EFFECTO DE COMPUESTOS POLIFENOLICOS NATURALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Chlamydomonas* sp. EN LAGUNAS DEL P.N. DE DOÑANA

L. Serrano, R. Sempere, L. Torres y J. Toja
Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Universidad de Sevilla. Ap. 1095.
Sevilla 41080.

Palabras clave: materia orgánica alóctona, polifenoles, crecimiento del fitoplancton, lagunas temporales.

ABSTRACT

Water level, chlorophyll "a" concentration and natