la ACAext es, en cierto modo, independiente o más bien que, aunque puede influir en ella, está desacoplada de la actividad fotosintética. Mediante el uso de AZ, Mercado et al. (1997b) determinaron la presencia de ACAext en 14 especies de macroalgas, y obtuvieron distintos resultados: algunas de las macroalgas estudiadas que no contaban con CAext eran incapaces de usar HCO₃⁻; otras especies, con CAext eran capaces de usar HCO₃⁻; y un tercer grupo sin CAext mostró el uso directo de HCO₃⁻. Posteriormente, Andría et al. (1999a) encontraron que en algunas especies con cierta actividad CAext, como por ejemplo *Gracilaria gaditana* nom. prov., puede darse incorporación directa de HCO₃⁻ facilitada por mecanismos distintos a la CAext. En concreto, estos autores identificaron canales aniónicos en *G. gaditana* mediante el uso de DIDS.

La presencia de ACAext no conlleva necesariamente el uso de HCO₃⁻, ya que, existen especies como *Membranoptera alata* (Hudson) Stackhouse que posee CAext y, sin embargo, no utiliza HCO₃⁻ (Giordano y Maberly 1989). En el caso de *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, en el presente estudio, existe una tasa de fotosíntesis residual tras la utilización de inhibidores de la CAext, que podría ser debida a otros mecanismos de incorporación de Ci. La existencia de CAext se evidenció experimentalmente por el método potenciométrico en ambas especies según las medidas de actividad CA, así como por la acción inhibitoria del AZ y DBS. Tanto los resultados de Mercado y Niell (1999), que ya revelaron la existencia de dicha actividad enzimática en *B. scorpioides*, como los análisis aquí presentados evidencian que, al igual que la actividad fotosintética, la CAext de ambas rodofíceas se inhibe sólo parcialmente con AZ y DBS, lo que, a pesar de redundar en algo ya afirmado previamente, indicaría que existen, además de esta actividad enzimática, otros mecanismos de incorporación de Ci.

La AZ se ha usado de manera general para demostrar la implicación de la CAext en la incorporación de Ci durante la fotosíntesis (Palmqvist et al. 1990; Surif y Raven 1990; Haglund et al. 1992b; Björk et al. 1992, 1993; Sültemeyer et al. 1993). Sin embargo, Mercado et al. (1998) demostraron que no existe una concordancia perfecta entre el efecto del AZ y la actividad CAext, bien porque el método potenciométrico no sea suficientemente sensible, o bien porque, como propusieron distintos autores (Williams y Turpin 1987; Smith y Bidwell 1989; Gehl et al. 1990, Sultemeyer et al. 1990), la AZ puede estar actuando también sobre la CAint. Si esto fuera así, la inhibición de la fotosíntesis y/o de la actividad CA tras la adición de AZ sería mayor que la inhibición con DBS, que no penetra en la célula, como así ha resultado. De hecho, la inhibición de la tasa de fotosíntesis neta en *B. scorpioides* fue alrededor de un 20% mayor con AZ que con DBS. En *C. caespitosa*, sólo se observó inhibición de la fotosíntesis con la adición de AZ, mientras que el DBS dio lugar a una inesperada estimulación de dicha tasa. Según diversos autores (Gómez-Pinchetti et al. 1992; Haglund et al. 1992a, b; Flores-Moya y Fernández 1998; Elzenga et al. 2000; Mercado et al. 2006), el uso de DBS en macroalgas causa la inhibición de la tasa fotosintética a pH del agua de mar. El aumento de la tasa fotosintética en presencia de DBS observado en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* es un efecto inusual y que está en sorprendente acuerdo con la hipótesis de la complementariedad que tan excepcionalmente se ha dado. Por lo tanto, la mayor inhibición de la TFN observada con AZ hace sospechar que las membranas de estas dos especies son permeables al compuesto AZ, inhibiendo así también su CAint. Las diferencias encontradas en el efecto inhibitorio de ambos compuestos no son tan evidentes cuando se determina la CAext (REA g⁻¹ FW); mientras que en *B. scorpioides* se alcanzó un porcentaje de inhibición elevado con ambos compuestos, en *C. caespitosa* la inhibición de la ACAext fue relativamente baja, lo que está de acuerdo con que dicha actividad enzimática no es muy elevada en esta especie.

Para corroborar la existencia de la enzima en el interior celular, se utilizó el inhibidor EZ, que actúa tanto sobre la ACAext como sobre la CAint. Los valores de máxima inhibición en nuestro estudio fueron aproximadamente del 70% con respecto al control en *B. scorpioides*, mientras que Mercado y Niell (1999) obtuvieron inhibiciones de alrededor del 90% de la tasa fotosintética en la misma especie. En *C. caespitosa*, la inhibición de la CAint fue algo mayor del 50%. Aunque la inhibición no fue total en

ninguna de las dos especies, sí demostró la presencia de la enzima en el interior celular y su papel en la fotosíntesis.

La enzima CA, tanto externa como interna, se encuentra presente en multitud de especies de macroalgas. Dentro del grupo de las rodófitas también está ampliamente distribuida (Smith y Bidwell 1989; Haglund et al. 1992a; Mercado et al. 1998; Snoeijs et al. 2002). En concreto, estudios previos observaron dicha enzima en *B. scorpioides* (Mercado y Niell 1999, 2000), en cambio, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se describe la actividad CA en *C. caespitosa*. Aunque hay una gran variabilidad en la ACAext entre las distintas especies de rodófitas, se ha demostrado que oscila en un rango entre 1 y 20 REA g⁻¹ PF (Giordano y Maberly 1989; Mercado et al. 1998), aunque existen especies que superan dichos valores, como *Membranoptera alata*, cuya ACAext fue de 62.5 ± 23.6 REA g⁻¹ PF según estimaciones de Giordano y Maberly (1989). Las medidas de ACAext en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* se realizaron aleatoriamente a lo largo de dos años, y presentaron una anomalía destacable. Se observaron dos rangos de valores distintos, uno más bajo, en concordancia con los valores publicados por Mercado y Niell (1999), y otro significativamente mayor. Se intentó correlacionar estos valores con las distintas épocas del año, pero no se observaron indicios de que dichas diferencias correspondiesen a la estacionalidad de la especie.

Por otro lado, comparando ambas enzimas, la ACAtotal es desmesuradamente mayor que la ACAext. Si tenemos en cuenta los dos rangos de valores de ACAext y los comparamos con la ACAint, observamos que para los mayores valores de ACAext, la actividad interna es 6.7 veces superior en *B. scorpioides* y 20.5 en *C. caespitosa*, mientras que teniendo en cuenta los valores de ACAext más bajos, la ACAint es 24 y 115 veces superior, respectivamente. Tales diferencias entre la actividad interna y externa de la enzima CA también fueron descritas por Giordano y Maberly (1989). Estos autores observaron que la ACAint estaba presente en casi la totalidad de las rodófitas que estudiaron, aunque sólo observaron ACAext en algunas de las especies de algas rojas (*Ceratium rubrum* C. Agardh, *Membranoptera alata*, *Plumaria elegans* (Bonnemaison) F. Schmitz y *Porphyra umbilicalis* Kützing). En todas ellas la ACAext representó un 2.7% de media de la ACAtotal. Dicha diferencia se ha interpretado como una estimulación de la ACAint, que se debe considerar en el mantenimiento interno de la concentración de CO₂ periplásmico, o en su transformación reversible a HCO₃⁻ si

existe CO₂ en exceso. Por el momento esta consideración no deja de ser especulativa y base para razonamientos y formulación de hipótesis para investigaciones posteriores.

A pesar de los mencionados indicios, en relación con la inhibición parcial de la fotosíntesis, la probabilidad de que existan canales iónicos de incorporación de HCO₃⁻ es muy baja en las dos especies. Los resultados obtenidos con DIDS sugieren que los canales aniónicos son muy poco activos en las dos especies objeto de estudio, dado que el porcentaje de inhibición de la fotosíntesis como evolución de O₂ es muy bajo (9.28 ± 1.17%) en *B. scorpioides* y estimulante de la tasa fotosintética en *C. caespitosa*. Los datos obtenidos en cuanto al efecto sobre la ACext son inconsistentes en relación a los de fotosíntesis, ya que se observa un porcentaje de inhibición de dicha actividad del 70.13 ± 18.1% a una concentración de 1 mM en *B. scorpioides* y de 24.70 ± 11.16% en *C. caespitosa*. Otros autores (Snoeijs et al. 2002) también observaron que, al igual que en *C. caespitosa*, el uso de DIDS estimulaba la tasa fotosintética, en este caso como incorporación de Ci en *Coccolytus truncatus*, aunque no dan ninguna explicación de dicho efecto. Un resultado similar, de estimulación de la fotosíntesis por DIDS, se ha observado en *Posidonia oceanica* (L.) Delile (com. pers. L. Rubio). Una posible explicación a este efecto es que en *P. oceanica*, donde existe simporte HCO₃⁻/H⁺, el HCO₃⁻ entraría en la célula y éste pasaría a CO₂ mediante la CAint con desprendimiento de OH⁻. Si se inhibieran los canales aniónicos mediante DIDS, el HCO₃⁻ quedaría en exceso dentro de la célula y estaría disponible para su transformación en CO₂ que sería sustrato de la Rubisco y, por lo tanto, la fotosíntesis podría aumentar. La falta de explicaciones sobre el incremento de la tasa fotosintética en presencia de DIDS, al que se ha aludido en los primeros párrafos de esta discusión, indica que este aspecto se debe estudiar con más detalle. En *Gracilaria longissima* (S. G. Gmelin) M. Steentoft, L. M. Irvine & W. F. Farnham, la respuesta del DIDS fue estacional, ya que provocaba un aumento de la fotosíntesis en verano, mientras que la inhibía en invierno, según Pérez-Llorens et al. (2004). Estos autores interpretan este hecho como una estimulación de la extrusión de H⁺ mediado por el transporte de CO₂ en verano, cuando la temperatura es más elevada y la disponibilidad de CO₂ es menor, lo cual, sin ser demostrado, parece arriesgado sin dar valores cuantitativos de las concentraciones de CO₂. Otras especies combinan la presencia de canales sensibles a DIDS con la actividad ACext, como observaron Andría et al. (1999a) en *Gracilaria gaditana*, que determinaron para dicha especie la presencia de ambas vías de incorporación de HCO₃⁻, de forma que cuando la

concentración de CO_2 en el medio disminuye y el pH se hace más alcalino, operan los canales sensibles a DIDS, mientras que la ACAext se estimula cuando la concentración de Ci en el medio es alta y existe un rango de pHs más amplio. En cualquier caso, ninguna de estas dos explicaciones se ajusta a lo observado en *B. scorpioides* o *C. caespitosa*. Por un lado, la presencia de canales sensibles a DIDS con el correspondiente uso de HCO_3^- queda descartado por las bajas tasas de inhibición de la fotosíntesis obtenidas con dicho inhibidor. Por otro lado, las medidas del presente estudio se realizaron en el mes de enero, con lo que el incremento de la actividad fotosintética no está relacionado con una temperatura y radiación elevadas. Las discordancias entre los datos de inhibición de la fotosíntesis y de la ACAext hacen sospechar que el efecto que produce el DIDS sobre *B. scorpioides* y *C. caespitosa* es inespecífico y requeriría de un estudio extendido a otras especies para ser considerado general.

El VAN ha sido ampliamente utilizado para determinar la presencia de bomba de H^+ -ATPasa tipo P en plantas (Michelet y Boutry 1995) y en algas (Palmqvist et al. 1988; Karlsson et al. 1994). Este inhibidor actúa sobre la función de la bomba de protones H^+ -ATPasa tipo P en la membrana plasmática y, por lo tanto, inhibe su extrusión (Beffagna y Romani 1988; Marrè et al. 1988). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el VAN no es completamente específico para la bomba de H^+ -ATPasa tipo P (Snoeijs et al. 2002), sino que es análogo al fosfato, y por tanto compite con el fosfato de la ATP por el sitio enzimático de la fosforización del ácido aspártico (Briskin y Hanson 1992). Gilmour et al. (1985) mostraron que en algas con deficiencia de fosfato la inhibición producida por el VAN era mayor. Según Sánchez de Pedro et al. (2013), tanto *B. scorpioides* como *C. caespitosa* tardan pocas horas en agotar las concentraciones de fosfato que se encuentran en el estuario (0-20 μM), con lo cual se podría pensar que sufren limitación de este nutriente. Sin embargo, el uso de VAN en el presente estudio no inhibe la tasa fotosintética sino que causa, como el DIDS, un inesperado aumento de la misma, lo que descarta un incremento en la inhibición por falta de fosfato en el medio.

En los experimentos realizados con IRGA, donde se realizaron medidas directas de la incorporación de CO_2 , se observaron claras diferencias en relación con el efecto de algunos inhibidores sobre la fotosíntesis estimada como desprendimiento de O_2 . La tasa fotosintética se veía inhibida de igual forma al utilizar AZ, DBS o EZ. En el sistema de IRGA abierto, el CO_2 es renovado constantemente y, por consiguiente, su concentración

permanece constante a lo largo del periodo de las medidas. Dado que el CO_2 disuelto en el agua puede ser incorporado por el alga mediante difusión, un aporte constante de CO_2 al medio podría facilitar su entrada a la célula y su uso directamente por la Rubisco, por lo que la inhibición de la ACAint mediante EZ no tendría por qué suponer una inhibición de la tasa fotosintética significativamente mayor que la obtenida con los inhibidores de la ACAext. Además, la inhibición parcial llevada a cabo por AZ, DBS y EZ, conduciría también a pensar que existen otras vías de incorporación de HCO_3^- alternativas a las CAs. Sin embargo, no se midió incorporación directa de HCO_3^- en ninguno de los casos, ya que la inhibición de la entrada de HCO_3^- por distintas vías (en simporte con Na^+ , a través de canales aniónicos o de la bomba H^+ -ATPasa) mediante los inhibidores MON, DIDS y VAN, no tuvo efecto inhibitorio expreso en la incorporación de Ci. A la vista de lo anterior se observa un desacoplamiento entre los resultados de inhibición de la evolución de O_2 y de la incorporación de Ci. El uso de MON produce una disminución de la tasa fotosintética como evolución de O_2 , mientras que no tiene un efecto significativo sobre la incorporación de Ci, lo que hace pensar que este inhibidor puede estar afectando a otros procesos metabólicos que disminuyan el desprendimiento de O_2 sin afectar a la incorporación de Ci.

4.2.- Forma de Ci utilizada por *B. scorpioides* y *C. caespitosa*

La hipótesis que se formula en principio sobre la complementariedad que podía existir entre la inhibición de una vía de incorporación de Ci y la activación de otras se ha desestimado, por lo que la incorporación de HCO_3^- es altamente improbable. Si se incorporara por la relativamente baja actividad externa de la anhidrasa carbónica, ésta no estaría acoplada a la fotosíntesis dentro de los márgenes de variabilidad de las respuestas de *B. scorpioides* y *C. caespitosa*.

¿Cuál es realmente la fuente de Ci que usan las dos especies? Localizadas en el intermareal cuyo pH oscila alrededor de 8.1-8.2, la principal fuente de Ci disponible es el HCO_3^- . Es por la alta concentración de HCO_3^- en el medio con respecto al resto de formas de Ci, por lo que cabría esperar que fuera precisamente ésta fuente de Ci la prioritaria. En cualquier caso, la capacidad para utilizar HCO_3^- como fuente de Ci para la fotosíntesis y el crecimiento de las macroalgas marinas es distinto para cada especie, y no parece depender exclusivamente de la abundancia de una forma de Ci u otra. Se ha

comprobado que ciertas rodofíceas no poseen esta capacidad de tomar HCO_3^- del agua por Maberly (1990) y Johnston et al. (1992), y nuestros resultados demuestran que las dos algas rojas de estuario estudiadas también carecen de ella, usando, como consecuencia, CO_2 como principal fuente de Ci para la fotosíntesis. A esta conclusión se ha llegado mediante el estudio de la deriva de pH, entre otras técnicas, que ha sido utilizada como lo hicieron al menos Axelsson y Uusitalo (1988), Maberly (1990), Johnston et al. (1992) y Surif y Raven (1989). Estas medidas sirven para asumir que los cambios en la composición del agua de mar de incubación durante la deriva de pH serían parecidos a los que suceden en la capa limítrofe con la superficie del alga durante periodos de baja actividad hidrodinámica o altos niveles de radiación (Axelsson y Uusitalo 1988). Los resultados obtenidos determinan la capacidad del alga para usar HCO_3^- , ya que los cambios en el pH debidos a la fotosíntesis podrían limitar la disponibilidad de las diferentes formas de Ci para el alga. Maberly (1990), mediante estos experimentos, expuso las restricciones al uso de HCO_3^- como fuente de Ci para algunas especies cuyo punto de compensación para el pH estuviera por debajo de 9. Éste es el caso de *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, cuyos valores del punto de compensación para el pH fueron menores o iguales a este valor, lo que confirma que la única forma de Ci que pueden usar estas especies es CO_2 . Esta incapacidad de utilizar HCO_3^- ha sido descrita en otras rodofíceas, como *Coccotylus truncatus* (Snoeijs et al. 2002), *Phycodris Rubens* (L.) Batt, *Lomentaria articulata* (Hudson) Lyngbye, *Plocamium cartilagineum* (L.) Dixon, *Membranoptera alata*, *Ptilota plumosa* (Hudson) C. Agardh, *Delesseria sanguinea* (Hudson) J. V. Lamouroux todas ellas con puntos de compensación para el pH por debajo de 9 (Maberly 1990; Johnston et al. 1992; Larsson y Axelsson 1999).

A causa de la capacidad tamponante del agua de mar la alcalinidad permanece constante durante 14 horas por lo que la incidencia de la fotosíntesis en el medio es mínima. Estos resultados, junto con los valores de punto de compensación para el pH, concuerdan con los obtenidos por Uusitalo (1996), al no encontrar cambios en la alcalinidad del medio en un rango de 7.9 a 9.4. Maberly (1990) obtuvo los mismos resultados hasta un pH de alrededor de 9.7, valor a partir del cual la alcalinidad del medio comenzó a disminuir, debido a que a pH más bajos los cambios de alcalinidad por pérdida de Ci se ven compensados en el equilibrio carbónico-carbonato por la deshidratación espontánea del HCO_3^- y del CO_3^{2-} .

De los resultados obtenidos a partir de la deriva de pH (pH drift), se puede calcular la tasa neta de CO₂ fijado por O₂ evolucionado (CO₂:O₂) en base molar conocido como cociente fotosintético (PQ). Este cociente proporciona información sobre la eficiencia del proceso fotosintético. Aunque tradicionalmente se ha tomado un valor teórico de 1 como PQ, que supondría una eficiencia fotosintética óptima, este extremo no se alcanza nunca y que no debería utilizarse ni como orientativo. En el fitoplancton, por ejemplo, el valor de PQ oscila en un rango de 0.7 a 0.9. (Laws 1991; Williams y Robertson 1991). Otros autores, como Axelsson (1988) determinaron que el PQ para las macroalgas está alrededor de 0.85, valor que no es muy diferente del fitoplanctónico y que se ha utilizado comúnmente en la literatura (Haglund et al. 1992a). En la presente memoria, la relación CO₂/O₂ se calculó a partir de las tasas fotosintéticas iniciales de las medidas de pH-drift (deriva de pH), encontrando valores de PQ extremadamente bajos, siendo 0.14 ± 0.04 en *B. scorpioides* y 0.17 ± 0.09 en *C. caespitosa*. Este resultado es una anomalía muy importante que las hace muy poco eficientes en la incorporación de Ci con un gasto de energía muy elevado, ya que, por ejemplo *B. scorpioides* necesita romper 17.6 moléculas de agua para obtener 1 sola molécula de CO₂. La descompensación entre el O₂ evolucionado y el Ci asimilado supone una enorme disipación de energía, lo que manifiesta que una escasa fracción de la energía producida en la fase lumínica de la fotosíntesis se emplea en la asimilación de carbono. El PQ refleja también la cantidad relativa de macromoléculas (polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) que son sintetizadas y la contribución relativa de nitrato, amonio y urea como fuente de nitrógeno. Valores bajos de PQ sugieren el uso de nitrato como fuente de nitrógeno (Myers 1980; Langdon 1988; Laws 1991; Williams y Robertson 1991). Sin embargo, a diferencia de lo postulado por estos autores, *B. scorpioides* y *C. caespitosa* no toman nitrato sino amonio como fuente principal de nitrógeno (Sánchez de Pedro et al. 2013). Al ser el amonio una forma de nitrógeno ya reducida, el gasto de electrones no se encaminaría a la reducción de sustratos nitrogenados. En el presente estudio, los bajos valores de PQ se explican debido a que las tasas de incorporación de CO₂ en el agua son muy bajas en comparación con las tasas de incorporación de CO₂ en emersión encontrados en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. Estos valores son significativamente menores que los encontrados en aire por Mercado y Niell (1999) de $56.79 \pm 6.04 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ y por Mercado y Niell (2000) de aproximadamente $30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ en *B. scorpioides*, debido probablemente a que estas medidas se realizaron a mayor irradiancia. Las tasas de

incorporación de Ci en emersión son dos órdenes de magnitud mayores que las medidas en agua, lo que significa que la incorporación de CO₂ en ambas especies se lleva a cabo principalmente durante los periodos de emersión, antes de su completa desecación. Esto tiene sentido si tenemos en cuenta que *B. scorpioides* y *C. caespitosa* pasan alrededor de 19 y 14 horas al día en emersión, respectivamente (Sánchez de Pedro et al. 2013). En general, las macroalgas del intermareal pueden asimilar CO₂ atmosférico durante los periodos de emersión, con tasas decrecientes conforme aumenta la pérdida de agua (Raven y Hurd 2012). Asimismo, Johnson et al. (1974) encontraron que algunas algas del intermareal medio y alto tenían tasas de fotosíntesis mayores en emersión cuando la hidratación era óptima, que en inmersión, lo que concuerda con lo encontrado para *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en el presente estudio.

Paralelamente al punto de compensación para el pH, el punto de compensación para el CO₂ confirma también que la fuente de Ci que las plantas usan. Valores bajos del punto de compensación indican la existencia de mecanismos concentradores de carbono (Johnston y Raven 1987; Reiskind et al. 1988; Johnston 1991). En la bibliografía no existe un valor de referencia del punto de compensación para el CO₂ claramente establecido como umbral a partir del cual la incorporación de HCO₃⁻ sea ya improbable. Según los resultados de Maberly (1990), la concentración de CO₂ libre en el medio al final de las medidas de pH-drift fue de entre 1.4 y 2.1 μmol CO₂ L⁻¹ en seis especies de rodófitas restringidas al uso de CO₂ como fuente de Ci. Este valor, según el mismo autor, no es suficientemente bajo para requerir el uso de HCO₃⁻. Para otras especies que sí son capaces de tomar HCO₃⁻ del medio, la concentración final de CO₂ osciló entre 0.001 y 0.2 μmol CO₂ L⁻¹, siendo todas ellas clorófitas y heterocontófitas, salvo *Chondrus crispus* (Maberly 1990). En *B. scorpioides* y *C. caespitosa* el punto de compensación para el CO₂ se estimó de dos maneras diferentes. Por un lado se calculó dicho punto de compensación a partir de los datos de pH (punto de compensación para el CO₂ calculado), y por otro se midió directamente la concentración final de CO₂ tras un experimento de deriva de CO₂ en el IRGA en modo cerrado (punto de compensación para el CO₂ potencial). Los datos obtenidos a partir del pH-drift son significativamente menores (11 y 9 veces en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, respectivamente) que los medidos directamente en el IRGA, y están muy próximos a los que dio Maberly (1990) para el uso de HCO₃⁻. Las marcadas diferencias entre los puntos de compensación para el CO₂ son debidas a que durante el experimento de medida directa de la incorporación

de CO₂ en el IRGA, el medio estaba tamponado, por lo que el pH permaneció estable, mientras que para el cálculo del punto de compensación para el CO₂ a partir de los datos del pH-drift se utilizaron los valores del punto de compensación para el pH. Se podría pensar que, al tamponar el pH, dado que se previene la limitación de C_i por alto pH, la concentración de CO₂ mínima que se podría alcanzar por la fotosíntesis debería ser menor, ya que existe una mayor cantidad de CO₂ disponible para el alga, pero en realidad se encontró todo lo contrario. Una posible explicación para esto es que la depleción de CO₂ durante los experimentos de deriva de pH (sin tamponar) puede deberse principalmente a dos procesos: la transformación físico-química del CO₂ en HCO₃⁻ como consecuencia del incremento del pH y a la incorporación de CO₂ por el alga. Sin embargo, cuando el agua de mar está tamponada, como sucede en los experimentos en el IRGA, la retirada físico-química de CO₂ es mínima y sólo se produce la incorporación de CO₂ por el alga. Por este motivo, el punto de compensación para el CO₂ en los experimentos realizados con agua de mar tamponada fue mucho mayor, es decir, que el significado de uno y otro punto de compensación es distinto. Mientras que el punto de compensación para el CO₂ calculado refleja la concentración de CO₂ remanente según el equilibrio carbónico-carbonato para un pH en concreto, el punto de compensación para el CO₂ potencial aporta información sobre cuánto CO₂ es capaz de incorporar el alga en condiciones de exceso de CO₂ durante un periodo de varias horas.

Beer et al. (1990) encontraron puntos de compensación para el CO₂ muy distintos con *Ulva fasciata* en experimentos con agua de mar tamponada y no tamponada. Mientras que en medio tamponado el punto de compensación fue de 0.021 µmoles de CO₂ L⁻¹ (0.48 ppm), en agua no tamponada este valor fue significativamente más bajo, 0.003 µmoles de CO₂ L⁻¹ (0.07 ppm), es decir, 7 veces menor. En cualquier caso, ambos puntos de compensación son bajos en *U. fasciata*, según las observaciones de Maberly (1990). Al contrario de *U. fasciata*, las especies estuáricas estudiadas no poseen mecanismos de concentración de C_i, de manera que la concentración de CO₂ no es tan alta en las inmediaciones de la Rubisco como para saturar la carboxilación y reprimir la reacción de oxigenación que da lugar a la fotorrespiración (Beer et al. 1990). Por otra parte, el punto de compensación para el CO₂ calculado a partir de los datos de pH para *B. scorpioides* fue aproximadamente la mitad del valor de 0.95 ± 0.07 µmol CO₂ L⁻¹ dado por Mercado y Niell (1999), probablemente debido a diferencias en las

condiciones experimentales de irradiancia y temperatura. Tal y como Mercado y Niell (1999) ya sugirieron para *B. scorpioides*, el punto de compensación obtenido para ambas especies no es lo suficientemente bajo para requerir mecanismos de incorporación de HCO_3^- . Esta correlación entre alto punto de compensación para el CO_2 y punto de compensación para el pH por debajo de 9, está en concordancia con las observaciones de Maberly (1990) para especies de rodófitas que no pueden usar HCO_3^- . Por lo tanto, tanto el punto de compensación para el pH como para el CO_2 de *B. scorpioides* y *C. caespitosa* confirman que en condiciones normales la concentración aérea y acuática de CO_2 es suficiente, aunque no saturante, para su supervivencia sin necesidad de usar HCO_3^- como fuente de Ci.

Como referencia se han tenido las curvas fotosintéticas a distintas concentraciones de Ci. La respuesta de la actividad fotosintética al cambio de concentración de Ci permitió obtener los principales parámetros fotosintéticos de *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en relación con la incorporación de Ci. El valor de V_{max} obtenido en el presente estudio fue de $34.28 \pm 2.27 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$, que corresponde a una concentración de Ci superior a la máxima utilizada en la curva. Por lo tanto, la concentración de CO_2 en el agua de mar, de aproximadamente 2.2 mM, no es suficientemente alta para saturar la fotosíntesis en *B. scorpioides* (Mercado y Niell 1999). Tampoco se alcanzó a la concentración del agua de mar natural para *C. caespitosa*, cuya fotosíntesis máxima ($39.08 \pm 3.66 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$) se alcanzaría, de modo esperado, por encima de 4 mM.

Uno de los parámetros obtenidos a partir de la curva P-C es la constante de semisaturación ($K_{\text{m(TIC)}}$), es decir, la concentración necesaria para alcanzar la mitad de la tasa de fotosíntesis máxima. Este parámetro junto con la pendiente inicial de la curva, se han utilizado tradicionalmente para determinar la afinidad de una especie por el Ci. No obstante, Johnston y Raven (1986a, b) cuestionaron la idoneidad de la $K_{\text{m(TIC)}}$ como medida de la capacidad para extraer Ci del agua de mar.

La mayoría de los métodos de análisis de las curvas P-C, asumen que se ajustan a un modelo de Michaelis-Menten. Sin embargo, con frecuencia ése no es el caso, como sugirieron Johnston et al. (1992), debido a la naturaleza de la fotosíntesis. De manera simplificada y según Raven y Johnston (1991), la cinética del Ci se lleva a cabo superando dos obstáculos (i) la velocidad máxima limitada por la tasa de transporte de

electrones, que controla la tasa de resuministro de la Rubisco por carboxilación (o, raramente, la actividad Rubisco saturada por carbono, Raven 1984) y (ii) la pendiente inicial controlada por la actividad y afinidad por el CO₂ de la Rubisco y por el suministro de Ci (Johnston et al. 1992). La transición de una tasa limitada por carbono a una aparente saturación por carbono puede variar de una especie a otra. Johnston et al. (1992) mostraron cómo diferentes estados potenciales de transición pueden alterar los valores de K_m para un sistema teórico que tenga la misma actividad Rubisco inicial. Por lo tanto, algunos factores, como la disminución en la concentración de Rubisco, pueden producir cambios en la K_{m(TIC)} sin cambios en la afinidad por el Ci. Según Johnston et al. (1992) el valor de K_{m(TIC)} refleja la interacción entre la pendiente inicial de la curva y la velocidad máxima y, por lo tanto, no puede ser una expresión adecuada de la afinidad de una macroalga por el Ci, salvo en algunas excepciones. Según los mismos autores, el problema inherente de interpretar la K_{m(TIC)} se solucionaría utilizando la pendiente inicial de la curva.

La conductancia fotosintética (g_p) es el parámetro propuesto por Johnston et al. (1992) para determinar la capacidad de tomar Ci del agua de mar, es decir, la afinidad de cada especie por el Ci. Este parámetro de las curvas P-C puede además usarse para comprobar si los flujos medidos son consistentes con la entrada de CO₂ por difusión y, en consecuencia, para mostrar si un alga en concreto puede o no usar HCO₃⁻ como fuente de Ci.

Johnston et al. (1992) calcularon de forma aproximada el grosor máximo de la capa limítrofe que permitiría la fotosíntesis basada en CO₂. Mediante el volumen de agua que queda retenido sobre la superficie del talo en emersión dividido por el peso del alga, Mercado y Niell (2000) estimaron que el espesor de la capa limítrofe para *B. scorpioides* está en torno a 20 μm, mientras que en el presente trabajo la capa limítrofe se midió por el mismo método para *C. caespitosa*, cuyo grosor se ha estimado en 170 μm. Estos valores son suficientemente altos como para que la fotosíntesis en estas especies esté basada solamente en la difusión y no ocurra la utilización del HCO₃⁻, siendo además compatible con la presencia de ACAext, por lo tanto, se ajustan a los resultados obtenidos por Johnston et al. (1992). Estos demostraron además que existe una buena concordancia entre la sensibilidad de una especie a pHs altos y su valor de g_p y utilizaron los valores de capa limítrofe para calcular la máxima difusión de CO₂. Mercado et al. (1998) calcularon que para un rango de capa limítrofe 3.24 a 10.52 μm,

el valor máximo de conductancia para el CO₂ compatible con que sólo se produzca difusión de CO₂ es $60 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$. Para un valor de capa límite de entre 20 y 100 μm , este límite de g_p para el CO₂ debe ser mucho mayor, con lo que los valores de conductancia obtenidos para *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, $143.17 \pm 36.50 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ y $111.09 \pm 9.29 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$, respectivamente son suficientemente bajos como para poder afirmar que el CO₂ entra exclusivamente por difusión. Además, el valor límite de g_p para el CO₂ calculado por Mercado et al. (1998), se estimó a partir de la tasa fotosintética como evolución de O₂ teniendo en cuenta el cociente fotosintético, pero no como incorporación de Ci, lo que puede afectar al cálculo de manera significativa. En cualquier caso, los valores de g_p para el CO₂ en las especies de macroalgas en este estudio son coherentes con la presencia de CAext, aunque no con una incorporación de HCO₃⁻, a pesar de la baja afinidad de estas especies por cualquiera de estas dos formas de Ci, como se discute más adelante. A todo lo anterior hay que añadir una evidencia más: el grosor de la capa límite en relación con la difusión de CO₂ en el agua se puede calcular mediante el coeficiente de difusión para el CO₂ ($1.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) y la g_p para el CO₂ (Johnston et al. 1992; Raven et al. 2002a). El grosor de esta capa calculada para *B. scorpioides* sería de aproximadamente 9 μm y para *C. caespitosa* de 12 μm . Distintos autores observaron en relación con la difusión de CO₂ en agua, que las especies de macroalgas con una capa límite de entre 10 y 15 μm no poseían mecanismos de utilización de HCO₃⁻ (Maberly et al. 1992; Raven et al. 2002a), lo que está en concordancia con los resultados anteriormente expuestos.

Otro hecho que confirma que estas especies tienen como fuente de Ci el CO₂ es el valor de $\delta^{13}\text{C}$. Maberly et al. (1992) establecieron que un valor de $\delta^{13}\text{C}$ más negativo que -30‰ es el umbral para excluir el uso de HCO₃⁻ en una especie. Estos autores encontraron un cierto número de rodófitas con valores muy negativos de $\delta^{13}\text{C}$ (-30.0 a -34.5‰), cuyo punto de compensación para el pH fue menor de 9, y que, por lo tanto, estaban restringidas al uso de CO₂ como fuente de Ci. Raven et al. (1995), Raven et al. (2002a, b) también observaron que todas aquellas especies estudiadas con valores de $\delta^{13}\text{C}$ más negativos que -30‰ eran algas rojas. Los valores del discriminante isotópico para *B. scorpioides* y *C. caespitosa* son también muy negativos. En este estudio se han encontrado valores de $-32.23 \pm 2.06\text{‰}$ y $-32.88 \pm 1.98\text{‰}$, respectivamente. Estudios previos ya observaron valores de $\delta^{13}\text{C}$ para *B. scorpioides* de -30.87‰ (Mercado et al. 2009) y -31.20‰ (Raven et al. 1995), estimación que se encuentra en el rango de los

presentados en este trabajo. Una de las posibles causas de que los valores sean tan negativos en las especies estuáricas estudiadas es que la fuente de C_i esté ya discriminada. El CO_2 desprendido desde el sedimento del estuario tiene un C_i con $\delta^{13}C$ más negativo que el agua de mar, así como ocurre con el CO_2 producido durante la descomposición de las hojas en los manglares (Lin et al. 1991). En especies que, como *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, crecen sobre los tallos de las plantas de marisma y pneumatóforos de manglares, el $\delta^{13}C$ puede verse reducido con respecto a otras especies porque toman CO_2 muy respirado y ya discriminado procedente del sedimento y de los pneumatóforos, en el caso de los manglares (Raven et al. 1995), que alejan los valores de $\delta^{13}C$ de los cercanos a -28‰ esperados para las plantas C_3 . En cualquier caso, los valores de $\delta^{13}C$ de las especies de *Bostrychia* que habitan sobre los pneumatóforos de los manglares no son significativamente diferentes de los que presentan aquellas que viven sobre sustratos inorgánicos (Raven et al. 2002b). Otro de los factores a tener en cuenta es la fijación de CO_2 atmosférico. Sin embargo, se insiste en que se trata de una atmósfera rica en CO_2 procedente de la respiración y de la mineralización de la materia orgánica en el sedimento, lo cual es coherente con los datos de $\delta^{13}C$ para estas especies estuáricas.

4.3.- Importancia de las anhidrasas carbónicas externa e interna

La enzima CA, tanto externa como interna, se encuentra presente en multitud de especies de macroalgas. En el caso de la ACAext, existen evidencias de que tiene un papel facilitando la fotosíntesis de las algas del intermareal cuando se encuentran en emersión (Giordano y Maberly 1989).

Aunque la afinidad por el HCO_3^- parece ser bastante baja en *B. scorpioides*, Mercado y Niell (1999) propusieron que esta especie podía tener una cierta capacidad para utilizarlo, a pesar de que no es suficiente como para soportar tasas altas de fotosíntesis a muy bajas concentraciones de CO_2 , como ocurre a pH altos, lo que concuerda con los bajos puntos de compensación comentados más arriba. Esta capacidad, que también es extensible a *C. caespitosa*, la atribuyen a la presencia de ACAext. La presencia simultánea de CA y la baja capacidad para usar HCO_3^- ha sido observada en otras especies, como *Membranoptera alata* (Giordano y Maberly 1989) o *Asparagopsis armata* (Mercado et al. 1998; Mata et al. 2007) sin que estos autores

ofrecieran ninguna explicación generalizable para estos casos. La función de esta CAext puede ser la de crear un gradiente de CO₂ en emersión que facilitase su entrada sin que esta reacción tenga que estar directamente conectada con la utilización del Ci en la fotosíntesis (Mercado y Niell 2000). Durante los periodos de emersión, que son la mayor parte del tiempo durante el ciclo de marea, la fotosíntesis produciría un incremento rápido del pH en la capa de agua que cubre al alga antes de su total desecación (Smith 1985) lo que llevaría a una disminución de la concentración de CO₂ y, por lo tanto, a una menor disponibilidad de esta forma de Ci para el alga. Algunos autores (Surif & Raven 1989; Mercado y Niell 1999, 2000) postularon que la ACAext aceleraría así el flujo de CO₂ desde el aire hasta el agua sobre la superficie del alga. De esta forma, el pH de la capa de agua se mantendría más bajo y el flujo de CO₂ hacia el interior celular aumentaría. Sin embargo, la magnitud de la ACAext en estas especies, es baja en comparación con la ACAint, y su función es bastante variable entre las algas rojas según Moulin et al. (2011). Estos autores encontraron que la CAext es una enzima relativamente ineficiente y que su actividad suele estar conectada a otros elementos funcionales, como la formación de regiones ácidas en la superficie del alga aumentando así la concentración de CO₂) o como el transporte de CO₂ en *Porphyra leucosticta* Thuret (Mercado et al. 1999).

La función de la CAint en algunas algas puede ser más importante que la función de la CAext en cuanto a mantener la concentración de CO₂ en el interior celular, ya que la CAint asociada con el cloroplasto asegura que la concentración de CO₂, el sustrato para la Rubisco, no cae por debajo de la concentración de equilibrio en el sitio de la carboxilación (Giordano y Maberly 1989). Los valores de CAext observados en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* son casi despreciables en comparación con la ACAtotal, con lo que la ACAint es la actividad enzimática más relevante en relación con el uso de Ci en estas especies. Tales valores de ACAint son habituales en rodófitas que no utilizan el HCO₃⁻ como fuente de Ci (Giordano y Maberly 1989). Además, asumiendo un valor de pH citoplasmático de alrededor de 7.3, como el medido por Fernández et al. (1999) en *Zostera marina* L., la transformación de CO₂ en HCO₃⁻ es facilitada, de forma que el HCO₃⁻ se acumula en el interior celular. De esta forma, la concentración de CO₂ en el citoplasma es suficientemente baja aumentando el gradiente de difusión por una parte, y por otra, el HCO₃⁻ es transportado hacia el interior del cloroplasto donde la CAint puede catalizar su conversión a CO₂ y ser utilizado por la Rubisco (Figura 35).

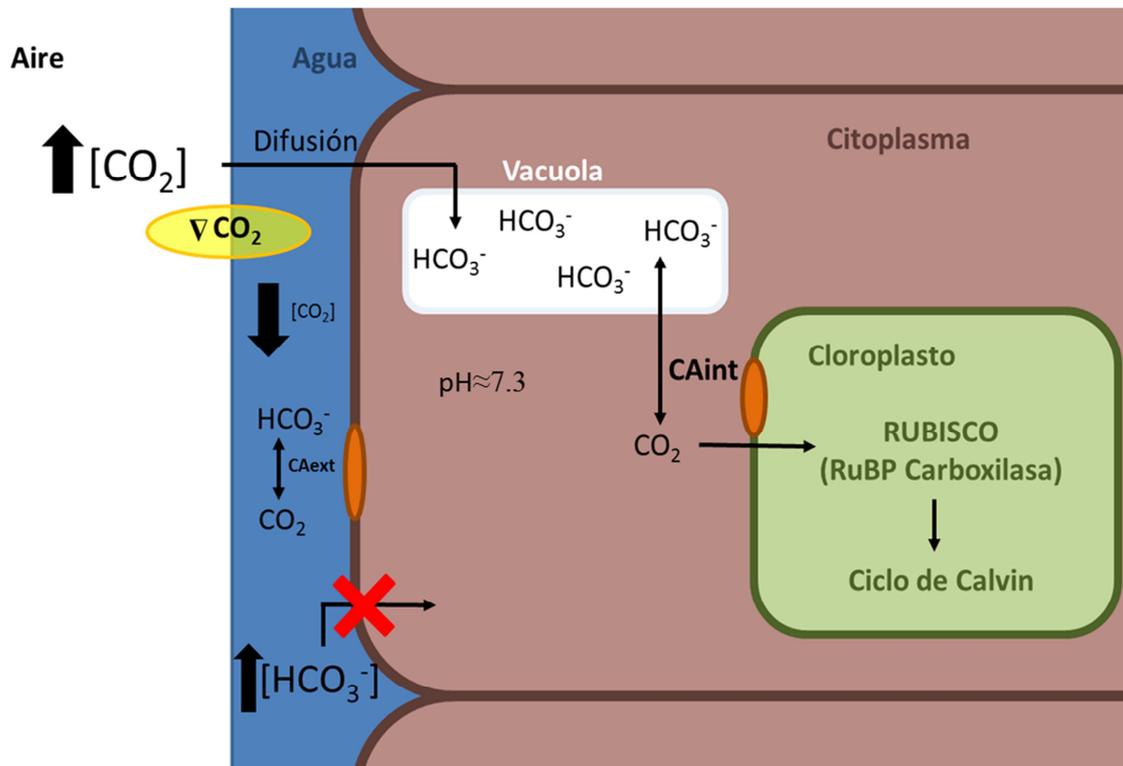


Figura 35. Propuesta de los mecanismos de incorporación de Ci presentes en *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. La presencia de la enzima CA_{ext} facilita el flujo de CO_2 hacia el interior celular que pasa a HCO_3^- a pH citoplasmático (7.3 según Fernández et al. 1999) y se acumula en vacuola, para su posterior uso mediante la CA_{int} , proporcionando así el sustrato a la Rubisco en el ciclo de Calvin.

La Rubisco puede tener actividad oxigenasa y carboxilasa. En presencia de O_2 , la función carboxilasa queda inhibida por competencia del O_2 con el CO_2 . En plantas sumergidas, aquellas especies que poseen CCMs aumentan la concentración de CO_2 interno, previniendo así la fotorrespiración (Laing et al. 1974), lo cual implica un sistema bioquímico del tipo C_4 . Sin embargo, *B. scorpioides* y *C. caespitosa* carecen de CCMs asociados a la incorporación de HCO_3^- con la consiguiente inhibición de la fotosíntesis por alta concentración de O_2 cuando el CO_2 es limitante (Mercado y Niell 1999). Estos autores mostraron que la presencia de CA no es suficiente para prevenir la fotorrespiración en *B. scorpioides*, caracterizada por una alta sensibilidad al O_2 , lo que

puede significar la ausencia de mecanismos de intercambio gaseoso del tipo C₄ (Bidwell y McLachlan 1985; Surif y Raven 1989). Todo esto es consistente con los datos de discriminación del ¹³C previamente discutidos, que ya apuntaban a una fisiología de intercambio de gases fotosintéticos del tipo C₃.

4.4.- Incorporación de Ci desde el punto de vista ecológico

Desde un punto de vista ecológico, estudios previos sugieren que la eficiencia a la hora de incorporar Ci en las macroalgas se correlaciona con su posición en la franja del intermareal (Maberly 1990; Johnston et al. 1992; Flores-Moya y Fernández 1998; Mercado et al. 1998; Choo et al. 2002; Snoeijs et al. 2002; Murru y Sandgren 2004). Estos autores coinciden en que las especies submareales exclusiva o mayoritariamente toman CO₂, mientras que las especies del intermareal son capaces de usar HCO₃⁻ en mayor o menor medida. Sin embargo, algas que, como *Ulva* sp., quedan expuestas al aire durante la marea baja y que, por lo tanto, sufren variaciones muy importantes en la disponibilidad de Ci, mantienen sus mecanismos de incorporación de Ci por encima del rango de la concentración de Ci externo (Beer et al. 1990) como si estuvieran desvinculadas de la concentración externa de Ci disponible. Por otro lado, el mismo Maberly (1990), en su clásico estudio sobre este tema, encontró que las algas del submareal que carecían de la capacidad para utilizar HCO₃⁻, suelen vivir en ambientes con baja luz, bajo un dosel de algas que la atenúan. Las rodófitas de este estudio, son algas que se localizan en el intermareal, y viven bajo el dosel de plantas halófitas de la marisma a una irradiancia baja. Tal y como Snoeijs et al. (2002) sugirieron para *Coccotylus truncatus*, en estas condiciones no sería energéticamente rentable invertir en vías de incorporación de HCO₃⁻ eficientes. Las especies que, debido a la influencia de la marea, se encuentran expuestas al aire gran parte del tiempo pueden aprovechar la disponibilidad del CO₂ atmosférico y disolverlo rápidamente en la fina capa limítrofe que cubre el talo antes de su completa desecación (Mercado y Niell 2000; Murru y Sandgren 2004). Esto supone una ventaja ecológica para especies de estuario como son *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, quienes, de esta forma, hacen frente a la limitación del Ci disuelto durante los periodos de emersión.

Como una consideración general respecto a las especies estudiadas y su hábitat, cabe señalar, que en el estuario el río Palmones la heterogeneidad espacio-temporal es

muy elevada, como ya describieron Moreno y Niell (2004). Los colectivos que no muestran una uniformidad consistente y, por tanto, presentan alta variabilidad, son desechados para estudios ambientales; sin embargo en este estudio se ha aceptado el desafío que la alta variabilidad representa. Cada medida se ha hecho con porciones de talo que, aunque se tomaban próximamente las unas a las otras, eran diferentes. Nunca una fracción de talo se ha usado en dos experimentos, por lo que la variabilidad genética individual y las adaptaciones derivadas del microambiente han resultado influir de manera importante en los resultados experimentales. Incluso, las medidas a distintas concentraciones de cada inhibidor se realizaron con muestras independientes, con lo que la variabilidad aumentó. Además, la toma de muestras, incluso muy próximas, de una misma especie o en distintas épocas del año introduce una variabilidad muy elevada, como queda patente en la mayoría de los resultados presentados en este trabajo y en los de Andría et al. (1999a, b) que también lo han observado en ecosistemas similares.

4.5.- ¿Están relacionados la actividad Rubisco y los mecanismos de incorporación de Ci?

La actividad Rubisco es una variable ampliamente estudiada en plantas en relación con el estrés hídrico (Parry et al. 2002; Bota et al. 2004; Flexas et al. 2006; Galmés et al. 2011), así como con el efecto de la concentración de CO₂ sobre ella (Campbell et al. 1988; Sallas et al. 2003; Cen y Sage 2005). En esta tesis, la concentración y actividad Rubisco de *B. scorpioides* y *C. caespitosa* se estudiaron en relación con la posible presencia de los distintos mecanismos de incorporación de Ci. Los resultados obtenidos demuestran que no existe correlación entre ambos mecanismos, al contrario de lo que observaron autores como Makino et al. (1983), Porter y Grodzinski (1984), Peet et al. (1986) y Majeau y Coleman (1994) entre otros, para plantas vasculares, donde la CA y la Rubisco presentaban patrones similares de actividad y concentración. Tal y como observaron estos autores, cabría esperar que existiera alguna relación entre el contenido de Rubisco y la ACA, sea cual sea la función de la CA. Sin embargo, la ausencia de una relación directa puede deberse a que las CAs y la concentración y actividad Rubisco dependen de factores externos que modulan su respectiva actuación, como el CO₂, la luz o el nitrógeno disponible (García-Sánchez et al. 1994). Israel y Hophy (2002) consideraron que la variación de la cantidad

de Rubisco en función de la concentración de CO₂ es irrelevante. García-Sánchez et al. (1994) y Andría et al. (1999b) obtuvieron, sin embargo, resultados distintos para *Gracilaria tenuistipitata* y *Gracilaria gaditana*, respectivamente, expuestas a distintas concentraciones de CO₂. Así, la aclimatación a alta concentración de CO₂ (5%, medio enriquecido) causaron en ambas especies de *Gracilaria* una disminución del contenido en Rubisco, y un aumento de su tasa de fotosíntesis, en comparación con la concentración de CO₂ en el aire, incluso a bajas condiciones de nitrógeno (García-Sánchez et al. 1994; Andría et al. 1999b). Esto puede denotar, según Andría et al. (1999b), la existencia de otros factores más allá de la Rubisco que controlen la fotosíntesis. En este sentido, Spijkerman (2008) comprobó en *Clamydomonas acidophila* Negoro, una microalga verde adaptada a medio ácido donde la disponibilidad de CO₂ no es limitante, que concentraciones de CO₂ muy elevadas producían una inactivación de sus CCMs y una disminución del contenido en Rubisco con respecto a condiciones de bajo CO₂, como respuesta de aclimatación a dichas concentraciones. Por otro lado, en el caso más simple, la enzima existe tanto en la forma potencialmente catalítica como en su forma inactiva. La cantidad relativa de una forma u otra viene determinada por el pH, el CO₂ y la concentración de Mg²⁺ (Lorimer et al. 1976), lo que refrenda nuevamente los resultados obtenidos por Andría et al. (1999b) y García-Sánchez et al. (1994). A pesar de todo, las condiciones experimentales de lo que se llama “CO₂ alto” son particularmente exageradas con respecto a la concentración de CO₂ actual en la atmósfera que llega raramente al 0.005 %. En *B. scorpioides* y *C. caespitosa* las dos horas de incubación con los inhibidores fueron suficientes para observar algunas diferencias significativas en la cantidad de Rubisco con lo que se produjo síntesis de la enzima. La ausencia de cambios en la actividad Rubisco, cuya activación es mucho más rápida, indica que dicha actividad enzimática en estas algas no se ve afectada por los mecanismos de incorporación de Ci como se sugiere posteriormente. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Portis (1992), quien afirmó que la actividad Rubisco puede variar independientemente de los niveles de sustrato y de los inhibidores de dicha actividad porque la enzima existe en múltiples formas. Es conveniente recordar, que la principal entrada de CO₂ se realiza por difusión en los periodos de emersión, con lo cual, dado que la inhibición de la CAext en inmersión no inhibe por completo la fotosíntesis, la CAint podría seguir actuando, aportando CO₂ a la Rubisco a partir de las reservas internas de HCO₃⁻, y esta última podría seguir realizando su actividad enzimática.

Sea por las razones aducidas por los autores anteriormente mencionados, (Lorimer et al. 1976; Portis 1992; García-Sánchez et al. 1994; Andría et al. 1999b), o sea por otros motivos, tanto la concentración como la actividad Rubisco son poco sensibles a los inhibidores de las distintas vías de adquisición de C_i útil para la fotosíntesis de modo indirecto, a pesar de estar demostrada la existencia de las CAs en las especies estuáricas del presente trabajo. Si hubiera correlación o simplemente relación tentativa, los sistemas de incorporación de C_i y la concentración/actividad Rubisco mostrarían alguna coherencia. Por consiguiente, como dicha coincidencia no existe en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* se considera que los dos sistemas están desacoplados, son independientes, o simplemente que esas vías de incorporación no existen, como en el caso de los transportadores de HCO_3^- en simporte con Na^+ . La constancia del pool de Rubisco en estas algas, incluso inhibiendo la ACAint, demuestra que es independiente de la concentración de CO_2 , que se puede considerar constante en el ambiente de la marisma, donde el balance entre la fotosíntesis de las plantas de marisma y la respiración del sistema sedimentario estarían compensados.

No obstante, hay una pieza por encajar en el modelo general: ¿cuál es la interpretación de la alta ACAint en relación con la actividad de la Rubisco? Puesto que la ACAint no parece llegar a la saturación en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* y que no presenta ninguna relación con la concentración/actividad de la Rubisco, se debe suponer que estas últimas son independientes de la actividad de ACAint. El uso de CO_2 en el interior celular llevaría a la limitación del mismo si la difusión de CO_2 fuera más lenta que su consumo por la Rubisco. Dentro de la célula, la relativamente alta actividad de la enzima CAint proporcionaría altas tasas de deshidratación del HCO_3^- que suministraría CO_2 a la Rubisco (Israel y Beer 1992), aunque hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existen trabajos en los que se aclare el posible papel de la ACAint en relación con la Rubisco en macrófitos.

Por otro lado la actividad Rubisco encontrada en *B. scorpioides* y *C. caespitosa* fue baja (283.9 ± 97.6 nmol CO_2 g^{-1} PF s^{-1} y 1118.0 ± 665.3 nmol CO_2 g^{-1} PF s^{-1} , respectivamente) en comparación con la descrita por Israel y Hophy (2002) para clorófitas como *Ulva* sp. (5003 ± 278 nmol CO_2 g^{-1} PF s^{-1}) u otras rodófitas del intermareal superior como *Porphyra* sp. (2300 ± 333 nmol CO_2 g^{-1} PF s^{-1}), lo que significa que en las especies del presente estudio la cantidad de CO_2 disponible para la Rubisco está por encima de la saturación. Si comparamos el C_i que incorporan *B.*

scorpioides y *C. caespitosa* con la actividad de su enzima Rubisco podemos obtener una estimación de la eficiencia de dicha enzima. Según nuestros resultados, la eficiencia de la Rubisco en estas especies es de aproximadamente un 22% y un 13%, respectivamente, siendo significativamente mayor en *B. scorpioides*.

Raven et al. (2012) sugirieron que el sistema Rubisco puede actuar de dos maneras distintas: en una de ellas la Rubisco es un sistema muy saturado en CO₂ con una afinidad muy baja (Rubisco A1 y B1) y es característico de las cianobacterias; alternativamente, otro sistema propio de las células eucariotas presenta alta afinidad por el CO₂ y baja tasa de saturación (Rubiscos IB e ID). Mercado y Niell (1999) observaron que la fotosíntesis no se saturaba en *B. scorpioides* a concentraciones de C_i de 5 mmol m⁻³, y además poseía una muy baja afinidad. La respuesta en los resultados obtenidos para *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en este trabajo muestran una incorporación de CO₂ que no llega a saturarse, con una baja afinidad por esta forma de C_i.

4.6.- Influencia de la salinidad y osmolaridad en la incorporación de C_i

La salinidad juega un papel importante en la existencia y distribución de las algas en los ecosistemas estuáricos (Jagtap y Untawale 1981; Yarish y Edwards 1982; Nair et al. 1982; Mosisch 1993). El rango de salinidad y el tiempo al que se ven sometidas a dicha salinidad *B. scorpioides* y *C. caespitosa* en la naturaleza es amplio y variable, respectivamente. La salinidad en el estuario del río Palmones oscila entre 29 y 35 según Clavero et al. (1997), aunque se advierte una progresiva salinización, pues durante esta tesis se han llegado a medir valores mucho mayores, de hasta 37. En este estudio, el rango salinidad experimental fue entre 10 y 45, salinidades a las que son capaces de vivir *B. scorpioides* y *C. caespitosa* sin diferencias significativas en su tasa fotosintética. Otras especies de *Bostrychia* también mostraron una gran tolerancia a amplios rangos de salinidad, es decir, una gran plasticidad con respecto a su crecimiento, fotosíntesis y respiración (Dawes et al. 1978; Yarish et al. 1979, 1980; Mann y Steinke 1988; Karsten et al. 1993). Por ejemplo, *Bostrychia tenella* (J. V. Lamouroux) J. Agardh presentó amplia tolerancia a distintos rangos de salinidad, temperatura y desecación (Broderick y Dawes 1998) y *Bostrychia simpliciuscula* Harvey ex J. Agardh creció a todas las salinidades entre 2.5 y 60 con preferencia por las salinidades intermedias (Karsten et al. 1994a). En términos generales, la tasa

fotosintética y respiratoria de las distintas especies de *Bostrychia* tienen una respuesta relativamente insensible bajo condiciones hipersalinas, lo que, según los anteriores autores, puede asegurar su supervivencia en hábitats estuáricos.

En la presente memoria, la ACAext en *B. scorpioides* no se vio afectada en todo el rango de salinidades del experimento mientras que en *C. caespitosa* dicha actividad enzimática presentó su óptimo entre 30 y 36, salinidades muy frecuentes en el estuario. Varios estudios sobre *Catenella* en el estuario de Ashtamudi (India) establecieron que las condiciones de salinidad óptimas para este alga en términos de distribución estaban entre 18 y 25 (Nair et al. 1982; Mal et al. 1987). Posteriormente, Narasimha Rao et al. (2008) comprobaron que el rango de salinidad más favorable para *Catenella impudica* estaba entre 19 y 29, cercano al óptimo observado para *C. caespitosa* en el presente estudio en relación a la ACAext. Otras especies de manglares, como *Caloglossa leprieurii* habita preferentemente en zonas con rangos de salinidad algo más bajos, entre 10 y 20 (Jagtap y Untawale 1981).

Las algas rojas son, en general, sensibles a los tratamientos hiperosmóticos (Bird et al. 1986; Kirst 1989), así como al estrés hiposmótico (Irlandi et al. 2001). Ambos tipos de estrés pueden limitar el crecimiento de las especies. El efecto hiperosmótico, puede darse como aumento de la salinidad ambiental o por desecación, siendo comparables, ya que ambos tienen como resultado cambios en el potencial hídrico de las células. Durante la desecación, las concentraciones iónicas celulares crecen y las proporciones iónicas permanecen constantes. El efecto de la desecación y, por lo tanto, de la elevada salinidad que rodea a la planta durante dicho proceso, es reversible en el caso de *B. scorpioides* y *C. caespitosa*. Sabemos que la tasa fotosintética se recupera tras su completa desecación tan solo media hora después de volver a sumergirse de nuevo (com. pers. R. Sánchez de Pedro). En estas especies la desecación llega a ser completa en muchos momentos del ciclo de marea, observándose que los talos adquieren una textura friable que presenta incrustaciones de sal sobre su superficie, con lo que el estrés osmótico es esperable en ambas especies. Según (Ji y Tanaka 2002), la capacidad para soportar el estrés por desecación está relacionada principalmente con su habilidad para prevenir la pérdida de agua y no tanto con su posición en el intermareal.

En periodos de completa desecación es bastante improbable que el alga realice fotosíntesis, mientras que la respiración suele ser poco sensible a este estrés osmótico

(Wiltens et al. 1978; Kirst y Wichmann 1987). Sin embargo, como se ha comentado previamente, las tasas de incorporación de CO₂ medidas en emersión en ambas especies son muy elevadas en comparación con las observadas en agua. Esto es debido a que, durante el proceso de desecación, existe una película de agua con una salinidad elevada sobre la superficie de las algas, situación en la que la ACAext aumenta, según proponen Mercado y Niell (2000), el gradiente de CO₂ y facilitando así su entrada por difusión, como ya se ha comentado anteriormente.

Ante estas circunstancias se pensó que el ión Na⁺ podría tener un papel importante en la incorporación de Ci y que, por tanto, su ausencia tendría algún efecto sobre la fotosíntesis. Dado que el sorbitol es un soluto compatible con carga nula y que no contiene iones Na⁺ y Cl⁻, se utilizó dicho compuesto para incubar las algas del presente trabajo en ausencia de Na⁺ y Cl⁻ manteniendo las condiciones de presión osmótica. Otro de los compuestos usados en las incubaciones fue el Cloruro de colina, un compuesto orgánico que posee el anión Cl⁻ con lo que se pudieron realizar incubaciones de las algas en presencia de dicho ión y en ausencia de Na⁺. Los resultados obtenidos tras las incubaciones en presencia de Na⁺ y Cl⁻ (agua de mar artificial), en ausencia de ambos (sorbitol) o en ausencia de Na⁺ y presencia de Cl⁻ (cloruro de colina) muestran que la tasa fotosintética como evolución de O₂ no se ve afectada por ninguno de estos tratamientos. Por el contrario, tanto en *B. scorpioides* como en *C. caespitosa* la tasa de respiración no permaneció constante sino que aumentó a la osmolaridad correspondiente a las salinidad de 20, tanto en presencia como en ausencia de ambos iones Na⁺ y Cl⁻. La tasa respiratoria sí resulta afectada por la baja osmolaridad mientras que el coste energético en el rendimiento de la fotosíntesis permaneció constante. En la aludida *Bostrychia radicans* la tasa de respiración permaneció constante en un rango de salinidad de 10 a 37.4 (Karsten y Kirst 1989a), aunque dichos autores no comprobaron el efecto del sorbitol y el cloruro de colina sobre la tasa fotosintética o la respiración.

En relación con la TFN como incorporación de Ci, los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que el sorbitol no producía ningún efecto en la incorporación de Ci en *B. scorpioides* ni *C. caespitosa*, mientras que sí se produjo una inhibición significativa sobre su TR, especialmente en *C. caespitosa*. La configuración molecular del sorbitol es muy parecida a la de determinados sustratos respiratorios, lo cual tendría influencia sobre dicha inhibición de la TR.

El efecto de estos tratamientos sobre la actividad ACAext muestra que la enzima en *C. caespitosa* es más activa a las osmolaridades asociadas a las salinidades de 20 y 36, más habituales en su hábitat, que a 45, por lo tanto, durante la desecación del alga, donde la salinidad del agua circundante aumenta, la ACAext del alga disminuye. *Bostrychia scorpioides*, sin embargo, mantiene una alta actividad de la enzima en todas las salinidades ensayadas. Esto supone que durante las primeras horas en emersión, cuando la capa de agua que queda sobre las algas no ha alcanzado aún una salinidad muy elevada, la CAext actuaría aumentando el gradiente de CO₂ como se ha comentado anteriormente, pero una vez alcanzado un cierto grado de desecación, y por consiguiente una cierta salinidad, la CAext disminuye su actividad, hasta posiblemente quedar inactiva, una vez se alcanza la desecación total. Por otro lado, a las dos salinidades menores (20 y 36) se observa un aumento de la actividad enzimática en medio sin cargas eléctricas con sorbitol, es decir que la ausencia de NaCl activa la CAext de *B. scorpioides*. Este efecto coincide con el obtenido al realizar incubaciones con MON y medidas de la ACAext. En ambos casos la actividad enzimática se vio incrementada, en el caso del Sorbitol, por la ausencia de Na⁺ y en el caso de la MON por la eliminación del gradiente de Na⁺. Esto significa que este catión tiene un efecto importante sobre la incorporación de Ci. Además la presencia de sorbitol en altas concentraciones en el medio de incubación pudo disminuir la solubilidad de CO₂ en el agua, así como alterar el equilibrio carbónico-carbonato, restringiendo la capacidad de entrada de Ci a la planta por esta vía. En *C. caespitosa*, sin embargo, la alta salinidad no tiene un efecto potenciador de la ACAext sino que produce una disminución de la misma, independientemente de las proporciones iónicas presentes, ya que la presencia de osmolitos solubles en el interior celular no es suficiente para compensar el estrés osmótico.

4.7.- Epílogo

Las dos especies de rodófitas de las que trata la presente memoria sobreviven en un medio muy fluctuante en el que la concentración de C_i disponible es escasa cuando están dentro del agua. Ambas son especies intermareales adaptadas a ciclos de emersión-inmersión con tasas fotosintéticas como incorporación de C_i es mayor en aire que en agua. Sin embargo, la afinidad que presentan por el C_i es baja y la eficiencia de la Rubisco para asimilarlo es de alrededor de un 20%. Además, existe un desacoplamiento entre la fotosíntesis como evolución de O_2 e incorporación de C_i . Ambas especies usan CO_2 como forma de C_i única. En realidad disipan un gran potencial electrónico en relación al carbono conseguido que procede de un medio muy “respirado”, el medio sedimentario en el cual crecen.

La salinidad del medio en el que viven cambia constantemente, tanto por los aportes del río y del mar como por efecto de la desecación en emersión, a lo que ambas algas están perfectamente adaptadas, como demuestra su plasticidad fotosintética. La variabilidad ambiental del ecosistema en el que habitan no parece un factor limitante para su crecimiento. Ambas se recuperan en poco tiempo de las paradas de metabolismo y el estrés osmótico al que se ven sometidas durante la emersión, una vez dentro del agua.

A pesar de las diferencias morfológicas que presentan *B. scorpioides* y *C. caespitosa*, de su segregación espacial en el intermareal y de sus diferencias en cuanto a la utilización del nitrógeno y el fósforo (Sánchez de Pedro et al. 2013), ambas muestran un metabolismo muy similar en relación con la incorporación de C_i , viviendo ambas a concentraciones de CO_2 menores de las que son capaces de incorporar. A pesar de ello, la concentración de C_i en el interior celular parece estar por encima de la concentración metabolizable por la Rubisco.

Un aspecto que queda por estudiar a raíz del presente trabajo es el papel concreto de la CAint. Dado que su actividad es muy superior a la de la CAext, y según los resultados mostrados en este estudio, la CAint actuaría asegurando una concentración suficiente de CO_2 alrededor de la Rubisco a partir de HCO_3^- , que podría generarse por el pH ligeramente alcalino del citoplasma. Sin embargo, esta hipótesis deberá comprobarse en futuras investigaciones.

5. - Conclusiones

1.- La presencia de ACAext y ACAint queda demostrada tanto en *B. scorpioides* como en *C. caespitosa*. La ACAext en *B. scorpioides* es significativamente mayor que en *C. caespitosa*, siendo la ACAint mucho mayor que la ACAext en ambas especies.

2.- No existe incorporación de HCO_3^- mediante simporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, o través de canales aniónicos o bomba H^+ -ATPasa tipo P. La inhibición parcial de la fotosíntesis con el uso de AZ, EZ y DBS no implica la presencia de dichas vías alternativas a las CAs. La existencia de CAext no está relacionada con la incorporación de HCO_3^- .

3.- La única forma de Ci utilizada por estas dos especies en la fotosíntesis es el CO_2 , según el valor de punto de compensación para el pH (< 9), la baja afinidad por el Ci, el alto valor del punto de compensación para el CO_2 y el valor del discriminante isotópico ($\delta^{13}\text{C} < -30\text{‰}$).

4.- La incorporación de CO_2 en estas especies se realiza principalmente y en mayor medida durante los periodos de emersión, mostrando un bajo coeficiente fotosintético en inmersión.

5.- La actividad Rubisco es relativamente baja con respecto a otras especies; también lo es en comparación con la alta ACAint, lo que supondría que la concentración de CO_2 alrededor de la Rubisco está por encima de la saturación.

6.- La concentración y actividad Rubisco son independientes de la incorporación de Ci, ya que estas dos variables no presentaron ninguna variación con los distintos inhibidores de las ACAs.

7.- Tanto *B. scorpioides* como *C. caespitosa* son especies con una gran plasticidad fotosintética, adaptadas a variaciones en la salinidad y la osmolaridad del medio.

8.- La ausencia de Na^+ en el medio no afecta a la tasa fotosintética de estas especies pero sí a su respiración, produciendo una inhibición significativa de la misma.

7. - Bibliografía

- Andría JR, Pérez-Lloréns JL, Vergara JJ (1999a) Mechanisms of inorganic carbon acquisition in *Gracilaria gaditana* nom. prov. (Rhodophyta). *Planta* 208:564–573.
- Andría J, Vergara JJ, Perez-llorens JL (1999b) Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. *Eur J Phycol* 34:497–504.
- Andría JR, Vergara JJ, Pérez-Lloréns JL (2000) Fractionation of carbonic anhydrase activity in *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) and *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta): changes in the extracellular activity in response to inorganic carbon levels. *Aust J Plant Physiol* 27:1161–1167.
- Andría JR, Brun FG, Pérez-Lloréns JL, Vergara JJ (2001) Acclimation responses of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) and *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) to changes in the external inorganic carbon concentration. *Bot Mar* 44:361–370.
- Arrojo MA, Jiménez C, Rubio L, Niell FX (2009) Lutein and the C/N as tracers of organic matter in the Palmones River estuary. *Limnetica* 28 (2): 243-252.
- Avilés A (2002) El papel del sector fluvial en la biogeoquímica del río Palmones (Los Barrios, Cádiz). Tesis doctoral. Universidad de Málaga. 191pp.
- Avilés A, Becerra J, Palomo L, Izquierdo JJ, Clavero V, Niell FX (2000) Distribution of different phosphorus fractions in the sediment of Palmones River (southern Spain) during a dry season. *Limnética* 19: 31-38.
- Axelsson L (1988) Changes in pH as a measure of photosynthesis by marine macroalgae. *Mar Biol* 97:287–294.
- Axelsson L, Uusitalo J (1988) Carbon acquisition strategies for marine macroalgae. I. Utilization of proton exchanges visualized during photosynthesis in a closed system. *Mar Biol* 97: 295–300.
- Axelsson L, Uusitalo J, Ryberg H (1991) Mechanisms for concentrating and storage of inorganic carbon in marine macroalgae. In *Seaweed Cellular Biotechnology, Physiology and Intensive Cultivation* (eds G. García-Reina & M. Pedersén), pp. 185–198. COST-48; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Axelsson L, Ryberg H, Beer S (1995) Two models of bicarbonate utilization in the marine green macroalga *Ulva lactuca*. *Plant Cell and Environ* 18: 439-445.
- Axelsson L, Larsson C, Ryberg H (1999) Affinity, capacity and oxygen sensitivity of two different mechanisms for bicarbonate utilization in *Ulva lactuca* L. (Chlorophyta). *Plant Cell Environ* 22:969–978.
- Badger MR (1987) The CO₂ concentrating mechanism in aquatic phototrophs. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* (eds Hatch, MD & Boardman NK), 10:219–274. Academic Press, San Diego.

Bibliografía

- Badger MR (2003) CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot* 54:609–622.
- Badger MR, Price GD (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45:369–392.
- Badger MR, Price GD (2003) CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot* 54:609–622.
- Badger MR, Andrews TJ, Whitney SM, Ludwig M, Yellowlees DC, Leggat W, Price, GD (1998) The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Can J Bot* 76:1052–1071.
- Badger MR, Hanson D, Price GD (2002) Evolution and diversity of CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Funct Plant Biol* 29:161–173.
- Badger MR, Price GD, Long BM, Woodger FJ (2006) The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J Exp Bot* 57:249–65.
- Batelli C (2004) Phytocoenological study of the *Catenella caespitosa* (Withering) L. M. Irvine (Gigartinales, Rhodophyceae) community from the Slovenian coast, northern Adriatic Sea. *Acta Adriatica* 45:121–130.
- Bedu S, Laurent B, Joset F (1992) Membranous and soluble carbonic anhydrase activities in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. In *Research in Photosynthesis*, ed. N. Murata, 3:819-822. Dordrecht: Kluwer Academy.
- Beer S (1994) Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine macroalgae (with special reference to the Chlorophyta). In *Round Fe*, Chapman DJ (eds) *Prog Phycol Res* 10:179-207.
- Beer S, Israel A, Drechsler Z, Cohen Y (1990) Inorganic carbon concentrating system and rubisco in *Ulva*. *Plant Physiol* 94:1542–1546.
- Beffagna N, Romani G (1988) Effects of two plasmalemma ATPase inhibitors on H⁺ extrusion and intracellular pH in *Elodea densa* leaves. *J Exp Bot* 39:1033–43.
- Behrenfeld MJ, Randerson JT, McClain CR, Feldman GC, Los SO, Tucker CJ, Falkowski PG, Field CB, Frouin R, Esaias WE, Kolber DD, Pollack NH (2001) Biospheric primary production during an ENSO transition. *Science* 291:2594–2597.
- Berman-Frank I, Kaplan A, Zohary T, Dubinsky Z (1995) Carbonic anhydrase activity in the bloom-forming dinoflagellate *Peridinium*. *J Phycol* 31: 906–913.
- Biber PD, Irlandi EA (2006) Temporal and spatial dynamics of macroalgal communities along an anthropogenic salinity gradient in Biscayne Bay (Florida, USA). *Aquat Bot* 85:65–77.

- Bidwell R, McLachlan J (1985) Carbon nutrition of seaweeds: photosynthesis, photorespiration and respiration. *J Exp Mar Bio Ecol* 86:15–46.
- Bird CJ, McLachlan J (1986) The effect of salinity on distribution of species of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales): an experimental assessment. *Bot Mar* 29:231-38.
- Björk M, Haglund K, Ramazanov Z, Garcia-Reina G, Pedersén M (1992) Inorganic-carbon assimilation in the green seaweed *Ulva rigida* C.Ag. (Chlorophyta). *Planta* 187:152–6.
- Björk M, Haglund K, Ramazanov Z, Pedersen M (1993) Inducible mechanisms for HCO_3^- utilization and repression of photorespiration in protoplasts and thalli of three species of *Ulva* (Chlorophyta). *J Phycol* 29:166–173.
- Blanco-Rivero A, Shutova T, Román MJ, Villarejo A, Martínez F (2012) Phosphorylation controls the localization and activation of the luminal carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS ONE* 7, e49063
- Bota J, Medrano H, Flexas J (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytol* 162:671–681.
- Bowes GW (1969) Carbonic Anhydrase in Marine Algae. *Plant Physiol* 44:726–732.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Briskin DP, Hanson JB (1992) How does the plasma membrane H^+ -ATPase pump protons? *J Exp Bot* 43:269–289.
- Broderick ME, Dawes CJ (1998) Seasonal photosynthetic and respiratory responses of the red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales, Rhodophyta) from a salt marsh and mangal. *Phycologia* 37:92–99.
- Brook I (1981) The effect of freshwater canal discharge on the stability of two seagrass benthic communities in Biscayne National Park, Florida. *Oceanol Acta* 5(4):63–72.
- Browse JA (1985) Measurement of photosynthesis by infrared gas analysis. - In *Handbook of Phycological Methods. Ecological Field Methods: Macroalgae* (M. M. Littler and D. S. Littler eds), pp. 397. Cambridge University Press. Cambridge.
- Campbell WJ, Allen LH, Bowes G (1988) Effects of CO_2 concentration on rubisco activity, amount and photosynthesis in soybean leaves. *Plant Physiol* 88:1310–1316.
- Carrasco M (2006) Caracterización estructural y ecofisiológica de los tapetes microbianos de la marisma del río Palmones (Cádiz). Tesis doctoral. Universidad de Málaga. 290pp

Bibliografía

- Carrasco M, Mercado JM, Niell FX (2008) Diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms by intact microbial mats of *Microcoleus chthonoplastes* (Cyanobacteria, Oscillatoriaceae). *Physiol Plant* 133:49–58.
- Carvalho MC, Hayashizaki KI, Ogawa H (2009) Short-Term measurement of carbon stable isotope discrimination in photosynthesis and respiration by aquatic macrophytes, with marine macroalgal examples. *J Phycol* 45: 761-770.
- Cen YP, Sage RF (2005) The regulation of Rubisco activity in response to variation in temperature and atmospheric CO₂ partial pressure in sweet potato. *Plant Physiol* 139:979–90.
- Choo KS, Snoeijs P, Pedersén M (2002) Uptake of inorganic carbon by *Cladophora glomerata* (Chlorophyta) from the Baltic sea. *J Phycol* 38:493–502.
- Clavero V (1992). Estudio experimental y modelo de intercambio de fosfato en la interfase sedimento-agua en el estuario del río Palmones (Algeciras, Cádiz) Tesis doctoral. Universidad de Málaga. 184 pp.
- Clavero V, Niell FX, Fernández JA (1991) Effects of *Nereis diversicolor* O.F. Muller abundance on the dissolved phosphate exchange between sediment and overlying Water in Palmones River Estuary (Southern Spain). *Estuar Coast Shelf Sci* 33:193-202.
- Clavero V, Fernández JA, Niell FX (1997a) The influence of tidal regime on phosphate accumulation in a shallow small estuary (Palmones River, southern Spain). *Scientia Marina* 61:37-43.
- Clavero V, Fernández JA, Niell FX (1997b) Intercambio de fosfato y adsorción por el sedimento del estuario del río Palmones. VII Seminario de Química Marina.
- Clavero V, Izquierdo JJ, Fernández JA, Niell FX (1999a) Influence of bacterial density on the exchange of phosphate between sediment and overlying water. *Hydrobiologia* 392:55–63.
- Clavero V, Izquierdo JJ, Palomo L, Fernández JA, Niell FX (1999b) Water management and climate changes increases the phosphorus accumulation in the small shallow estuary of Palmones River (Southern Spain). *Sci Total Environ* 228:193–202.
- Colman B, Huertas IE, Bhatti S, Dason JS (2002) The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae. *Funct Plant Biol* 29:261–270.
- Cox EH, McLendon GL, Morel FM, Lane TW, Prince RC, Pickering IJ (2000) The active site structure of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase 1. *Biochemistry* 39(40):12128-30
- Dawes CJ (1998) *Marine Botany*. Second edition. J.Wiley & Sons, New York. 480 pp.

- Dawes CJ, McIntosh RP (1981) The effect of organic material and inorganic ions on the photosynthetic rate of the red alga *Bostrychia binderi* from a Florida estuary. *Marine Biology* (Berlin) 64:213-218.
- Dawes CJ, Mathieson AC (2008) *The seaweeds of Florida*. University Press of Florida, Gainesville.
- Debusk TA, Ryther JH (1984) Effects of seawater exchange, pH and carbon supply on the growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in large-scale cultures. *Bot Mar* 27:357-62.
- Dawes CJ, Moon RE, Davis MA (1978) The photosynthetic and respiratory rates and tolerances of benthic algae from a mangrove and salt marsh estuary: A comparative study. *Estuar Coast Mar Sci* 6(2):175-185.
- Dawes CJ, Orduña-Rojas J, Robledo D (1999) Response of the tropical red seaweed *Gracilaria cornea* to temperature, salinity and irradiance. *J Appl Phycol* 10:419-425.
- DeBusk TA, Ryther JH (1984) Effects of seawater exchange, pH and carbon supply on the growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in large-scale cultures. *Bot Mar* 27:357-362.
- Dionisio ML, Tsuzuki M, Miyachi S (1989) Blue light induction of carbonic anhydrase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 30: 215-219.
- Dixon PS, Irvine LM (1977) *Seaweeds of the British isles*. Vol I. Rhodophyta. Part 1: Introduction, Nemaliales, Gigartinales. British Museum Natural History, London, 252 pp.
- Drechsler Z, Beer S (1991) Utilization of inorganic carbon by *Ulva lactuca*. *Plant Physiol* 97: 1439-1444.
- Drechsler Z, Sharkia R, Cabantchik ZI, Beer S (1993) Bicarbonate uptake in the marine macroalga *Ulva* sp. is inhibited by classical probes of anion exchange by red blood cells. *Planta* 191:34-40.
- Ekman P, Yu S, Pedersen M (1991) Effects of altered salinity, darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content, α -galactosidase activity and agar yield of cultured *Gracilaria sordida*. *Br Phycol J* 26:123-131
- Elzenga JTM, Prins HBA, Stefels J (2000) The role of extracellular carbonic anhydrase activity in inorganic carbon utilization of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): A comparison with other marine algae using the isotopic disequilibrium technique. *Limnol Oceanogr* 45(2):372-380.
- Eriksson M, Karlsson J, Ramazanov Z, Gardstrom P, Samuelsson G (1996) Discovery of an algal mitochondrial carbonic anhydrase: molecular cloning and characterization of a low-CO₂-induced polypeptide in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci* 93:12031-12034.

Bibliografía

- Espie CS, Kandasamy RA (1994) Monensin inhibition of Na⁺-dependent HCO₃⁻ transport distinguishes it from Na⁺-independent HCO₃⁻ transport and provides evidence for Na⁺/HCO₃⁻ symport in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Plant Physiol* 104:1419–1428.
- Falke JJ, Chan SI (1986) Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors. *Biochemistry* 25:7888–7894.
- Falkowski PG, Raven JA (1997). *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science. Malden, MA.
- Fernández JA, García-Sánchez MJ, Felle HH (1999) Physiological evidence for a proton pump and sodium exclusion mechanisms at the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *J Exp Bot* 50:1763–1768.
- Fernández C y Niell FX (1982) Zonación del fitobentos intermareal de la región de Cabo Peñas (Asturias). *Inv Pesq* 46:121-141.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés, J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytol* 172:73–82.
- Flores-moya A, Fernández JA (1998) The role of external carbonic anhydrase in the photosynthetic use of inorganic carbon in the deep-water alga *Phyllariopsis purpurascens* (Laminariales, Phaeophyta). *Planta* 207:115–119.
- Galmés J, Ribas-Carbó M, Medrano H, Flexas J (2011) Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO₂ concentration under water stress. *J Exp Bot* 62:653–65.
- García-Sánchez MJ, Fernández JA, Niell FX (1993) Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol Plant* 88:631–637.
- García-Sánchez MJ, Fernández JA, Niell FX (1994) Effect of inorganic carbon supply on the photosynthetic physiology of *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 194:55–61.
- Gehl KA, Colman B, Sposato LM (1990) Mechanism of inorganic carbon uptake in *Chlorella saccharophila*: The lack of involvement of carbonic anhydrase. *J Exp Bot* 41:1385–1391.
- Gillham ME (1957) Vegetation of the Exe Estuary in Relation to Water Salinity. *J Ecol* 45:735–756.
- Gilmour DJ, Kaaden R, Gimmler H (1985) Vanadate inhibition of ATPases of *Dunaliella parva* in vitro and in vivo. *J Plant Physiol* 118:111–126.
- Giordano M, Maberly SC (1989) Distribution of carbonic anhydrase in British marine macroalgae. *Oecologia* 81:534–539.

- Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu Rev Plant Biol* 56:99–131.
- Gómez-Pinchetti J, Ramazanov Z, García-Reina G (1992) Effect of inhibitors of carbonic anhydrase activity on photosynthesis in the red alga *Soliera filiformis* (Gigartinales: Rhodophyta). *Mar Biol* 114:335–339.
- Gorostiaga JM, Santolaria A, Secilla A, Casares C, Díez I (2004) Check-list of the Basque coast benthic algae (North of Spain). *Ann Jard Bot Madrid* 114:335-339.
- Gran G (1952) Determination of the equivalence point in potentiometric titrations of seawater with hydrochloric acid. *Oceanol Acta* 5: 209–218.
- Granbom M, Pedersén M (1999) Carbon acquisition strategies of the red alga *Eucheuma denticulatum*. *Hydrobiologia* 398/399:349–354.
- Guevara JM, Niell FX (1990) Growth rates in a continuously immersed population of *Cesratodema edule* L. *Scientia Marina* 53:483-489
- Gutknecht J, Bisson MA, Tosteson FC (1977) Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate and unstirred layers. *J Gen Physiol* 69:779–794.
- Haas P, Hill TG (1932) The occurrence of sugar alcohols in marine algae. II. Sorbitol. *Biochem J* 26:987–990.
- Haglund K, Pedersén M (1992) Growth of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* at high pH. influence of some environmental factors and correlation to an increased carbonic-anhydrase activity. *Bot Mar* 35:579–587.
- Haglund K, Björk M, Ramazanov Z, García-Reina, G, Pedersén, M (1992a) Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 187:275–281.
- Haglund K, Ramazanov Z, Mtolera M, Pedersén M (1992b) Role of external carbonic anhydrase in light-dependent alkalization by *Fucus serratus* L. and *Laminaria saccharina* (L.) Lamour.(Phaeophyta). *Planta* 188:1–6.
- Harada H, Matsuda Y (2005) Identification and characterization of a new carbonic anhydrase in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Canadian Journal of Botany* 83:909–916.
- Hayashi L, Faria GSM, Nunes BG, Zitta CS, Scariot LA, Rover TF, Marthiellen RL, Bouzon ZL (2010) Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. *J Appl Phycol* 23:439–447.

Bibliografía

- Hernández I, Peralta G, Pérez-Llorens JL, Vergara JJ, Niell FX (1997) Biomass and dynamics of growth of *Ulva* species in Palmones river estuary. *J Appl Phycol* 33:764-772.
- Henriques B (2009) Macroalgas como biomonitorizadores de poluição metálica: Um estudo no estuário do Tejo. Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia. Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Departamento de Biologia Vegetal.
- Huertas E, Bhatti S, Colman B (2005) Characterization of the CO₂-concentrating mechanism in the unicellular alga *Eustigmatos vischeri*. *Eur J Phycol* 40:409-415.
- Iglesias-Rodríguez MD, Nimer NA, Merrett MJ (1998) Carbon dioxide concentrating mechanism and the development of extracellular carbonic anhydrase in the marine picoeukaryote *Micromonas pusilla*. *New Phytol* 140:685-690.
- Irlandi E, Orlyo B, Macia S, Biber P, Jones T, Kaufman L, Lirman D, Patterson ET (2001). The influence of freshwater runoff on biomass, morphometrics and production of *Thalassia testudinum*. *Aquat Bot* 72:67-78.
- Israel A, Beer S (1992) Photosynthetic carbon acquisition in the red alga *Gracilaria conferta*. II. Rubisco carboxylase kinetics, carbonic anhydrase and HCO₃⁻ uptake. *Mar Biol* 112:697-700.
- Israel A, Hophy M (2002) Growth, photosynthetic properties and Rubisco activities and amounts of marine macroalgae grown under current and elevated seawater CO₂ concentrations. *Glob Chang Biol* 8:831-840.
- Israel A, Martinez-Goss M, Friedlander M (1999) Effect of salinity and pH on growth and agar yield of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* in laboratory and outdoor cultivation. *J Appl Phycol* 11:543-549.
- Izquierdo JJ (2001) Aspectos del ciclo de los nutrientes no conservativos en el estuario del río Palmones. Tesis doctoral. Universidad de Málaga. 231 pp.
- Jagtap TG, Untawale AG (1981) Some ecological and biochemical observations on *Caloglossa leprieurii* (Harvey) from Zuari estuary, Goa. *Seaweed Res utilization* 4:17-24.
- Ji Y, Tanaka J (2002) Effect of desiccation on the photosynthesis of seaweeds from the intertidal zone in Honshu, Japan. *Phycol Res* 50:145-153.
- Johnston AM (1991) The acquisition of inorganic carbon by marine macroalgae. *Can J Bot* 69: 1123-1132
- Johnston AM, Raven JA (1986a) The analysis of photosynthesis in air and water of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *Oecologia* 69: 288-295.
- Johnston AM, Raven JA (1986b) The utilization of bicarbonate ions by the macroalga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis. *Plant Cell Environ* 9: 175-184

- Johnston AM, Raven JA (1987) The C₄-like characteristics of the intertidal macroalga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis (Fucales, Phaeophyta). *Phycologia* 26:159–166.
- Johnston AM, Maberly S, Raven JA (1992) The acquisition of inorganic carbon by four red macroalgae. *Oecologia* 92:317–326.
- Johnson S (1982) Carbon dioxide hydration and dehydration kinetics in seawater. *Limnol oceanogr* 27: 849-855.
- Johnson WS, Gigon A, Gulmon SL, Mooney HA (1974) Comparative photosynthetic capacities of intertidal algae under exposed and submerged conditions. *Ecology* 55:450-453.
- Kaplan A, Reinhold L (1999) CO₂ concentrating mechanisms in microorganisms. *Annu Rev Plant Physiol* 50:539–570.
- Kaplan A, Schwarz R, Lieman-Hurwitz J, Reinhold L (1991) Physiological and molecular aspects of the inorganic carbon-concentrating mechanism in cyanobacteria. *Plant Physiol* 97:851–855.
- Karlsson J, Clarke AK, Chen ZY, Huggins SY, Park YI, Husic HD, Moroney JV, Samuelsson G (1998) A novel alpha-type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂. *EMBO J* 17: 1208–1216.
- Karlsson J, Ramazanov Z, Hiltonen T, Gardeström P, Samuelsson G (1994) Effect of vanadate on photosynthesis and the ATP/ADP ratio in low-CO₂-adapted *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Planta* 192:46–51.
- Karlsson J, Hiltonen T, Husic HD, Ramazanov Z, Samuelsson G (1995) Intracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 109:533–539.
- Karsten U, Kirst GO (1989a) The effect of salinity on growth, photosynthesis and respiration in the estuarine red alga *Bostrychia radicans*. *Helgoländer Meresunters* 43:61–66.
- Karsten U, Kirst GO (1989b) Incomplete turgor pressure regulation in the “Terrestrial” red alga, *Bostrychia scorpioides* (Huds.) Mont. *Plant Sci* 61:29–36.
- Karsten U, King RJ, Kirst GO (1990) The distribution of D-sorbitol and D-dulcitol in the red algal genera *Bostrychia* and *Stictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) - a re-evaluation. *Br Phycol J* 25:363–366.
- Karsten U, West JA, Ganesan EK (1993) Comparative physiological ecology of *Bostrychia moritziana* (Ceramiales, Rhodophyta) from freshwater and marine habitats. *Phycologia* 32(6):401-409.

Bibliografía

- Karsten U, Koch S, West JA, Kirst GO (1994a) The intertidal red alga *Bostrychia simpliciuscula* Harvey ex J. Agardh from a mangrove swamp in Singapore: Acclimation to light and salinity. *Aquat Bot* 48:313–323.
- Karsten U, West JA, Zuccarello GC, Kirst GO (1994b) Physiological ecotypes in the marine alga *Bostrychia radicans* (Ceramiales, Rhodophyta) from the east coast of the USA. *J Phycol* 30:174–182.
- Karsten U, Barrow KD, Nixdorf O, King RJ (1996) The Compability with enzyme activity of unusual organic osmolytes from mangrove red algae. *J Plant Physiol* 23:577–582.
- Kentula ME, DeWitt TH (2003) Abundance of seagrass (*Zostera marina* L.) and macroalgae in relation to the salinity-temperature gradient in Yaquina Bay, Oregon, USA. *Estuaries* 26:1130–1141.
- Khalifah RG (1971) The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J Biol Chem* 246:2561–2573.
- Kirst GO (1989) Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu Rev Plant Physiol* 40:21–53.
- Kirst GO, Wichmann F (1987) Adaptation of the euryhaline Charophyte *Lamprothamnium papulosum* to brackish y freshwater: photosynthesis y respiration. *J Plant Physiol* 131: 413- 422.
- Klenell M, Snoeijs P, Pedersén M (2004) Active carbon uptake in *Laminaria digitata* and *L. saccharina* (Phaeophyta) is driven by a proton pump in the plasma membrane. *Hydrobiologia* 514:41–53.
- Korb R, Raven J, Johnston A (1998) Relationships between aqueous CO₂ and stable carbon isotope discrimination in the diatoms *Chaetoceros calcitrans* and *Ditylum brightwellii*. *Mar Eco Prog Ser* 171: 303-305.
- Kubien DS, Brown CM, Kane HJ (2011) Quantifying the amount and activity of Rubisco in leaves. *Photosynth Res Protoc* 684:349–362.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Laing WA, Ögren WL, Hageman RH (1974) Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Plant Physiology* 54: 678–685.
- Langdon C (1988) On the cause of interspecific differences in the growth-irradiance relationship for phytoplankton. II. A general review. *J Plankton Res* 10:1291–1312.

- Larsson C, Axelsson L (1999) Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. *Eur J Phycol* 34:79–86.
- Larsson C, L Axelsson, H Ryberg, S Beer (1997) Photosynthetic carbon utilization by *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) from a Swedish rockpool. *Eur J Phycol* 32:49-54.
- Laws EA (1991) Photosynthesis quotients, new production and net community production in the open ocean. *Deep Sea Res A* 38:143-167.
- Lignell Å, Pedersén M (1989) Effects of pH and inorganic carbon concentration on growth of *Gracilaria secundata*. *Br Phycol J* 24:83–89.
- Lin G, Banks T, Sternberg LDLO (1991) Variation in $\delta^{13}\text{C}$ values for the seagrass *Thalassia testudinum* and its relations to mangrove carbon. *Aquatic Botany* 40:333–341.
- Lobban C, Harrison P (1997) *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge Univ Press USA 366 pp.
- Long BM, Rae BD, Badger MR, Price GD (2011) Over-expression of the β -carboxysomal CcmM protein in *Synechococcus* PCC7942 reveals a tight co-regulation of carboxysomal carbonic anhydrase (CcA) and M58 content. *Photosynth Res* 109:33–45.
- López-Figueroa F, Niell FX (1987) Feeding behaviour of *Hydrobia ulvae* (Pennant) in microcosms. *J Exp Mar Biol Ecol* 114:153-167.
- Lorimer GH, Badger MR, Andrews TJ (1976) The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry* 15:529–536.
- Lucas WJ (1983) Photosynthetic assimilation of exogenous HCO_3^- by aquatic plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 34:71-104.
- Maberly SC (1990) Exogenous sources of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. *J Phycol* 26:439–449.
- Maberly SC, Raven JA, Johnston AM (1992) Discrimination between ^{12}C and ^{13}C by Marine Plants. *Oecologia* 91:481–492.
- Macler BA (1988) Salinity Effects on photosynthesis, carbon allocation, and nitrogen assimilation in the red alga, *Gelidium coulteri*. *Plant Physiol* 88:690–694.
- Majeau N, Coleman JR (1994) Correlation of Carbonic Anhydrase and Ribulose -1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase expression in pea. *Plant Physiol* 104:1393–1399.

Bibliografía

- Makino A, Mae T, Ohira K (1983) Photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves. *Plant Physiol* 73:1002-1007.
- Mann FD, Steinke TD (1988) Photosynthetic and respiratory responses of the mangrove-associated red algae, *Bostrychia radicans* and *Caloglossa leprieurii*. *S Afr J Bot* 54:203-207.
- Marre MT, Moroni A, Albergoni FG, Marre E (1988) Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion. *Plant Physiol* 87: 25–29.
- Martínez-Gil M, Díaz P, Gallardo T, Bárbara I (2007) Aportación al conocimiento de las algas marinas bentónicas del litoral comprendido entre el estuario del río Quejo y Punta de la Mesa, Noja, Cantabria, España. *Bot Comput* 31.
- Martins I, Oliveira JM, Flindt MR, Marques JC (1999) The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal). *Acta Oecologica* 20:259–265.
- Mata L, Silva J, Schuenhoff A, Santos R (2007) Is the tetrasporophyte of *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales) limited by inorganic carbon in integrated aquaculture? *J Phycol* 43:1252–1258.
- McAvoy KM, Klug JL (2005) Positive and negative effects of riverine input on the estuarine green alga *Ulva intestinalis* (syn. *Enteromorpha intestinalis*) (Linneaus). *Hydrobiologia* 545:1–9.
- Mehrbach C, Culbertson CH, Hawley JE, Pytkowick RM (1973) Measurement of the apparent dissociation constant of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol Oceanogr* 18:897-907.
- Mercado JM, Niell FX (1999) Carbonic anhydrase activity and use of HCO₃⁻ in *Bostrychia scorpioides* (Ceramiales, Rhodophyceae). *Eur J Phycol* 34:13–19.
- Mercado JM, Niell FX (2000) Carbon dioxide uptake by *Bostrychia scorpioides* (Rhodophyceae) under emersed conditions. *Eur J Phycol* 35:45–51.
- Mercado JM, Carmona R, Niell FX (2000) Affinity for inorganic carbon of *Gracilaria tenuistipitata* cultured at low and high irradiance. *Planta* 210:758-764.
- Mercado JM, Niell FX, Figueroa FL (1997a) Regulation of the mechanism for HCO₃⁻ use by the inorganic carbon level in *Porphyra leucosticta* Thur. in Le Jolis (Rhodophyta). *Planta* 201:319–325.
- Mercado JM, Figueroa FL, Niell FX, Axelsson L (1997b) A new method for estimating external carbonic anhydrase in macroalgae. *J Phycol* 33:999–1006.
- Mercado JM, Gordillo FJL, Figueroa FL, Niell FX (1998) External carbonic anhydrase and affinity for inorganic carbon in intertidal macroalgae. *J Exp Mar Bio Ecol* 221:209–220.

- Mercado JM, Viñepla B, Figueroa FL, Niell FX (1999) Location of different isoenzymatic forms of carbonic anhydrase in the red macroalga *Porphyra leucosticta*. *Physiol Plant* 106: 69–74.
- Mercado JM, Niell FX, Silva J, Santos R (2003) Use of light and inorganic carbon acquisition by two morphotypes of *Zostera noltii* Hornem. *J Exp Mar Bio Ecol* 297:71–84.
- Mercado JM, Andría RJ, Pérez-Lloréns L, Vergara JJ, Axelsson L (2006) CO₂ concentration mechanisms in the plasma membrane of *Laminaria saccharina*. *Photosynth Res* 88:259–268.
- Mercado JM, Santos CB de los, Pérez-Llorens JL, Vergara JJ (2009) Carbon isotopic fractionation in macroalgae from Cádiz Bay (Southern Spain): Comparison with other biogeographic regions. *Estuar Coast Shelf Sci* 85:449–458.
- Meyer M, Griffiths H (2013) Origins and diversity of eukaryotic CO₂-concentrating mechanisms: lessons for the future. *J Exp Bot* 64:769–86.
- Michelet B, Boutry M (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase - a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol* 108:1–6.
- Miller AG, Turpin DH, Calvin DT (1984) Na⁺ requirement for growth, photosynthesis, and pH regulation in the alkalotolerant cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *J Bacteriol* 159:100–6.
- Mimura T, Müller R, Kaiser WM, Shimmen T, Dietz KJ (1993) ATP-dependent carbon transport in perfused *Chara* cells. *Plant Cell Environ* 16:653–661.
- Montague C, Ley JA (1993) A possible effect of salinity fluctuation on abundance of benthic vegetation and associated fauna in north-eastern Florida Bay. *Estuaries* 16:703–717.
- Moreno S (2008) La producción de gases con efecto invernadero en el estuario del río Palmones. Tesis doctoral. Universidad de Málaga. 187pp.
- Moreno S, Niell FX (2004) Scales of variability in the sediment chlorophyll content of the shallow Palmones River Estuary, Spain. *Estuar Coast Shelf Sci* 60: 49–57
- Morita E, Abe T, Tsuzuki M, Fujiwara S, Sato N, Hirata A, Sonoike K, Nozaki H (1999) Role of pyrenoids in the CO₂-concentrating mechanism: comparative morphology, physiology and molecular phylogenetic analysis of closely related strains of *Chlamydomonas* and *Chloromonas* (Volvocales). *Planta* 208:365–372.
- Moroney JV, Husic HD, Tolbert NE (1985) Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 79:177–183.

Bibliografía

- Moroney JV, Togasaki RK, Husic HD, Tolbert NE (1987) Evidence that an internal carbonic anhydrase is present in 5% CO₂-grown and air-grown *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 84:757–761.
- Moroney JV, Bartlett SG, Samuelsson G (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ* 24:141–153.
- Moroney JV, Ma Y, Frey WD, Fusilier KA, Pham TT, Simms TA, DiMario RJ, Yang J, Mukherjee B (2011) The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression and physiological roles. *Photosynth Res* 109:133–150.
- Mosisch TD (1993) Effects of salinity on the distribution of *Caloglossa leprieurii* (Rhodophyta) in the Brisbane River, Australia. *J Phycol* 29:147-153.
- Moulin P, Andría JR, Axelsson L, Mercado JM (2011) Different mechanisms of inorganic carbon acquisition in red macroalgae (Rhodophyta) revealed by the use of TRIS buffer. *Aquat Bot* 95:31–38.
- Murru M, Sandgren CD (2004) Habitat matters for inorganic carbon acquisition in 38 species of red macroalgae (Rhodophyta) from Puget Sound, Washington, Usa. *J Phycol* 40:837–845.
- Munda IM, Gubensek F (1986) The amino acid content of some benthic marine algae from the Northern Adriatic. *Botanica Marina* 29:367-372.
- Nair NB, Sobha V, Arunachalam M (1982) Algae from Southern Kerala Coast. *Indian J Mar Sci* 11:266-269.
- Nara M, Siraiwa Y, Hirokawa T (1989) Changes in the carbonic anhydrase activity and the rate of photosynthetic O₂ evolution during the cell cycle of *Chlorella ellipsoidea* C-27. *Plant Cell Physiol* 30(2):267-275.
- Narashimha Rao GM, Rangaiah GS, Dora SVVSN (2008) Spore shedding in *Catenella impudica* from the Godavari Estuary at Bhiravapalem, India. *Algae* 23:71–74.
- Niell FX (1979) Structure and sucession in a rocky algal community of a temperate intertidal system. *J Exp Mar Biol Ecol* 36(2):185–200.
- Palmqvist K, Ramazanov Z, Samuelsson G (1990) The role of extracellular carbonic anhydrase for accumulation of inorganic carbon in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. A comparison between wild-type and cell-wall-less mutant cells. *Physiol Plant* 80:267–276.
- Palmqvist K, Sültemeyer DF, Balder P, Andrews TJ, Badger MR (1995) Characterisation of inorganic carbon fluxes, carbonic anhydrase(s) and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase in the green unicellular alga *Coccomyxa*. *Planta* 197:352–361.

- Palmqvist K, Sjöberg S, Samuelsson G (1988) Induction of inorganic carbon accumulation in the unicellular green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiol* 87:437-442.
- Palomo L (2004) La influencia de *Sarcocornia perennis* alpini en el flujo de nutrientes del estuario del Río Palmones. Tesis doctoral. Universidad de Málaga. 225 pp.
- Palomo L, Clavero V, Izquierdo JJ, Avilés A, Becerra J, Niel FX (2004) Influence of macrophytes on sediment phosphorus accumulation in a eutrophic estuary (Palmones River, Southern Spain). *Aquatic Botany* 80: 103-113.
- Palomo L, Niell FX (2009). Primary production and nutrient budgets of *Sarcocornia perennis* ssp. alpini (Lag.). Castroviejo in the salt marsh of the Palmones River estuary (Southern Spain). *Aquatic Botany* 91: 130–136.
- Park PK (1969) Oceanic CO₂ system: an evaluation of ten methods of investigation. *Limnol Ocean* 14:179-186.
- Parry MA, J Andalojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002) Rubisco activity: Effects of drought stress. *Ann Bot* 89:833–839.
- Peet MM, Huber SC, Patterson DT (1986) Acclimation to high CO₂ in monoecious cucumbers. II. Carbon exchange rates, enzyme activities, and starch and nutrient concentrations. *Plant Physiol* 80: 63–67.
- Peña EJ, Zingmark R, Nietch C (1999) Comparative photosynthesis of two species of intertidal epiphytic macroalgae on mangrove roots during submersion and emersion. *J Phycol* 35:1206–1214.
- Pérez-Llorens JL, Niell FX (1993) Seasonal dynamics of biomass and nutrient content in the intertidal seagrass *Zostera noltii* from Palmones river Estuary, Spain. *Aquat Bot* 46:49-66.
- Pérez-Llorens JL, Vergara JJ, Pino RR, Hernández I, Peralta G, Niell FX (1996) The effect of photoacclimation on the photosynthetic physiology of *Ulva curvata* and *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyta). *Eur J Phycol* 31:349-359.
- Pérez-Lloréns JL, Brun FG, Andría J, Vergara JJ (2004) Seasonal and tidal variability of environmental carbon related physico-chemical variables and inorganic C acquisition in *Gracilariopsis longissima* and *Enteromorpha intestinalis* from Los Toruños salt marsh (Cádiz Bay, Spain). *J Exp Mar Bio Ecol* 304:183–201.
- Pierrot D, Lewis E, Wallace DWR (2006) MS Excel program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105a. Carbon dioxide information analysis center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee.
- Porter MA, Grodzinski B (1984) Acclimation to high CO₂ in bean: carbonic anhydrase and ribulose bisphosphate carboxylase. *Plant Physio* 174:413-416.

Bibliografía

- Portis AR (1992) Regulation of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:415–437.
- Post E (1963) Zur Verbreitung und Ökologie der *Bostrychia-Caloglossa*-Assoziation. *Int Rev ges Hydrobiol.* 48: 47–152.
- Pressman BC (1976) Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* 45:501-530.
- Pressman BC, Fahim M (1982) Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:445-490.
- Price GD, Badger MR (1989) Ethoxycarbonyl inhibition of CO₂ uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 without apparent inhibition of internal carbonic anhydrase activity. *Plant Physiol* 89:37–43.
- Ramazanov Z, Cardenas J (1992) Inorganic carbon transport across cell compartments of the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Physiol Plant* 85:121-128.
- Raven JA (1984) Energetics and transport in aquatic plants. A.R. Liss, New York
- Raven JA (1991) Physiology of inorganic C acquisition and implications for resource use efficiency by marine phytoplankton: relation to increased CO₂ and temperature. *Plant Cell Environ* 14:779–794.
- Raven JA (1997) CO₂ concentrating mechanisms: a direct role for thylakoid lumen acidification. *Plant Cell Environ* 20:147–154.
- Raven JA (2001) A role for mitochondrial carbonic anhydrase in limiting CO₂ leakage from low CO₂-grown cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ* 24:261–265.
- Raven JA, Lucas WJ (1985) The energetics of carbon acquisition. In: Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms, pp. 305-324, Lucas WJ, Berry JA, eds. American Society of Plant Physiologists. Rockwell, Maryland.
- Raven JA, Johnston AM (1991) Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine phytoplankton and their implications for the use of other sources. *Limnol Oceanogr* 36(8):1701-1714.
- Raven JA, Hurd CL (2012) Ecophysiology of photosynthesis in macroalgae. *Photosynth Res* 113:105-125.
- Raven JA, Walker D, Johnston A, Handley LL, Kübler JE (1995) Implications of ¹³C natural abundance measurements for photosynthetic performance by marine macrophytes in their natural environment. *Mar Ecol Prog Ser* 123:193–205.
- Raven JA, Johnston AM, Kübler JE, Korb R, McInroy SG, Beardall J, Clayton MN, Vanderklift M, Fredriksen S, Dunton KH (2002a) Seaweeds in Cold Seas: evolution and carbon acquisition. *Ann Bot* 90:525–536.

- Raven JA, Johnston AM, Kübler JE, Korb R, McInroy SG, Handley LL, Scrimgeour CM, Walker DI, Beardall J, Vanderklift M, Frediksen S, Dunton KH (2002b) Mechanistic interpretation of carbon isotope discrimination by marine macroalgae and seagrasses. *Funct Plant Biol* 29:355–378.
- Raven JA, Giordano M, Beardall J, Maberly SC (2012) Algal evolution in relation to atmospheric CO₂: carboxylases, carbon-concentrating mechanisms and carbon oxidation cycles. *Phil Trans R Soc B* 367:493–507
- Ray S, Klenell M, Choo KS, Pedersén, M, Snoeijs P (2003) Carbon acquisition mechanisms in *Chara tomentosa*. *Aquat Bot* 76:141–154.
- Reis RP, Loureiro RR, Mesquita FS (2011) Does salinity affect growth and carrageenan yield of *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales/Rhodophyta)? *Aquac Res* 42:1231–1234.
- Reiskind JB, Seamon PT, Bowes G (1988) Alternative methods of photosynthetic carbon assimilation in marine macroalgae. *Plant Physiol* 87:686–92.
- Riley JP, Chester R (1971) Introduction to marine chemistry. Academic Press, London and New York. 465 p.
- Sallas L, Luomala EM, Ultriainen J, Kainulainen P, Holopainen JK (2003) Contrasting effects of elevated carbon dioxide concentration and temperature on Rubisco activity, chlorophyll fluorescence, needle ultrastructure and secondary metabolites in conifer seedlings. *Tree Physiol* 23:97–108.
- Sánchez JM, Izco J, Medrano M (1996) Relationships zonation between vegetation and altitude in a salt-marsh system in northwest Spain. *J Veg Sci* 7: 695–702.
- Sánchez de Pedro R, Niell FX, Carmona R (2013) Differential nutrient uptake by two segregated red algae in an estuarine intertidal zone. *Phycologia* 52:461–471.
- Sánchez de Pedro R, Niell FX, Carmona R (2014) Understanding the intertidal zonation of two estuarine red macroalgae from ex situ photoacclimative responses. *European Journal of Phycology*. En imprenta.
- Satoh D, Hiraoka Y, Colman B, Matsuda Y (2001) Physiological and molecular biological characterization of intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiology* 126:1459–1470.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9:671–675.
- Schwarz R, Reinhold L, Kaplan A (1995) Low activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in carboxysome-defective *Synechococcus* Mutants. *Plant Physiol* 108:183–190.
- Shibata M, Katoh H, Sonoda M, Ohkawa H, Shimoyama M, Fukuzawa H, Kaplan A, Ogawa T (2002a) Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in

Bibliografía

- cyanobacteria - function and phylogenetic analysis. *J Biol Chem* 277:18658–18664.
- Shibata M, Ohkawa H, Katoh H, Shimoyama M, Ogawa T (2002b) Two CO₂-uptake systems: four systems for inorganic carbon acquisition in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Funct Plant Biol* 29:123–29.
- Silva J, Lezama N, Rull Lluch J (2010) Mapas de distribución de algas marinas de la Península Ibérica y las Islas Baleares. XXIV. *Catenella caespitosa*, *Caulacanthus ustulatus* y *Feldmannophycus rayssiae* (Caulacanthaceae, Rhodophyta). *Botanica Complutensis* 34:89-93.
- Sinetova MA, Kupriyanova EV, Markelova AG, Allakhverdiev SI, Pronina NA (2012) Identification and functional role of the carbonic anhydrase Cah3 in thylakoid membranes of pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1817:1248–1255.
- Smith RG, Bidwell RG (1987) Carbonic anhydrase-dependent inorganic carbon uptake by the red macroalga, *Chondrus crispus*. *Plant Physiol* 83:735–738.
- Smith RG, Bidwell RG (1989) Mechanism of photosynthetic carbon dioxide uptake by the red macroalga, *Chondrus crispus*. *Plant Physiol* 89:93–99.
- Smith SV (1985) Physical, chemical and biological characteristics of CO₂ gas flux across their air–water interface. *Plant Cell Environm* 8:387–398.
- Snoeijs P, Klenell M, Choo KS, Comhaire I, Ray S, Pedersén M (2002) Strategies for carbon acquisition in the red marine macroalga *Coccotylus truncatus* from the Baltic Sea *Mar Biol* 140:435–444.
- So AKC, Espie GS, Williams EB, Shively JM, Heinhorst S, Cannon GC (2004) A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. *J Bacteriology* 186:623–630.
- Sokal RR, Rohlf FJ (2001) *Biometry*. 7th ed. Freeman, New York, 887 pp.
- Sültemeyer DF (1998) Fast induction of high-affinity HCO₃⁻ transport in cyanobacteria. *Plant Physiol* 116:183–192.
- Sültemeyer D, Rinast KA (1996) The CO₂ permeability of the plasma membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*: mass-spectrometric ¹⁸O-exchange measurements from ¹³C¹⁸O₂ in suspensions of carbonic anhydrase-loaded plasma-membrane vesicles. *Planta* 200:358-368.
- Sültemeyer DF, Miller AG, Espie GS, Fock HP, Canvin DT (1989) Active CO₂ transport by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 89:1213-1219.
- Sültemeyer DF, Fock HP, Canvin DT (1990) Mass-spectrometric measurement of intracellular carbonic-anhydrase activity in high and low Ci cells of

- Chlamydomonas*- Studies using ^{18}O -exchange with $^{13}\text{C}/^{18}\text{O}$ labelled bicarbonate. *Plant Physiol* 94:1250–1257
- Sültemeyer D, Schmidt C, Fock HP (1993) Carbonic anhydrases in higher plants and aquatic microorganisms. *Physiol Plant* 88:179–190.
- Surif MB, Raven JA (1989) Exogenous inorganic carbon sources for photosynthesis in seawater by members of the Fucales and the Laminariales (Phaeophyta): ecological and taxonomic implications. *Oecologia* 78:97–105.
- Surif MB, Raven JA (1990) Photosynthetic gas exchange under emersed conditions in eulittoral and normally submersed members of the Fucales and the Laminariales: interpretation in relation to C isotope ratio and N and water use efficiency. *Oecologia* 82:68–80.
- Tchernov D, Hassidim M, Luz B, Sukenik A, Reinhold L, Kaplan A (1997) Sustained net CO_2 evolution during photosynthesis by marine microorganism. *Curr Biol* 7:723–728.
- Tripp BC, Smith K, Ferry JG (2001) Carbonic Anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *J Biol Chem* 276:48615-48618.
- Uusitalo J (1996) Algal carbon uptake and the difference between alkalinity and high pH ("alkalization"), exemplified with a pH drift experiment. In: Figueroa FL, Jiménez C, Pérez-Lloréns JL, Niell FX (eds) Underwater light and algal photobiology. *Sci Mar* 60:129-134.
- von Caemmerer S, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-387.
- Wilbur KM, Anderson NG (1948) Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chem* 176:147-154.
- Wiltens J, Schreiber U, Vidaver W (1978) Chlorophyll fluorescence induction: an indicator of photosynthetic activity in marine algae undergoing desiccation. *Can J Bot* 56:2787-2794.
- Williams PJB, Robertson JE (1991) Overall planktonic oxygen and carbon dioxide metabolisms: the problem of reconciling observations and calculations of photosynthetic quotients. *J Plankton Res* 13:153-169.
- Williams T, Turpin D (1987) The role of external carbonic anhydrase in inorganic carbon acquisition by *Chlamydomonas reinhardtii* at Alkaline pH. *Plant Physiol* 83:92-96.
- Yarish C, Edwards P (1982) A field and cultural investigation of the horizontal and seasonal distribution of estuarine red algae of New Jersey. *Phycologia* 21:112-124.

Bibliografía

- Yarish C, Edwards P, Casey S (1980) The effects of salinity, calcium and potassium variations on the growth of two estuarine red algae. *J Exp Mar Biol Ecol* 47(3):235-249.
- Zablackis E, West JA, Liao ML, Bacic A (1993) Reproductive biology and polysaccharide chemistry of the red alga *Catenella* (Caulacanthaceae, Gigartinales). *Bot Mar* 36:195-202.
- Zou D, Xia J, Yang Y (2004) Photosynthetic use of exogenous inorganic carbon in the agarophyte *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Aquaculture* 237:421–431.
- Zou D, Gao K, Chen W (2011) Photosynthetic carbon acquisition in *Sargassum henslowianum* (Fucales, Phaeophyta), with special reference to the comparison between the vegetative and reproductive tissues. *Photosynth Res* 107:159–68.
- Zuccarello GC, Buchanan J, West JA (2006) Increased sampling for inferring phylogeographic patterns in *Bostrychia Radicans/B. Moritziana* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in the Eastern USA. *J Phycol* 42:1349–1352.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Relación de inhibidores específicos de los canales de incorporación de Ci en células de algas eucariotas y diana de dichos inhibidores.	11
Tabla 2. Soluciones empleadas para la electroforesis y composición de los geles.	46
Tabla 3. Cantidad de enzimas requeridas para la elaboración del cóctel. Todas las enzimas son de la marca comercial Sigma-Aldrich.	49
Tabla 4. Composición del agua de mar artificial empleada en los experimentos de salinidad.	51
Tabla 5. Composición del agua de mar con sorbitol empleada en los experimentos a osmolaridad constante en ausencia de iones Na ⁺ y Cl ⁻	53
Tabla 6. Composición del agua de mar con cloruro de colina empleada en los experimentos a osmolaridad constante en ausencia de iones Na ⁺	54
Tabla 7. Valores de Actividad Anhidrasa Carbónica Externa y Total (REA g ⁻¹ PF) en <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i>	58
Tabla 8. Maximum net photosynthetic rate, half-saturation point for inorganic carbon (Ci) and photosynthetic conductance for Ci and CO ₂ obtained from the P-C curves.	71
Tabla 9. Initial NPR (net photosynthetic rate) estimated as O ₂ evolution and also as CO ₂ uptake (first two minutes), from the pH-drift experiments, and photosynthetic quotient (PQ) in <i>B. scorpioides</i> and <i>C. caespitosa</i>	74
Tabla 10. CO ₂ compensation points (CO ₂ CP): calculated from the pH-drift experiment and from the IRGA experiment.	75

Figuras

Figura 1. Modelo general de los CCM en cianobacterias (Badger y Price 2003).	8
Figura 2. Esquema del transporte de carbono inorgánico y la acumulación de CO ₂ en células de algas eucariotas. (Tomado de Giordano et al. 2005).	9
Figura 3. Imagen de <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i> sobre una placa de Petri y detalle de las mismas.	22
Figura 4. Situación geográfica y detalle del estuario, incluyendo la posición de la zona de muestreo.	23
Figura 5. Disposición de <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i> en el intermareal del estuario del río Palmones.	24
Figura 6. Esquema de los experimentos realizados en el presente trabajo.	27
Figura 7. Fotografía del sistema para la medida de fotosíntesis como evolución de O ₂	28

Figura 8. Fotografía del analizador de gases Infrarrojos (IRGA, Sensor de CO ₂ modelo Li-820) en modo abierto.....	30
Figura 9. Esquema del diseño experimental en el estudio del efecto de los inhibidores sobre la incorporación de Ci en el IRGA.....	32
Figura 10. Imagen del equipo utilizado para las medidas de TFN como incorporación de Ci en emersión.....	33
Figura 11. Imagen del equipo empleado en la estimación de la ACA.....	34
Figure 12. Picture of a pH-meter connected to a Hansatech chamber in order to measure simultaneously O ₂ evolution and pH drift.....	40
Figure 13. IRGA closed system, as described by Browse (1985).....	42
Figura 14. Esquema del procedimiento de preparación de las muestras de alga para el posterior análisis de la enzima Rubisco.....	45
Figura 15. Fotografía de la polimerización del gel de separación y posterior electroforesis a una intensidad de 80 mV.....	47
Figura 16. Imagen escaneada de uno de los geles de electroforesis a partir del cual se realizó la cuantificación de la enzima Rubisco.....	48
Figura 17. Esquema de los cultivos con distintos tratamientos (NaCl, Sorbitol y Cloruro de colina) y a la osmolaridad correspondiente a las salinidades 20, 36 y 45	52
Figura 18. Porcentaje de inhibición de la tasa de fotosíntesis (evolución de O ₂) en <i>B. scorpioides</i> con respecto al control, con concentraciones crecientes de inhibidores específicos	61
Figura 19. Porcentaje de inhibición de la tasa de fotosíntesis (evolución de O ₂) en <i>C. caespitosa</i> con respecto al control, frente a concentraciones crecientes de inhibidores específicos	62
Figura 20. Porcentaje de inhibición de la ACAext (REA g ⁻¹ PF) de la especie <i>B. scorpioides</i> en presencia de concentraciones crecientes de inhibidores específicos	65
Figura 21. Porcentaje de inhibición de la ACAext (REA g ⁻¹ PF) en <i>C. caespitosa</i> en presencia de concentraciones crecientes de inhibidores específicos	66
Figura 22. Porcentaje de inhibición de la ACAtotal (REA g ⁻¹ PF) con respecto al control en ambas especies.	67
Figura 23. Efecto de los distintos inhibidores sobre la TFN (incorporación de Ci), expresado como porcentaje de inhibición respecto al control	69
Figure 24. Response of photosynthesis to increasing inorganic carbon concentration in <i>B. scorpioides</i> and <i>C. caespitosa</i>	70
Figure 25. Changes in the pH and net photosynthetic rate (NPR) as O ₂ evolution and CO ₂ uptake along 12 hours in the NSW incubated with <i>Bostrychia scorpioides</i> (a) and <i>Catenella caespitosa</i> (b).....	73
Figure 26. Change in the concentration of the different Ci forms along the pH- drift experiments..	76
Figure 27. CO ₂ depletion in the incubation medium for about 11 hours, in <i>B. scorpioides</i> (a) and <i>C. caespitosa</i> (b)..	77

Figura 28. Concentración de la enzima Rubisco, expresada como porcentaje respecto a la proteína soluble, en <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i>	80
Figura 29. Actividad de la enzima Rubisco expresada como nmol de CO ₂ por gramo de proteína soluble y unidad de tiempo (segundos) en <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i>	81
Figura 30. Tasa de fotosíntesis neta expresada como evolución de O ₂ a distintas salinidades (10, 20, 30, 36 y 45) y sus correspondientes osmolaridades (0.3, 0.6, 0.9, 1.1 y 1.4 Osmol kg ⁻¹ ; valores entre paréntesis) en <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i>	83
Figura 31. Actividad Anhidrasa Carbónica externa a distintas salinidades (10, 20, 25, 30, 36 y 45) y por tanto a distinta osmolaridad (0.3, 0.6, 0.8, 0.9, 1.1 y 1.4 Osmol kg ⁻¹ ; valores entre paréntesis)	84
Figura 32. Efecto de tres osmolaridades (0.6, 1.1 y 1.4 Osmol kg ⁻¹) correspondientes a las salinidades 20, 36 y 45, en medio compuesto por NaCl, Sorbitol o Cloruro de colina sobre la TFN (a y b) y sobre la TR (c y d) en <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i>	85
Figura 33. Tasa de fotosíntesis neta (TFN) y tasa de respiración (TR) como incorporación de Ci en <i>B. scorpioides</i> (a y c) y <i>C. caespitosa</i> (b y d) a tres osmolaridades distintas (0.6, 1.1 y 1.4) correspondientes a las salinidades 20, 36 y 45, y con dos tratamientos para cada una de las salinidades (NaCl y Sorbitol).....	86
Figura 34. ACAext a tres osmolaridades distintas (0.6, 1.1 y 1.4 Osmol kg ⁻¹) correspondientes a las salinidades 20, 36 y 45, y con tres tratamientos para cada una de las salinidades (NaCl, Sorbitol y Cloruro de colina)	88
Figura 35. Propuesta de los mecanismos de incorporación de Ci presentes en <i>B. scorpioides</i> y <i>C. caespitosa</i>	108

ANEXO 9: Summary

1.- Introduction

The CO₂ concentration in natural seawater in equilibrium with air is 0.014 mmol L⁻¹ at 15°C (Riley and Chester 1971). This concentration is much lower than the seawater concentrations of HCO₃⁻ (2 mmol L⁻¹) and CO₃²⁻ (0.2 mmol L⁻¹) at pH 8.1-8.2 (Stumm and Morgan 1981). CO₂ is the only carbon species fixed in the carboxylation reaction of the enzyme ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), which is located in the stroma of chloroplasts (Falkowski and Raven 1997). Consequently, the CO₂ concentrations at which marine macroalgae live are low, and the CO₂ diffusion rates in seawater are 10,000 times lower than in air (Denny 1993; Lobban and Harrison 1997). These circumstances may result in a barrier to carbon acquisition at the cell membrane of aquatic photosynthetic organisms. Therefore, a low internal CO₂ concentration available for the Rubisco could cause photosynthetic limitation and even permanent damage to the photosynthetic apparatus (Demming-Adams and Adams 1992; Hanelt et al. 1992, 1993; Krause 1988; Krause and Somersalo 1989). All of these may lead to the development of different mechanisms to cope with CO₂ limitation, such as utilizing the HCO₃⁻ pool of seawater as a source of inorganic carbon (Axelsson et al. 1991; Beer 1994; Johnston and Raven 1986; Larsson and Axelsson 1999; Raven 1997). Badger and Price (1994, 2003) described a number of different Ci uptake mechanisms in cyanobacteria. One of these mechanisms is the dehydration of HCO₃⁻ for CO₂ production by external carbonic anhydrase (eCA) (Badger and Price 1994; Haglund et al. 1992b). The presence of this HCO₃⁻ uptake mechanism is usually tested by the addition of specific inhibitors. If the eCA enzyme is present, the photosynthesis of macroalgae is inhibited, to a greater or lesser extent, by dextran-bound sulfonamide (DBS), which cannot pass through the plasma membrane, and by acetazolamide (AZ), which pass the membrane very slowly (Gehl et al. 1990, Sültemeyer et al. 1990, Williams and Turpin 1987). HCO₃⁻ can also be directly transported across the membrane, after which internal CA (iCA) catalyzes its conversion into CO₂ (Beer 1994), and whose activity is inhibited by ethoxzolamide (EZ, Sültemeyer et al. 1993). This HCO₃⁻ transport can also be possible by means of a membrane proton pump (P-type H⁺-ATPase) that energizes the membrane (Taiz and Zeiger 1998) and secondary transporters (Na⁺-HCO₃⁻ symport and anion exchange proteins) that use the motive force accumulated in the membrane for the transport of different substances (secondary ions, metabolites, etc.) into and out of the cell (Michelet and Boutry 1995). The

Summary

presence of these direct HCO_3^- uptake mechanisms can also be detected using specific inhibitors: sodium orthovanadate (VAN), inhibitor of the ATPase- H^+ pumps (Gilmour et al. 1985; Karlsson et al. 1994), Monensin (MON) which dissipates the electrochemical Na^+ gradient (Pressman 1976; Pressman and Fahim 1982) and 4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid disodium salt hydrate (DIDS), a specific inhibitor of plasma membrane anion exchangers (Drechsler et al. 1993; Falke and Chan 1986; Smith and Bidwell 1989).

These putative Ci uptake pathways have been observed in cyanobacteria (Badger et al. 2006; Kaplan et al. 1991; Price et al. 1998; Sültemeyer et al. 1998) and also in green macroalgae such as *Ulva* sp. (Drechsler et al. 1993) and *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (Choo et al. 2002) and in Heterocontophytes: *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour and *Saccharina latissima* (L.) Lane. However, there are fewer studies on red macroalgae (e. g. Cook et al. 1986; Haglund et al. 1992; Johnston et al. 1992). In contrast to these algal groups where HCO_3^- use is almost ubiquitous, some of the red algae lack the ability of direct HCO_3^- uptake. Nevertheless, ATPase- H^+ pumps were found in *Coccotylus truncatus* (Snoeijs et al. 2002) and anionic exchanger proteins were observed in some other red algal species such as *Gracilaria gaditana* (Andría et al. 1999).

Although no previous studies have been focused on the inorganic carbon (Ci) uptake in *C. caespitosa*, two previous reports described the photosynthetic performance of *B. scorpioides* (Mercado and Niell 1999) and its CO_2 uptake in air (Mercado and Niell 2000). The latter also discusses the role of the eCA in that species. Both studies agreed with Mercado et al. (1998) and Giordano and Maberly (1989) in not finding a clear relationship between eCA activity and the ability of a species to use HCO_3^- in photosynthesis under water. Moreover, no data have been published about the detection of alternative Ci uptake pathways, apart from the mentioned CA activities, in these two species. Based on previous results in cyanobacterial mats (Carrasco et al. 2008) the obstruction of the CA was supposed to enhance the activity of alternative channels (if present) and viceversa.

Different techniques were performed to determine the main Ci form such as Photosynthesis-Ci curves (P-C curves), pH-drift measurements (e.g. Maberly 1990) and Carbon isotope discrimination (e.g. Raven et al. 2002) among others. On the other hand,

the only Ci form used by Rubisco is CO₂ (Raven 1991). The capture and efficient use of CO₂ by Rubisco in photosynthesis, as well as the adaptative response of different species to environmental limitations in relation to the Ci uptake, has been widely studied in cyanobacteria (Kaplan et al. 1991; Sultemeyer 1998; Badger et al. 2002; Badger 2003; Badger et al. 2006; Carrasco et al. 2008) and microalga (Moroney et al. 1985; Karlsson 1995; Eriksson et al. 1996; Colman et al. 2002). However, the relationship between the Ci uptake and the Rubisco activity has been poorly described for macroalgae (Beer et al. 1990; Israel and Hophy 2002). The possible covariation of the Ci uptake mechanisms and the concentration and activity of the enzyme Rubisco, which uses CO₂ as substrate, has been discussed for the two species of estuarine macroalgae in this study.

The environmental conditions of estuarine habitats fluctuate widely. *Bostrychia scorpioides* (Hudson) Montagne ex Kützing and *Catenella caespitosa* (Withering) L. M. Irvine are the two main rhodophytes found in the Palmones river estuary (Southern Spain). Both species live among salt marsh plants in the estuarine intertidal. Their zonation takes place along a horizon of 50 cm with a clear segregation: *B. scorpioides* lives in the upper position of the shore and *C. caespitosa* grows on the lower zone, even over the mudflat sediment, although both coexist in the middle zone (Sánchez de Pedro et al. 2013). In relation to the fluctuating conditions in the estuary in terms of ionic concentration, the effect of salinity and ionic changes have been described for different species in studies such as Gillham (1957), Kentula y DeWitt (2003), Martins et al. (1999) or McAvoy and Klug (2005). Variations in the salinity mainly affect the Na⁺ and Cl⁻ concentrations in water. Taking into account the possible presence of HCO₃⁻ / Na⁺ symport in these species, it can be hypothesized that the presence of Na⁺ in the medium could affect the Ci uptake mechanisms. These mechanisms have not been previously studied concerning the different salinity and osmolarity that *B. scorpioides* and *C. caespitosa* have to deal with. However, there are several physiological studies on *Bostrychia radicans* Montagne and *Bostrychia moritziana* (Sander) J. Agardh with respect to growth, photosynthesis and respiration (Dawes et al. 1978; Yarish et al. 1979, 1980; Mann and Steinke 1988; Karsten et al. 1993, 1994).

The present study focuses on the study of the different Ci uptake pathways as well as on defining which Ci form is mainly used by *B. scorpioides* and *C. caespitosa*. Special emphasis is put on the presence of eCA and iCA, as well as the possible

relationship of these mechanisms on the Rubisco activity. Moreover, the effect of ionic concentration, one of the most fluctuant variables in the estuary, has been studied in relation to the photosynthetic activity of these two rodophytes.

The main objectives in this study are:

- 1.- To compare the eCA and iCA in *B. scorpioides* and *C. caespitosa* and to prove the existence of other channels involved in the Ci uptake.
- 2.- To define which is the main Ci form for *B. scorpioides* and *C. caespitosa*.
- 3.- To quantify the concentration and activity of the Rubisco in these two species and to check its relation with the CA and other pathways presumably involved in the Ci uptake.
- 4.- To evaluate the effect of osmolarity and salinity and also the presence of Na⁺ in the medium on the photosynthesis for both species of macroalgae.

2.- Sampling and Analytical Methods

Bostrychia scorpioides and *Catenella caespitosa* samples were collected in the intertidal of the Palmones River Estuary (Cádiz, Southern Spain). These species grow on the lower part of the stems of the estuarine and saltmarsh halophytic macrophytes, forming a defined horizon. After collection, algae were transported in darkness and cold to the laboratory, cleaned of epiphytes and maintained at 15°C in Perspex cylinders containing 2 L of aerated filtered (Whatman GF/F) natural seawater (NSW), at a salinity of 36. Photosynthetically Active Radiation (PAR) of 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, measured by a Spherical Micro Quantum Sensor (Model US-SQS/L, Walz, Effeltrich, Germany) connected to a Light Meter (LI-250A, LI-COR, Lincon, NE, USA), was provided by F20W/DL Osram fluorescent lamps under 12:12 h light: dark photoperiod. They were maintained under these conditions for 2 days prior to the experiments.

For the experimental designs included in the present thesis, four questions were considered:

1) Which are the Ci uptake mechanisms in these two species?

First, the eCA and iCA activities were determined by the potentiometric method (Haglund et al. 1992) and compared in both species. Moreover the different Ci uptake channels were identified by means of specific inhibitors (DBS, AZ, EZ, MON, DIDS and VAN), which effect was tested on photosynthesis as O₂ evolution, using an oxygen electrode Clark type DW1/AD (Oxygraph system, Liquid-Phase Oxygen Electrode Chamber, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK) and as Ci uptake in an Infra Red Gas Analyzer (IRGA; CO₂ sensor model Li-820), and also on eCA and iCA activities. Different concentrations of these inhibitors were analyzed for O₂ evolution and eCA in order to determine the minimum concentration needed to obtain the maximum inhibition percentage.

2) Which form of Ci is mainly taken up by *B. scorpioides* and *C. caespitosa*?

Once the effect of the inhibitors on the photosynthesis was defined, the main Ci form used was determined by means of different methods. First, a characterization of the photosynthesis in relation to the Ci uptake concentration was performed through P-C curves and their associated parameters. Moreover, pH-drift (Maberly 1990) and alkalinity measurements (Gran potentiometric method; Gran 1952) were carried out along several hours. From these measurements the pH and CO₂ compensation points were calculated as well as the HCO₃⁻ spontaneous dehydration (Johnson 1982). Furthermore, the CO₂-drift was directly measured, so the CO₂ and the HCO₃⁻ compensation points could also be experimentally determined. Additionally, the carbon isotopic discrimination ($\delta^{13}\text{C}$) was also measured (Maberly et al. 1992; Raven et al. 1995; Korb et al. 1998; Raven et al. 2002).

3) Are Ci uptake mechanisms related to the enzyme Rubisco?

Measurements of both concentration and activity of the enzyme Rubisco were performed in samples directly collected from the field, acclimated to the lab conditions and also incubated with inhibitors of the CA and the HCO₃⁻ / Na⁺ symporters, in order to study the possible coupling between the Ci uptake and the Rubisco enzyme. The spectrophotometric method described in Kubien et al. (2011) was used to measure the Rubisco activity in the two macroalgae. The Rubisco content was determined by means of SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli 1970).

4) Is there any relationship between Ci uptake and the ionic and osmotic characteristics of the medium?

Finally, the possibility of finding a relationship between the osmotic and ionic variability and the Ci uptake was considered. Measurements of photosynthesis and eCA activity were carried out at different salinities (10, 20, 25, 30, 36 and 45). Moreover, the effect of the presence of Na⁺ and Cl⁻ was tested on the photosynthesis and eCa activity by means of sorbitol and choline chloride.

3.- Results and Discussion

3.1.- Ci uptake mechanisms in *B. scorpioides* and *C. caespitosa*

The discussion of our results has been made in the chronological order that the experiments were carried out. Firstly, the addition of inhibitors of the different Ci uptake mechanisms was observed to affect partially the photosynthesis in the cyanobacterial mats of *Microcoleus chthonoplastes*, present in the estuary (Carrasco et al. 2008). This fact, together with the values of eCA and iCA reported by Mercado and Niell (1999, 2000) for *B. scorpioides*, led us to think about the possible Ci uptake pathways that could be present in both estuarine macroalgae. Moreover, based on Carrasco et al. (2008) results in *Microcoleus chthonoplastes* and according to our observations, we hypothesized that the obstruction of the CA was supposed to enhance the activity of alternative channels (if present) and viceversa. This fact only occurred exceptionally in *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, when the photosynthesis rate was measured in the presence of DBS, which made us to dismiss the mentioned hypothesis. However, the results performed by AZ, DBS and EZ photosynthetic rates (both as O₂ evolution and Ci uptake) and eCA activity suggested that external and internal CA activities occur in both *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, which facilitate the Ci uptake from the medium and its use by Rubisco. eCA is widely distributed among algae as a carbon concentrating mechanism and it has been observed in several red macroalgae (Haglund et al. 1992; Mercado et al. 1998; Girdano and Maberly 1989; Smith and Bidwell 1989; Snoeijs et al. 2002). Its existence and also the presence of iCA were previously reported in *B. scorpioides* (Mercado and Niell 1999, 2000) but, to our knowledge, the presence of these enzymes has not been previously observed in *C.*

caespitosa. When comparing the total CA (tCA) and the eCA activities of *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, the tCA showed values of about 200 REA g⁻¹FW in both species, several times higher than the eCA observed values. These data are in agreement with those found by Giordano and Maberly (1989) who reported that the eCA only represented an average percentage of 2.7% of the tCA, in those species with both eCA and iCA activities.

Going back to the effect of the determination of the different inhibitors, the only partial inhibition performed by AZ, DBS and EZ, could lead us to think that other pathways, alternative to CAs, might also be present, but in fact no direct uptake of HCO₃⁻ was recorded, since a negligible inhibition was observed when MON, DIDS or VAN were added. Contrary to our findings, the anion exchange proteins for HCO₃⁻ uptake have been observed in a few red macroalgae species (Andría et al. 1999, Granborn and Pedersén 1999) and the H⁺-ATPase was found in the rhodophyta *C. truncatus* (Snoeijs et al. 2002). However, the presence of eCA and the lack of ability to use HCO₃⁻ have been previously reported in some red macroalgae (Giordano and Maberly 1989; Mercado et al. 1998), as well as in the species studied in this thesis. Nevertheless, as Mercado and Niell (1999) suggested, the function of the eCA could be to create a CO₂ gradient when in emersion which facilitates its entrance into the cell where it can be used as a source of Ci. During emersion periods, which are most of the time during the tidal cycle for *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, the photosynthesis would produce a rapid increase of the water film pH before its total desiccation (Smith 1995), which would entail a low Ci availability for the algae. Thus, high pH in the water film could enhance the transformation of CO₂ into HCO₃⁻ and then accelerate the CO₂ flux across the air–water interface, as shown by Portielje and Lijklema (1995). However, a more important function could be attributed to the iCA, since its activity is significantly higher than the eCA one. It can be hypothesized that the function of the iCA is to accelerate the transformation of CO₂ into HCO₃⁻ in the cytoplasm. The HCO₃⁻ could be transported into the chloroplast where CA could catalyse its conversion to CO₂ by Rubisco (Badger and Price 1994).

3.2.- CO₂ is the main inorganic carbon source for both species

Marine macroalgae vary in their ability to use HCO₃⁻ as a C source for photosynthesis and growth, but some authors have reported the absence of this ability

Summary

among a number of rhodophytes (Cook et al. 1986; Johnston et al. 1992). Our results show that the two studied red estuarine macroalgae also lack this capacity, using CO₂ as the main Ci source for photosynthesis.

The P-C curves were considered as a reference of the photosynthetic performance carried out by *B. scorpioides* and *C. caespitosa*. From the initial slope of these curves the photosynthetic conductance for inorganic carbon (g_p) was calculated (Johnston et al. 1992). This parameter is useful to check if the measured photosynthesis is consistent with the diffusive CO₂ entrance and, consequently, to show if the use of HCO₃⁻ as a Ci source is possible. *Bostrychia scorpioides* and *C. caespitosa* presented g_p values for Ci of $0.93 \pm 0.15 \text{ m s}^{-1}$ and $0.68 \pm 0.05 \text{ m s}^{-1}$ and g_p values for CO₂ were $143 \pm 36.50 \text{ m s}^{-1}$ and $111.09 \pm 9.29 \text{ m s}^{-1}$, respectively, which are low enough to be compatible with the dependence solely on diffusive CO₂ influx and the presence of eCA (Mercado et al. 1998).

The pH-drift technique has been used in several studies to check the ability of algae to take up Ci from the medium (Axelsson and Uusitalo 1988; Johnston et al. 1992; Maberly 1990; Surif and Raven 1989). Their results are tightly correlated with the ability to use HCO₃⁻, since the change of pH due to photosynthesis could limit the availability of the different forms of Ci for the algae. Moreover, some authors such as Maberly (1990), using these experiments, reported the restriction to CO₂ utilization as a source of Ci for the species with pH compensation points below 9. This is the case of *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, presenting pH compensation points of 9.03 ± 0.03 and 8.91 ± 0.01 , respectively. In the pH-drift experiments, when estimations of CO₂ uptake and O₂ evolution rates were compared, the net photosynthetic rate (NPR) due to O₂ evolution was much higher ($35.15 \pm 3.29 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ for *B. scorpioides* and $18.59 \pm 4.48 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ for *C. caespitosa*) than the CO₂ uptake rate ($5.06 \pm 0.94 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ for *B. scorpioides* and $2.82 \pm 1.33 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ for *C. caespitosa*) especially at the beginning of the experiments. This entails very low photosynthetic quotients (PQ) of 0.14 ± 0.04 and 0.17 ± 0.09 , respectively, compared to the theoretical average value of 0.85 (CO₂/O₂) reported by Axelsson (1988) for some macroalgae. These values showed an important anomaly which suggested that these two estuarine species are very inefficient in the Ci uptake with a high energy consume, since, for example, *B. scorpioides* needs to hydrolyze 17.6 molecules of water to obtain only one CO₂ molecule. The unbalance between O₂ evolution and Ci uptake suggests a

huge energy dissipation, which can mean that the electrons from the light phase of photosynthesis may be used for other metabolic processes different from C_i assimilation.

These low PQ values in *B. scorpioides* and *C. caespitosa* are due to very low CO_2 uptake rates from the water which means that the CO_2 uptake for this two species could be mainly carried out in air, before complete desiccation, since *B. scorpioides* and *C. caespitosa* spend around 19 and 14 hours per day in emersion, respectively (Sánchez de Pedro et al. 2013). This would be supported by the higher CO_2 uptake rates in air found for *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, of $13.25 \pm 3.86 \mu\text{mol } CO_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ and $19.56 \pm 2.94 \mu\text{mol } CO_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$, respectively, and also for the even higher values found by Mercado and Niell (1999, 2000) for *B. scorpioides* in air, of $56.79 \pm 6.04 \mu\text{mol } CO_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ and $30 \mu\text{mol } CO_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ at a pH of 8.2. On the contrary, the fact that they also spend part of the day in immersion could lead us to think that the possibility of using HCO_3^- would be an ecological advantage. However, both species presented pH compensation points below 9, which confirms that the only C_i form that *B. scorpioides* and *C. caespitosa* can use is CO_2 . Similarly, a lack of use of HCO_3^- was found in other rhodophytes such as *Coccotylus truncatus* (Snoeijs et al. 2002), *Chondrus crispus* (Smith and Bidwell 1989) and a number of others (Larsson and Axelsson 1999; Maberly 1990), all of them with pH compensation points below 9. This fact agrees with the absence of HCO_3^- uptake mechanisms.

Another useful variable to determine the C_i utilization is the CO_2 compensation point. Maberly (1990) found a higher than predicted concentration of C_i in rhodophyta restricted to CO_2 . Similarly, our calculated CO_2 compensation point values of $0.56 \pm 0.04 \mu\text{mol L}^{-1}$ in *B. scorpioides* and $0.98 \pm 0.14 \mu\text{mol L}^{-1}$ in *C. caespitosa*, were significantly different from the measured ones $6.47 \pm 0.79 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $8.95 \pm 0.55 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. In this case, these marked differences are due to the stable pH at 8.1 along the experiment, whereas the calculated CO_2 compensation point was obtained from pH values of 9.03 ± 0.03 for *B. scorpioides* and 8.91 ± 0.01 for *C. caespitosa*. By buffering the pH, the potential minimum CO_2 concentration for algae to photosynthesize was measured avoiding limitations due to high pH, which is translated into a higher CO_2 concentration available for the algae. The calculated CO_2 compensation point obtained in the present study for *B. scorpioides* was half the value given by Mercado and Niell (1999), which could be due to differences in experimental

Summary

conditions (irradiance and temperature). Nevertheless, as Mercado and Niell (1999) suggested, the CO₂ compensation point obtained for *B. scorpioides* and also for *C. caespitosa* (present study) are not low enough to require the operation of HCO₃⁻ uptake mechanisms. This coherence between relatively high CO₂ compensation point and pH compensation point below 9 agrees with the observations of Maberly (1990) for species of rhodophyta that cannot use HCO₃⁻.

All the previous results are in agreement with those obtained for the isotopic carbon discriminant ($\delta^{13}\text{C}$). Raven et al. (1995), Raven et al. (2002a) and Raven et al. (2002b) observed that all the studied rhodophytes presented very negative $\delta^{13}\text{C}$ values. Maberly et al. (1992) showed a good correlation between $\delta^{13}\text{C}$ values lower than -30‰ and the lack of CO₂ concentrating mechanisms for several species of marine red algae. The $\delta^{13}\text{C}$ values found for *B. scorpioides* and *C. caespitosa* in the present study were -32.23 ± 2.06 ‰ and -32.88 ± 1.98 ‰, respectively. Previous reports found similar values for *B. scorpioides* of -30.87 ‰ (Mercado et al. 2009) and -31.20 ‰ (Raven et al. 1995). One possible explanation for such negative $\delta^{13}\text{C}$ values is that those species, growing over the saltmarsh plants near the sediment, take up very respired CO₂ from the mineralization of the organic matter in the sediment, making the $\delta^{13}\text{C}$ more negative than -30 ‰ for these two estuarine species.

3.3.- Ci uptake from an ecological point of view

pH-drift experiments and CO₂ compensation point results show that presence of CA or any direct HCO₃⁻ uptake pathway would be unlikely to be found. From an ecological point of view, previous reports suggested that the Ci uptake efficiency in macroalgae is correlated with their position on the tidal height: subtidal species only or mostly use CO₂, whereas intertidal species are able to use HCO₃⁻ in a greater or lesser extent (Maberly 1990; Johnston et al. 1992; Mercado et al. 1998). On the other hand, Maberly (1990) reported that subtidal algae, lacking the ability to use HCO₃⁻, typically live in low-light environments, under canopies of other algae or in shady sites. The rhodophytes of this study, being intertidal species, live under canopies of saltmarsh plants at low-moderate irradiance; therefore, an investment in highly efficient pathways of HCO₃⁻ uptake would not be energetically worthwhile, as Snoeijs et al. (2002) suggested for *C. truncatus*. Species frequently exposed to air could take advantage of the atmospheric CO₂ availability, rapidly dissolving into the thin boundary layer

covering the thallus before completely desiccation (Mercado and Niell 2000; Murru and Sandgren 2004). This would be an ecological advantage for estuarine species, as *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, coping with dissolved Ci limitation due to daily emersion.

As a general aspect for the studied algae and their habitat, it is important to point out that in the Palmones River estuary the spatiotemporal heterogeneity is very high as described by Moreno and Niell (2004). High variability is often rejected for environmental studies. However, in the present study, the challenge of having a high variability has been accepted. Every measurement has been made with different thalli, which presented a very high variability in spite of having been collected from the same sampling area. Never a thallus was used twice for an experiment, which involves an intrinsic genetical variability for each specimen as a result of adaptations to different microenvironments in the field. Moreover, the sample collection along different years caused an increase of the variability in the results here presented, as other authors such as Andría et al. (1999) also observed for similar ecosystems.

3.4.- Are the Rubisco content and activity related to Ci uptake?

Rubisco activity has been well studied in vascular plants in relation to the hydric stress (Parry et al. 2002; Bota et al. 2004; Flexas et al. 2006; Galmés et al. 2011) and the effect of CO₂ concentration (Campbell et al. 1988; Sallas et al. 2003; Cen and Sage 2005). However, in the present thesis, the Rubisco concentration and activity in *B. scorpioides* and *C. caespitosa* have been studied in relation to the possible presence of different Ci uptake pathways. Our results do not show a direct relationship between both mechanisms, contrary to what other authors observed in higher plants (Makino et al. 1983; Porter and Grodzinski 1984; Pet et al. 1986; Majeau y Coleman 1994). These authors reported similar patterns for CA activity and Rubisco concentration and activity. On the other hand, Rubisco depends on other external factors that modulate its activity, such as CO₂, light or nitrogen availability (García-Sánchez et al. 1994). However, Israel and Hophy (2002) considered that the variation in the Rubisco activity as a function of the CO₂ concentration is irrelevant, contrary to the findings of García-Sánchez et al. (1994) and Andría et al. (1999) for *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria gaditana*, respectively. Andría et al. (1999) observed that the treatment with Ci enriched air caused a significant decrease in the Rubisco content but higher NPR values than at low

DIC level in *G. gaditana*. This fact could denote the existence of factors other than Rubisco levels controlling photosynthesis. On the other hand, García-Sánchez et al. (1994) observed that NPR measured at normal C_i could be enhanced in *G. tenuistipitata* cultured at low C_i due to an increment in the content of Rubisco, and also to the increase in CA activity, which facilitates the C_i supply to Rubisco. For the high- C_i treatment, these authors also observed a decrease in Rubisco content and CA activity that would explain the lower NPR values obtained with respect to the control. In this sense, Lorimer et al. (1976) had already suggested that the relative amount of Rubisco is determined by pH, CO_2 and Mg^{2+} concentration. In *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, despite the existence of CAs had already been demonstrated in both species, none of the specific C_i uptake inhibitors had any effect on the Rubisco concentration and activity. The absence of a correlation between these two processes suggested that they are uncoupled or they are just independent from each other. Nonetheless, the high iCA activity found in *B. scorpioides* and *C. caespitosa* could be explained if the CO_2 that enters the cell remains accumulated as HCO_3^- and available for the Rubisco by means of the high iCA activity (Israel and Beer 1992). In any case, both *B. scorpioides* and *C. caespitosa* presented relatively low Rubisco activities of $283.9 \pm 97.6 \text{ nmol } CO_2 \text{ g}^{-1} \text{ sol prot s}^{-1}$ and $1118.0 \pm 665.3 \text{ nmol } CO_2 \text{ g}^{-1} \text{ sol prot s}^{-1}$, respectively, in comparison with those found by Israel and Hophy (2002) for chlorophytes such as *Ulva* sp. ($5003 \pm 278 \text{ nmol } CO_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW s}^{-1}$) or other rhodophytes as *Porphyra* sp. ($2300 \pm 333 \text{ nmol } CO_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW s}^{-1}$). The difference between the high iCA activity and the relatively low Rubisco activity suggests that the amount of CO_2 available for Rubisco is over the saturation.

3.5.- Influence of salinity and osmolarity on C_i uptake

The salinity range and the time periods that *B. scorpioides* and *C. caespitosa* have to deal with it in nature are wide and variable, respectively. Salinity is a local variable which widely fluctuates in coastal areas, especially in the intertidal and estuarine zones (Kirst 1989). The salinity range in the Palmones River estuary varies from 29 to 35 according to Clavero et al. (1997), although along the present thesis the measured range has been from 22 to 37. The experimental salinity range in this study was from 10 to 45, salinities at which both *B. scorpioides* and *C. caespitosa* were able to live without significant differences on their photosynthetic rates. On the other hand, eCA activity in *B. scorpioides* was not affected by the different concentrations of salt,

while *C. caespitosa* presented its optimal values of eCA between 30 and 36, which are very frequently achieved in the estuary.

Read macroalgae are, in general, sensitive to hyperosmotic treatments (Bird et al. 1986; Kirst 1989), and also to hypoosmotic ones (Irlandi et al. 2001). The hyperosmotic effect can be observed both as an increase of salinity or as a consequence of desiccation. The result of both processes is the reduction of the hydric potential in the cells. In *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, the effect of desiccation is reversible since their photosynthetic rate is recovered after their complete desiccation only half an hour after being immersed in water again (pers. com.). These two species can totally desiccate during the tidal cycle, showing salt deposits over the algae surface, so the osmotic stress is evident. However, *B. scorpioides* can survive in emersion for weeks (Post 1963). Under these circumstances, photosynthesis is unlikely to happen, although respiration is less sensitive to this kind of osmotic stress (Wiltens et al. 1978; Kirst and Wichmann 1987). Nevertheless, as it was previously discussed, the CO₂ uptake rates recorded in emersion for this two species are very high in comparison with those in water since at the beginning of the emersion period the eCA could facilitate the CO₂ diffusive entrance by increasing the CO₂ gradient with the water film covering the algae.

Considering these circumstances the Na⁺ ion was thought to have an important role in the Ci uptake, and, therefore, its absence could have some effect on the photosynthesis. Being sorbitol a compatible solute which doesn't contain Na⁺ or Cl⁻ ions, it was used to simulate the osmolarity given by different salinities but in a medium without the mentioned ions. On the other hand, Choline chloride, another organic compound, was used to incubate samples in a medium with Cl⁻ but no Na⁺, also simulating the osmotic conditions mentioned above. The results showed that the absence of Na⁺ does not affect the photosynthetic rate as O₂ evolution. This lack of sensitivity to salinity or, from another point of view, the photosynthetic plasticity performed by these two species, ensures their survival in the estuaries, where this variable continuously fluctuates.

CONCLUSIONS

1.- The presence of the enzymes eCA and iCA has been demonstrated in *Bostrychia scorpioides* and *Catenella caespitosa*. The eCA activity in *B. scorpioides* is significantly higher than in *C. caespitosa*, being the iCA activity much higher than the eCA in both species.

2.- There is no HCO_3^- uptake by $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ symport, through anionic channels or ATPase H^+ -pump P type. The partial inhibition of the photosynthesis with AZ, EZ and DBS does not entail the presence of the mentioned ways alternative to CAs. The existence of eCA is not related to HCO_3^- uptake.

3.- The only Ci form used by these two species in photosynthesis is CO_2 , according to the pH compensation points (<9), the low affinity for Ci, the high CO_2 compensation points and the carbon isotopic discriminants ($\delta^{13}\text{C} < -30\text{‰}$).

4.- CO_2 uptake in both species is mainly performed during emersion periods, showing a low photosynthetic coefficient in immersion.

5.- Rubisco activity is relatively low in relation to other species. It is also low compared to the high iCA activity, which would mean that the CO_2 concentration in the Rubisco active site is over the saturation.

6.- Rubisco activity and concentration are independent from the Ci uptake since this two variables did not presented any variations with the different CAs inhibitors.

7.- Both *B. scorpioides* and *C. caespitosa* are species with a high photosynthetic plasticity, adapted to salinity and osmolarity variations.

8.- The absence of Na^+ in the medium does not affect the photosynthesis rate in these species. On the contrary, the respiration is significantly inhibited.

ANEXO 99: Publicaciones

Mechanisms of inorganic carbon acquisition in two estuarine Rhodophyceans: *Bostrychia scorpioides* (Hudson) ex Kützing Montagne and *Catenella caespitosa* (Withering) L. M. Irvine

Miriam Ruiz-Nieto · José A. Fernández ·
F. Xavier Niell · Raquel Carmona

Received: 12 September 2013 / Accepted: 31 March 2014 / Published online: 19 April 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Marine macroalgae possess a range of mechanisms to increase the availability of CO₂ for fixation by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Of these, possession of a periplasmic or external carbonic anhydrase and the ability to use bicarbonate ions is widely distributed. The mechanisms of carbon acquisition were studied in two estuarine red macroalgae *Bostrychia scorpioides* and *Catenella caespitosa* using a range of techniques. pH-drift and CO₂-depletion experiments at constant pH suggested that CO₂ is the main source of inorganic carbon in both species. Inhibitors indicated that internal and external carbonic anhydrase were present in both species. Inhibitors also suggested that uptake of bicarbonate is unlikely to be present ($P < 0.05$).

Keywords *Bostrychia scorpioides* · Carbonic anhydrase · Carbon uptake inhibitors · *Catenella caespitosa* · Inorganic carbon uptake · pH-drift

Abbreviations

Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
eCA	External carbonic anhydrase
DBS	Dextran-bound sulfonamide
AZ	Acetazolamide
iCA	Internal carbonic anhydrase
EZ	Ethoxzolamide
VAN	Sodium orthovanadate

MON	Monensin
DIDS	4-4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate
Ci	Inorganic carbon
NSW	Natural seawater
PAR	Photosynthetically active radiation
FW	Fresh weight
NPR	Net photosynthetic rate
IRGA	Infra-red gas analyzer
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
BTP	Bis-tris propane
PQ	Photosynthetic quotient

Introduction

The CO₂ concentration in natural seawater in equilibrium with air is 0.014 mmol L⁻¹ at 15 °C (Riley and Chester 1977). This concentration is much lower than the seawater concentrations of HCO₃⁻ (2 mmol L⁻¹) and CO₃²⁻ (0.2 mmol L⁻¹) at pH 8.1–8.2 (Stumm and Morgan 1981). CO₂ is the only carbon species fixed in the carboxylation reaction of the enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), which is located in the stroma of chloroplasts (Falkowski and Raven 1997). Consequently, the CO₂ concentrations at which marine macroalgae live are low, and the CO₂ diffusion rates in seawater are 10,000 times lower than in air (Denny 1993; Lobban and Harrison 1997). These circumstances may result in a barrier to carbon acquisition at the cell membrane of aquatic photosynthetic organisms. Therefore, a low internal CO₂ concentration available for the Rubisco could cause photosynthetic limitation and even permanent photo-damage to the photosynthetic apparatus (Demming-Adams and Adams 1992; Hanelt et al. 1992, 1993; Krause 1988;

M. Ruiz-Nieto (✉) · F. X. Niell · R. Carmona
Departamento de Ecología, Universidad de Málaga, Bulevar de
Louis Pasteur s/n, 29010 Málaga, Spain
e-mail: mruiznieto@uma.es

J. A. Fernández
Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga,
Bulevar de Louis Pasteur s/n, 29010 Málaga, Spain

Krause and Somersalo 1989). All of these may lead to the development of different mechanisms to cope with the CO₂ limitation, such as utilizing the HCO₃⁻ pool of seawater as a source of inorganic carbon (Ci) (Axelsson et al. 1991; Beer 1994; Johnston and Raven 1986; Larsson and Axelsson 1999; Raven 1997). One of these mechanisms is the dehydration of HCO₃⁻ for CO₂ production by external carbonic anhydrase (eCA) (Badger and Price 1994; Flores-Moya and Fernández 1998). The presence of this HCO₃⁻ uptake mechanism is usually tested by the addition of specific inhibitors. If the eCA enzyme is present, the photosynthesis of macroalgae is inhibited, to a greater or lesser extent, by dextran-bound sulphonamide (DBS), which cannot pass through the plasma membrane, and by acetazolamide (AZ), which passes the membrane very slowly (Gehl et al. 1990; Sültemeyer et al. 1990; Williams and Turpin 1987a, b). HCO₃⁻ can also be directly transported across the membrane, after which internal CA (iCA) catalyzes its conversion into CO₂ (Beer 1994), and whose activity is inhibited by ethoxzolamide (EZ, Sültemeyer et al. 1993). This HCO₃⁻ transport can be possible by means of a membrane proton pump (P-type H⁺ ATPase) that energizes the membrane (Taiz and Zeiger 1998) and secondary transporters (Na⁺-HCO₃⁻ symport and anion exchange proteins) that use the motive force accumulated in the membrane for the transport of different substances (secondary ions, metabolites, etc.) into and out of the cell (Michelet and Boutry 1995). The presence of these direct HCO₃⁻ uptake mechanisms can be detected using specific inhibitors: sodium orthovanadate (VAN), inhibitor of the ATPase-H⁺ pumps (Gilmour et al. 1985; Karlsson et al. 1994), monensin (MON) which dissipates the electrochemical Na⁺ gradient (Pressman 1976; Pressman and Fahim 1982) and 4,4'-diisothiocyantostilbene-2,2'-disulfonic acid disodium salt hydrate (DIDS), a specific inhibitor of plasma membrane anion exchangers (Drechsler et al. 1993; Falke and Chan 1986; Smith and Bidwell 1989).

These putative Ci uptake pathways have been observed in cyanobacteria (Badger et al. 2006; Kaplan et al. 1991; Price et al. 1998; Sültemeyer et al. 1998) and also in green macroalgae such as *Ulva* sp. (Drechsler et al. 1993) and *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. (Choo et al. 2002) and in Heterokontophytes: *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour and *Saccharina latissima* (L.) Lane (Klenell et al. 2004). However, there are fewer studies on red macroalgae (e.g. Cook et al. 1986; Haglund et al. 1992; Johnston et al. 1992). In contrast to these algal groups in which HCO₃⁻ use is almost ubiquitous, some of the red algae lack the ability of direct HCO₃⁻ uptake (Maberly 1990; Johnston et al. 1992). Nevertheless, ATPase-H⁺ pumps were found in *Coccolytus truncatus* (Snoeijs et al. 2002) and anionic exchanger proteins were observed in some other red algal species such as *Gracilaria gaditana* (Andría et al. 1999).

The environmental conditions of estuarine habitats fluctuate widely. *Bostrychia scorpioides* (Hudson) Montagne ex Kützing and *Catenella caespitosa* (Withering) L. M. Irvine are the two main Rhodophyceans found in the Palmones River Estuary (Southern Spain). Both species live among salt marsh plants in the estuarine intertidal. Their zonation takes up a horizon of 50 cm with a clear segregation: *B. scorpioides* lives in an upper position of the shore and *C. caespitosa* grows on the lower zone, even over the mudflat sediment, although both coexist in the middle zone (Sánchez de Pedro et al. 2013).

Although no previous studies have focused on the Ci uptake in *C. caespitosa*, two previous reports described the photosynthetic performance of *B. scorpioides* (Mercado and Niell 1999) and its CO₂ uptake in air (Mercado and Niell 2000). The latter also discusses the role of the eCA in that species. Both studies agreed with Mercado et al. (1998) and Giordano and Maberly (1989) in not finding a clear relationship between eCA activity and the ability of a species to use HCO₃⁻ in photosynthesis under water. The present study focuses on defining which Ci form is mainly used by *B. scorpioides* and *C. caespitosa*. Special emphasis is put on the presence of eCA and iCA, as well as the possible active mechanisms involved in Ci uptake which have been scarcely studied in these species.

Materials and methods

Algal material

Bostrychia scorpioides and *C. caespitosa* specimens were collected in the intertidal of the Palmones River Estuary (Cádiz, Southern Spain). These species grow on the lower part of the stems of the estuarine and saltmarsh halophytic macrophytes, forming a defined horizon. After collection, algae were transported in darkness and cold to the laboratory, cleaned of epiphytes and maintained at 15 °C in perspex cylinders containing 2 L of aerated filtered (Whatman GF/F) natural seawater (NSW), at a salinity of 36. Photosynthetically active radiation (PAR) of 40 μmol m⁻² s⁻¹, measured by a Spherical Micro Quantum Sensor (Model US-SQS/L, Walz, Effeltrich, Germany) connected to a Light Meter (LI-250A, LI-COR, Lincoln, NE, USA), was provided by F20W/DL Osram fluorescent lamps under 12:12 h light:dark photoperiod. They were maintained under these conditions for 2 days prior to the experiments.

pH and alkalinity experiments

Thalli of *B. scorpioides* and *C. caespitosa* of 0.3 g fresh weight (FW) were placed in 50 mL Erlenmeyer flasks

containing 65 mL filtered NSW. The E-flasks were sealed gas-tight with parafilm avoiding any bubbles and placed on an orbital shaker at 20 °C and saturating light ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Sánchez de Pedro 2011) provided by daylight fluorescent tubes (F-18W/54-765 SYLVANIA, Brussels, Belgium). Three flasks of a total of 21 were randomly taken at every time (0, 30, 60, 90, 180, 360, and 600 min) and alkalinity and pH were measured. The pH was monitored with a pH meter (CRISON Basic 20+, Alella, Spain) connected to a pH-electrode (CRISON 52 00, Alella, Spain). Alkalinity was measured using the classical Gran potentiometric method (Gran 1952) of 50 mL GF/C (Whatman) filtered samples.

pH-drift experiments

The pH compensation point was determined by measuring simultaneously the pH increase in a closed vessel and the O_2 evolution in non-buffered NSW. A pH electrode (CRISON 52 09, Alella, Spain) connected to a pH data logger was tightly attached to a 2.5 mL Hansatech Oxygraph photosynthetic chamber (Hansatech Ltd, Norfolk, UK). pH was recorded every 2 min for 12 h, while O_2 concentration was recorded every second. The chamber was completely filled with non-buffered NSW where 0.010–0.015 g FW of algae were incubated at 20 °C ($n = 3$) and $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, supplied by a halogen lamp (KL 1500 compact Schott, Mainz, Germany). The water in the vessel was continuously homogenized by a magnetic stirrer, carefully kept apart from the algae to avoid mechanical damage. The pH compensation point was considered to be reached when pH was stable for at least 1 h. To avoid any possible physiological differences among replicates, every pH-drift experiment started at the same time every day: 10:00 a.m.

Total inorganic carbon and its species concentrations were calculated from pH, alkalinity, salinity, and temperature in the NSW of the pH-drift experiments and the values for dissociation constants in Mehrbach et al. (1973), by means of the computer program CO_2 system calculation for MS Excel (Pierrot et al. 2006).

CO_2 -compensation point

The potential CO_2 compensation point was calculated from the CO_2 -drift, as the stable value of CO_2 where its uptake and release are the same, or, in other words, when the net photosynthetic rate (NPR) measured as CO_2 uptake is zero. The CO_2 uptake was measured by means of a closed Infra-Red Gas Analyzer (IRGA) type LICOR Li-820. Air from a compressed air bottle was bubbled into a closed 75 mL vessel containing 15 mL of buffered NSW using a membrane pump KF type (NMP 0158) at a constant rate of

50 mL min^{-1} . Two biological buffers were dissolved in the assay NSW to maintain the pH at 8.1 (4-morpholine-propanesulfonic acid, MOPS, 5 mmol L^{-1} and bis-tris propane, BTP, 4 mmol L^{-1}). When the equilibrium between air and water was achieved, 0.125 g FW of alga was carefully inserted into the chamber which was rapidly closed. Then, the air supply was shut down, starting from an initial CO_2 concentration of $444 \pm 13 \text{ ppm}$. The chamber received $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by a halogen lamp and the temperature was set at 20 °C. The depletion of CO_2 was measured for 12 h by an IRGA connected to a computer. The final CO_2 concentration in the air of the chamber which is in equilibrium with the C_i in the water was used to calculate the dissolved CO_2 final concentration (CO_2 compensation point) in the seawater by means of Henry's law, at 20 °C, a salinity of 36 and 1 atm. The values of the CO_2 -compensation point obtained by this method are the potential ones, since there was no limitation of the photosynthesis by increasing pH. Three replicates were performed on each species. The CO_2 compensation point was also calculated from the pH-drift experiments, using the CO_2 system calculation, as described above.

Initial net photosynthesis rate (NPR)

The initial NPR was estimated as CO_2 uptake, from the IRGA measurements and calculated from the pH-drift experiments, and also as O_2 evolution in *B. scorpioides* and *C. caespitosa*. The same NSW was used for all the experiments to ensure an identical initial CO_2 concentration ($444 \pm 13 \text{ ppm}$). The first 2 min of every experiment was used for the NPR calculations, since this was the minimum time interval of recorded pH data. Photosynthetic quotient (PQ), expressed as CO_2/O_2 , was obtained from the calculated CO_2 uptake and O_2 evolution NPRs. Three independent replicates were used for the calculations.

Use of inhibitors of HCO_3^- uptake

The effect of different inhibitors on *B. scorpioides* and *C. caespitosa* photosynthesis was tested in open mode in the same IRGA system mentioned above. Air from a compressed air bottle was continuously bubbled at a constant rate of 50 mL min^{-1} , into a 75 mL vessel containing 0.30 g of alga and 30 mL of filtered NSW, so that there was no C_i limitation in the medium during the measurement. Since inhibitors can alter the pH of the medium (personal observation), MOPS (5 mmol L^{-1}), and BTP (4 mmol L^{-1}) buffers were added to the NSW to maintain the pH at 8.1. The chamber received a photosynthetically available radiation of $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by a halogen lamp. Temperature was kept constant at 20 °C.

The algae were first maintained in darkness and then in light to have a control for respiration and NPR, respectively. Afterward, the vessel was kept in darkness and the inhibitor was added. Finally, after 50 min with the inhibitor, the light was switched on again to measure the NPR in the presence of the inhibitor. Each measurement of respiration and photosynthesis was carried out for 50 min. A control experiment of equal duration and similar light–dark treatment was performed in the absence of inhibitors. There were no changes in NPR due to the experimental procedure (data not shown).

The used inhibitors and their final concentration in the medium were: 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DBS (Ramidus AB), 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AZ (Sigma Aldrich), 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EZ (Sigma Aldrich), 1 mmol L^{-1} DIDS (Sigma Aldrich), 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MON (Sigma Aldrich), and 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ VAN (Sigma Aldrich). Stock solutions of 40 mmol L^{-1} DBS, 10 mmol L^{-1} AZ and 10 mmol L^{-1} EZ were prepared in 0.05 mol L^{-1} NaOH. Stock solutions of MON (10 mmol L^{-1}), DIDS (20 mmol L^{-1}), and VAN (40 mmol L^{-1}) were prepared in ethanol, distilled water, and HCl 0.05 mol L^{-1} , respectively. The volumes of inhibitor stock added to 30 mL of medium with algae were: 0.3 mL of DBS, AZ, EZ, and MON; 1.5 mL of DIDS; and 0.15 mL of VAN. The addition of equivalent volumes of ethanol, distilled water, and HCl 0.05 mol L^{-1} without inhibitors had no effect on photosynthesis, since the medium was buffered.

Statistical analyses

The results are shown as the mean \pm SD of three measurements of independent replicates. To compare the differences between the two species in the alkalinity, CO_2 and pH compensation points and PQ, t tests were performed. The initial NPR as CO_2 uptake, measured and calculated, and O_2 evolution was contrasted by means of a one way ANOVA ($\alpha = 0.05$). A two-way repeated measures ANOVA was used to determine the effect of different inhibitors on the CO_2 photosynthetic uptake rates and differences among the inhibitors ($\alpha = 0.05$). When there were significant differences, a posteriori test (SNK) was used. All the statistical analyses were performed using SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA).

Results

pH and alkalinity

The evolution of pH and alkalinity of the medium, where *B. scorpioides* and *C. caespitosa* were incubated, were

measured. An increase of the pH of the NSW was observed in all the cases, as a consequence of the algal photosynthesis. The alkalinity in the NSW used for the experiments remained stable throughout the assay with similar values in both species ($2.30 \pm 0.07 \text{ mmol L}^{-1}$; $n = 6$; $P > 0.05$).

pH compensation point, O_2 evolution and calculated CO_2 uptake NPRs

The pH compensation points for *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, reached after about 12 h in a closed system, were 9.03 ± 0.03 and 8.91 ± 0.01 , respectively (Fig. 1).

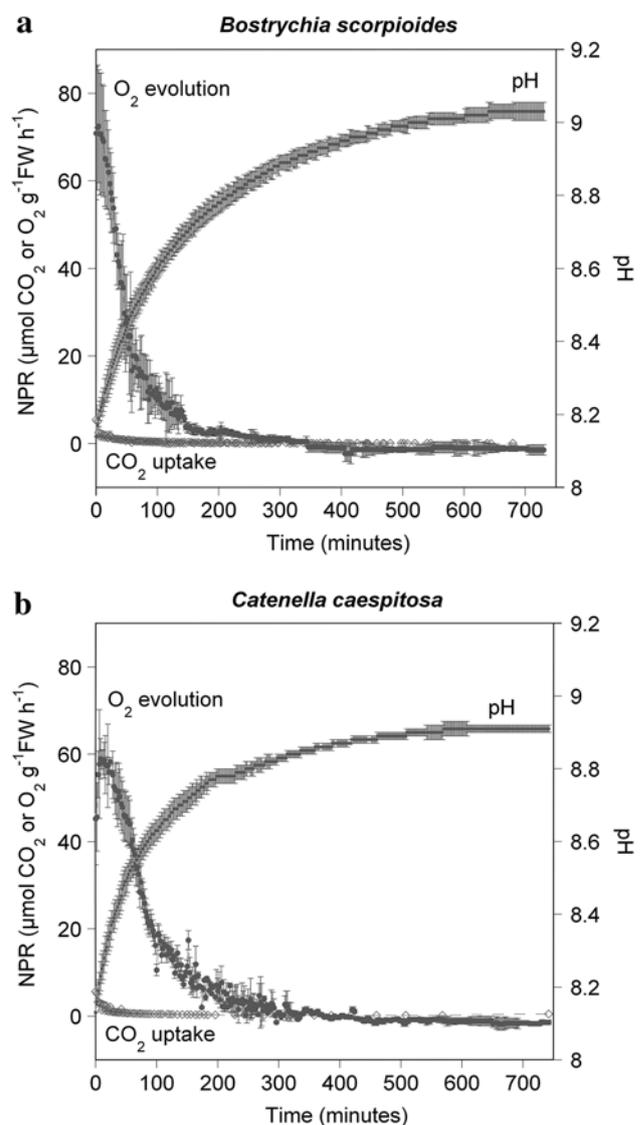


Fig. 1 Changes in the pH and NPR as O_2 evolution and CO_2 uptake during 12 h in the NSW incubated with *B. scorpioides* (a) and *C. caespitosa* (b). pH compensation point for both species was calculated from these results. Data are represented every 2 min as the mean of three independent replicates \pm SD

An initial increase could be observed in the NPR reaching a higher value, although not significantly ($P > 0.05$), for *B. scorpioides* ($72.48 \pm 12.87 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$) than for *C. caespitosa* ($58.97 \pm 4.62 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$). After that maximum value, NPR decreased to zero in between 5 and 6 h for both species. Although it might have been expected that the pH compensation point was reached when the NPR was zero, the pH continued increasing for 12 h until a constant value was achieved.

The CO_2 uptake rates calculated from the pH-drift data, were significantly lower than O_2 evolution rates during all the experiments. The higher CO_2 uptake rates were achieved during the first 40 min of experiments for both species and then they decreased down to values near zero. From the measured values of O_2 evolution and the calculated values of CO_2 uptake, a not significantly different ($P > 0.05$) PQ of an average value of 0.07 ± 0.01 in *B. scorpioides* and 0.13 ± 0.04 in *C. caespitosa* was observed.

CO_2 compensation point

The CO_2 compensation point, shown in Table 1, was significantly lower for *B. scorpioides* ($6.5 \pm 0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$) than for *C. caespitosa* ($9 \pm 0.6 \mu\text{mol L}^{-1}$). The results indicate that about 48 % of the initial CO_2 was taken up by *B. scorpioides* and only 24 % by *C. caespitosa* after 12 h. Furthermore, the CO_2 compensation point was achieved about 3 h before in *C. caespitosa* than in *B. scorpioides*. On the other hand, the CO_2 compensation points calculated from the C_i corresponding to the pH-drift were significantly lower than the experimental ones: $0.46 \pm 0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ for *B. scorpioides* and $0.80 \pm 0.07 \mu\text{mol L}^{-1}$ for *C. caespitosa* (Table 1) were also higher in the latter.

Initial NPR

The initial NPRs presented in Fig. 2 were different when expressed as O_2 evolution or CO_2 uptake. Values of O_2 evolution were significantly higher ($P < 0.05$) than the equivalent measured or calculated CO_2 values. However, no significant differences were found between the calculated CO_2 uptake from the pH-drift data and the measured NPRs from the IRGA experiments.

Table 1 CO_2 compensation points ($\text{CO}_2 \text{ CP}$): from the IRGA experiment and calculated from the pH-drift experiment

	$\text{CO}_2 \text{ CP}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Calculated $\text{CO}_2 \text{ CP}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
<i>B. scorpioides</i>	6.47 ± 0.79	0.46 ± 0.05
<i>C. caespitosa</i>	8.95 ± 0.55	0.80 ± 0.07

Data are mean of three replicates \pm SD

Effect of inhibitors on the C_i uptake

Figure 3 shows the inhibition percentage of the NPR measured as CO_2 uptake due to the addition of specific inhibitors of the different C_i uptake channels. In both species AZ, EZ, and DBS had a significant effect on photosynthesis, whereas MON, DIDS, and VAN did not affect it. A similar decrease (around 80 %) of the CO_2 uptake was found after the addition of inhibitors of external and/or internal CA activities, (DBS, AZ, or EZ) for

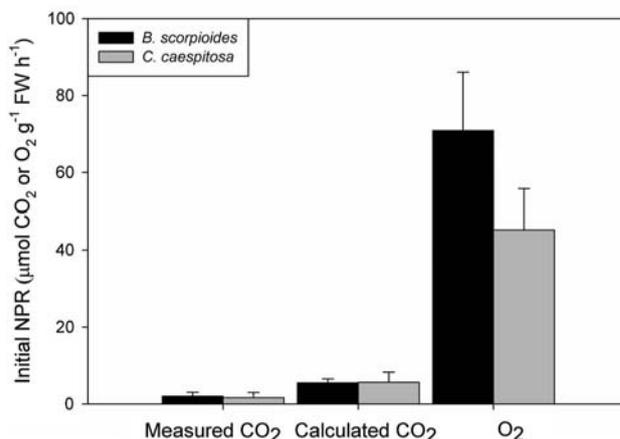


Fig. 2 Initial NPR estimated as CO_2 uptake (first 2 min), from the IRGA measurements and calculated from the pH-drift experiments, and also estimated as O_2 evolution in *B. scorpioides* and *C. caespitosa*. Data were calculated as mean values of three replicates \pm SD. No significant differences were found between the NPR as CO_2 uptake from the IRGA and calculated from pH-drift

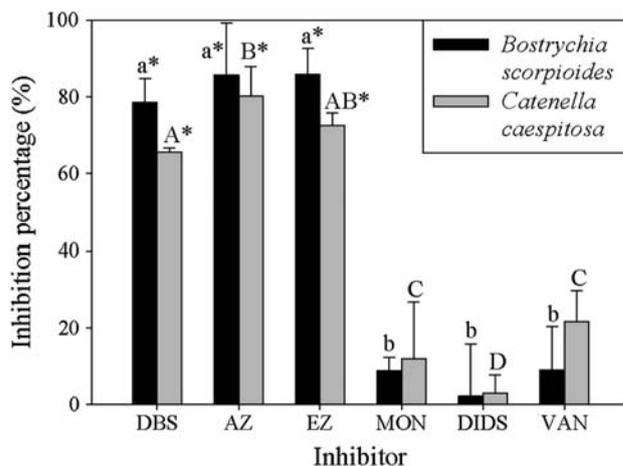


Fig. 3 Effect of the addition of different inhibitors of the C_i uptake channels (DBS $400 \mu\text{mol L}^{-1}$, AZ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, EZ $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, MON $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, DIDS 1 mmol L^{-1} , and $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ VAN) on the NPR, expressed as an inhibition percentage of CO_2 uptake. Values with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$). Asterisk represents a significant effect of the inhibitor for each species

B. scorpioides. In *C. caespitosa*, the highest inhibition percentage was observed when AZ was added, with an inhibition of $80.1 \pm 7.7\%$. The effect of EZ, the total CA activity inhibitor, was slightly lower, ($72.5 \pm 3.3\%$), although not significantly different from AZ. On the other hand, the use of DBS caused an even lower decrease than AZ ($65.5 \pm 1.2\%$), despite both substances blocking the same Ci uptake pathway.

Discussion

Marine macroalgae vary in their ability to use HCO_3^- as a C source for photosynthesis and growth, but some authors have reported the absence of this ability among a number of Rhodophyceae (Maberly 1990; Johnston et al. 1992). Our results show that the two studied red estuarine macroalgae also lack this capacity, using CO_2 as the main Ci source for photosynthesis.

The pH-drift technique has been used in many studies to check the ability of algae to take up Ci from the medium (Axelsson and Uusitalo 1988; Johnston et al. 1992; Maberly 1990; Surif and Raven 1989). Their results are tightly correlated with the ability to use HCO_3^- , since the change of pH due to photosynthesis could limit the availability of the different forms of Ci for the algae. Moreover, some authors such as Maberly (1990), using these experiments, reported the restriction to CO_2 utilization as a source of Ci for the species with pH compensation points below 9. In the pH-drift experiments, when estimations of CO_2 uptake and O_2 evolution rates are compared, the NPR due to O_2 evolution is much higher than the CO_2 uptake rate, especially at the beginning of the experiments (Fig. 2). This entails a very low PQ compared to the theoretical value of 0.85 (CO_2/O_2) reported by Axelsson (1988) for some macroalgae. These low values are due to very low CO_2 uptake rates from the water which means that the CO_2 uptake for this two species could be mainly carried out in air, before complete desiccation, since *B. scorpioides* and *C. caespitosa* spend around 19 and 14 h per day in emersion, respectively (Sánchez de Pedro et al. 2013). This would be supported by the higher CO_2 uptake rates in air, of about $30 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$ at pH 8.1, found in *B. scorpioides* by Mercado and Niell (2000). The fact that they also spend part of the day in immersion could lead us to think that the possibility of using HCO_3^- would be an ecological advantage. However, both species presented pH compensation points below 9, which confirms that the only Ci form that *B. scorpioides* and *C. caespitosa* can use is CO_2 . Similarly, a lack of use of HCO_3^- was found in other Rhodophytes such as *Coccolytus truncatus* (Snoeijs et al. 2002), and a number of other red algae (Larsson and

Axelsson 1999; Maberly 1990; Johnston et al. 1992), all of them with pH compensation points below pH 9.

Another useful variable to determine the Ci utilization is the CO_2 compensation point. Our calculated CO_2 compensation point values are significantly different from the measured ones (Table 1), about 14- and 11-fold lower in *B. scorpioides* and in *C. caespitosa*, respectively. In our case, these marked differences are due to the stable pH of 8.1 along the experiment, whereas our calculated CO_2 compensation point was obtained from pH values of 9.03 ± 0.03 for *B. scorpioides* and 8.91 ± 0.01 for *C. caespitosa*. One could think that by buffering the pH (i.e., preventing from Ci limitation due to high pH), the potential minimum CO_2 concentration for algae to photosynthesize would be lower, because of a higher CO_2 concentration available for the algae, but we found the opposite result. A possible explanation is that the CO_2 depletion during pH-drift experiments could mainly be due to two processes: the physico-chemical transformation of CO_2 into HCO_3^- , due to pH increase, and the CO_2 uptake by algae. When the NSW is buffered in the IRGA experiments, the physico-chemical CO_2 withdrawal is minimal and only the CO_2 uptake by algae takes place, thus the measured CO_2 compensation point was higher. The calculated CO_2 compensation point obtained in our study for *B. scorpioides* was half the value given by Mercado and Niell (1999), which could be due to differences in experimental conditions (irradiance and temperature). Nevertheless, as Mercado and Niell (1999) suggested, the CO_2 compensation point obtained for *B. scorpioides* and also for *C. caespitosa* (present study) are not low enough to require the operation of HCO_3^- uptake mechanisms. This correlation between relatively high CO_2 compensation point and pH compensation point below 9 agrees with the observations of Maberly (1990) for species of Rhodophyta that cannot use HCO_3^- .

Our pH-drift experiments and CO_2 compensation point results show that the HCO_3^- uptake pathway is unlikely to be present. However, the existence of CAs, widely distributed among algae and also reported in several red macroalgae (Haglund et al. 1992; Mercado et al. 1998; Smith and Bidwell 1989; Snoeijs et al. 2002), was previously observed in *B. scorpioides* (Mercado and Niell 1999, 2000) and, to our knowledge, in this study for the first time also in *C. caespitosa*. In fact, we have measured much higher iCA than eCA activity in both species (unpublished data), in spite of a similar inhibitory effect of AZ, EZ, and DBS having been observed in the IRGA experiments. A possible explanation for this could be that in the used open system, the CO_2 is continuously renewed and consequently its concentration remains constant throughout the measurement. Therefore, since dissolved CO_2 can be taken up by algae by diffusion, an inhibition of the iCA by EZ

would not mean a significantly higher inhibition of the photosynthetic rate, since there is CO_2 available for the Rubisco. In addition, the only partial inhibition performed by AZ, DBS, and EZ, could lead us to think that other pathways, alternative to CAs, might also be present, but in fact no direct uptake of HCO_3^- was recorded, since a negligible inhibition was observed when MON, DIDS, or VAN were added. On the other hand, the anion exchange proteins for HCO_3^- uptake have been observed in a few red macroalgae species (Andría et al. 1999; Granbom and Pedersén 1999) and the H^+ -ATPase was found in the Rhodophyta *Coccolytus truncatus* (Snoeijs et al. 2002). However, the presence of eCA and the lack of ability to use HCO_3^- have been previously reported in some red macroalgae (Giordano and Maberly 1989; Mercado et al. 1998), as well as in our species, which agrees with the low pH compensation points stated above. Nevertheless, as Mercado and Niell (1999) suggested, the function of the eCA could be to create a CO_2 gradient as a source of Ci when in emersion.

From an ecological point of view, previous reports suggest that the Ci uptake efficiency in macroalgae is correlated with their position on the tidal height: subtidal species only or mostly use CO_2 , whereas intertidal species are able to use HCO_3^- to a greater or lesser extent (Maberly 1990; Johnston et al. 1992; Mercado et al. 1998). On the other hand, Maberly (1990) reported that subtidal algae, lacking the ability to use HCO_3^- , typically live in low-light environments, under canopies of other algae or in shady sites. The Rhodophytes of our study, being intertidal species, live under canopies of saltmarsh plants at low-moderate irradiance; therefore, an investment in highly efficient pathways of HCO_3^- uptake would not be energetically worthwhile, as Snoeijs et al. (2002) suggested for *C. truncatus*. Species frequently exposed to air could take advantage of the atmospheric CO_2 availability, rapidly dissolving into the thin boundary layer covering the thallus before becoming completely desiccated (Mercado and Niell 2000; Murru and Sandgreen 2004). This would be an ecological advantage for estuarine species, as *B. scorpioides* and *C. caespitosa*, coping with dissolved Ci limitation due to daily emersion. Further research will deal with the response of these species to fluctuating environmental factors in the estuary.

Conclusions

From our results, we can conclude that the predominant Ci form used by these two species is CO_2 and that uptake of HCO_3^- is unlikely to occur. On the other hand, the high inhibitory effect observed on the photosynthetic Ci uptake after the addition of DBS, AZ, and EZ, shows that both

external and internal CA activity is involved in the photosynthesis of *B. scorpioides* and *C. caespitosa*.

Acknowledgments This work was financed by the Grant CICYT CTM 2008-04453/MAR from the Ministry of Science and Innovation of Spain and a grant from a contract between ENCE and the University of Málaga. This work is included in the framework of Campus de Excelencia Internacional del Mar (CEIMAR). The authors thank Raquel Sánchez de Pedro for helping in the collection of algae. We also want to thank the two reviewers of this paper and the Editor, Prof. Maberly for their constructive suggestions that greatly improved the manuscript.

References

- Andría JR, Pérez-Lloréns JL, Vergara JJ (1999) Mechanisms of inorganic carbon acquisition in *Gracilaria gaditana* nom. prov. (Rhodophyta). *Planta* 208:564–573
- Axelsson L (1988) Changes in pH as a measure of photosynthesis by marine macroalgae. *Mar Biol* 97:287–294
- Axelsson L, Uusitalo J (1988) Carbon acquisition strategies for marine macroalgae. I. Utilization of proton exchanges visualized during photosynthesis in a closed system. *Mar Biol* 97:295–300
- Axelsson L, Uusitalo J, Ryberg H (1991) Mechanisms for concentrating and storage of inorganic carbon in marine macroalgae. In: García-Reina G and Pedersén M (eds) Seaweed cellular biotechnology, physiology and intensive cultivation. COST-48, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain, pp 185–198
- Badger MR, Price GD (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 369–392
- Badger MR, Price GD, Long BM, Woodger FJ (2006) The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO_2 concentrating mechanism. *J Exp Bot* 57:249–265
- Beer S (1994) Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine macroalgae (with special reference to the Chlorophyta). *Prog Phycol Res* 10:179–207
- Choo K, Snoeijs P, Pedersén M (2002) Uptake of inorganic carbon by *Cladophora glomerata* (Chlorophyta) from the Baltic Sea. *J Phycol* 38:493–502
- Cook CM, Lanaras T, Colman B (1986) Evidence of bicarbonate transport in species of red and brown macrophytic marine algae. *J Exp Bot* 37:977–984
- Demming-Adams B, Adams WW (1992) Carotenoids composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. *Plant Cell Environ* 15:411–419
- Denny MW (1993) Air and water. The biology and physics of life's media. Princeton University Press, Princeton
- Drechsler Z, Sharkia R, Cabantchik ZI, Beer S (1993) Bicarbonate uptake in the marine macroalga *Ulva* sp. is inhibited by classical probes of anion exchange by red blood cells. *Planta* 191:34–40
- Falke JJ, Chan SI (1986) Molecular mechanisms of band 3 inhibitors. 1. Transport site inhibitors. *Biochemistry* 25:7888–7894
- Falkowski PG, Raven JA (1997) Aquatic photosynthesis. Blackwell Science, Oxford
- Flores-Moya A, Fernández JA (1998) The role of external carbonic anhydrase in the photosynthetic use of inorganic carbon in the deep-water alga *Phyllariopsis purpurascens* (Laminariales, Phaeophyta). *Planta* 207:115–119
- Gehl KA, Colan B, Sposato LM (1990) Mechanism of inorganic carbon uptake in *Chlorella saccharophila*. The lack of involvement of carbonic anhydrase. *J Exp Bot* 41:1385–1391

- Gilmour DJ, Kaaden R, Gimmler H (1985) Vanadate inhibition of ATPases of *Dunaliella parva* in vitro and in vivo. *J Plant Physiol* 118:111–126
- Giordano M, Maberly SC (1989) Distribution of carbonic anhydrase in British marine macroalgae. *Oecologia* 81:534–539
- Gran G (1952) Determination of the equivalence point in potentiometric titration part II. *Analyst* 77:661–671
- Granbom M, Pedersen M (1999) Carbon acquisition strategies of the red alga *Euclima denticulatum*. *Hydrobiologia* 398(399):349–354
- Haglund K, Björk M, Ramazanov Z, García-Reina G, Pedersen M (1992) Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 187:275–281
- Hanelt D, Huppertz K, Nultsch W (1992) Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in red algae. *Bot Acta* 105:278–284
- Hanelt D, Huppertz K, Nultsch W (1993) Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Mar Ecol Prog Ser* 97:31–37
- Johnston AM, Raven JA (1986) The utilization of bicarbonate ions by the macroalga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis. *Plant Cell Environ* 9:175–184
- Johnston AM, Maberly SC, Raven JA (1992) The acquisition of inorganic carbon by four red macroalgae. *Oecologia* 92:317–326
- Kaplan A, Schwarz R, Lieman-Hurwitz J, Reinhold L (1991) Physiological and molecular aspects of the inorganic carbon-concentrating mechanism in cyanobacteria. *Plant Physiol* 97:851–855
- Karlsson J, Ramazanov Z, Hiltonen T, Gardeström P, Samuelsson G (1994) Effect of vanadate on photosynthesis and the ATP/ADP ratio in low-CO₂-adapted *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Planta* 192:46–51
- Klenell M, Snoeijs P, Pedersen M (2004) Active carbon uptake in *Laminaria digitata* and *L. saccharina* (Phaeophyta) is driven by a proton pump in the plasma membrane. *Hydrobiologia* 514:41–53
- Krause GH (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol Plant* 74:566–574
- Krause GH, Somersalo S (1989) Fluorescence as a tool in photosynthesis research: application in studies of photo-inhibition, cold acclimation and freezing stress. *Philos Trans R Soc Lond* 323:281–293
- Larsson C, Axelsson L (1999) Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. *Eur J Phycol* 34:79–86
- Lobban CS, Harrison PJ (1997) *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Maberly SC (1990) Exogenous sources of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. *J Phycol* 26:439–449
- Mehrbach C, Culbertson CH, Hawley JE, Pytkowicz RM (1973) Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol Oceanogr* 18:897–907
- Mercado JM, Niell FX (1999) Carbonic anhydrase activity and use of HCO₃⁻ in *B. scopioides* (Ceramiales, Rhodophyceae). *Eur J Phycol* 34:13–19
- Mercado JM, Niell FX (2000) Carbon dioxide uptake by *Bostrychia scopioides* (Rhodophyceae) under emersed conditions. *Eur J Phycol* 34:45–51
- Mercado JM, Gordillo FJL, Figueroa FL, Niell FX (1998) External carbonic anhydrase and affinity for inorganic carbon in intertidal macroalgae. *J Exp Mar Biol Ecol* 221:209–220
- Michelet B, Boutry M (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase—a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol* 108:1–6
- Murru M, Sandgreen CD (2004) Habitat matters for inorganic carbon acquisition in 38 species of red macroalgae (Rhodophyta) from Puget Sound, Washington, USA. *J Phycol* 40:837–845
- Pierrot D, Lewis E, Wallace DWR (2006) MS Excel program developed for CO₂ system calculations. ORNL/CDIAC-105a. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee. doi:10.3334/CDIAC/otg.CO2SYS_XLS_CDIAC105a
- Pressman BC (1976) Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* 45:501–530
- Pressman BC, Fahim M (1982) Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:465–490
- Price GD, Sültemeyer D, Klughammer B, Ludwig M, Badger MR (1998) The functioning of the CO₂ concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: a review of general physiological characteristics, genes, proteins and recent advances. *Can J Bot* 76:973–1002
- Raven JA (1997) Putting the C in the phycolgy. *Eur J Phycol* 32:319–333
- Riley JB, Chester R (1977) *Introduction to marine chemistry*. Academic Press, London
- Sánchez de Pedro R (2011) Causas de la zonación de las rodofíceas del estuario del río Palmones: Una explicación en términos de competencia por la luz y los nutrientes. Honors Thesis, University of Málaga
- Sánchez de Pedro R, Niell FX, Carmona R (2013) Differential nutrient uptake by two segregated red algae in an estuarine intertidal zone. *Phycologia* 52(6):461–471
- Smith RG, Bidwell RGS (1989) Mechanisms of photosynthetic carbon dioxide uptake by the red macroalga *Chondrus crispus*. *Plant Physiol* 89:93–99
- Snoeijs P, Klenell M, Choo KS, Comhaire I, Ray S, Pedersen M (2002) Strategies for carbon acquisition in the red marine macroalga *Coccotylus truncates* from the Baltic Sea. *Mar Biol* 140:435–444
- Stumm W, Morgan JJ (1981) *Aquatic chemistry. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. Wiley and Wiley-Interscience, New York
- Sültemeyer DF, Fock HP, Calvin DT (1990) Mass-spectrometric measurement of intracellular carbonic-anhydrase activity in high and low Ci cells of *Chlamydomonas*-studies using O¹⁸ exchange with C¹³/O¹⁸ labelled bicarbonate. *Plant Physiol* 94:1250–1257
- Sültemeyer D, Schmidt R, Heinrich PF (1993) Carbonic anhydrase in higher plants and aquatic microorganisms. *Physiol Plant* 88:179–190
- Sültemeyer D, Klughammer B, Badger MR, Price GD (1998) Fast induction of high affinity HCO₃⁻ transport in cyanobacteria. *Plant Physiol* 116:183–192
- Surif MB, Raven JA (1989) Exogenous inorganic carbon sources for photosynthesis in seawater by members of the Fucales and the Laminariales (Phaeophyta): ecological and taxonomic implications. *Oecologia* 78:97–105
- Taiz L, Zeiger E (1998) *Plant physiology*, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland
- Williams TG, Turpin DH (1987a) Photosynthetic kinetics determine the outcome competition for dissolved inorganic carbon by fresh-water microalgae. Implications for acidified lakes. *Oecologia* 73:307–311
- Williams TG, Turpin DH (1987b) The role of external carbonic anhydrase in inorganic carbon acquisition by *Chlamydomonas reinhardtii* at alkaline pH. *Plant Physiol* 83:92–96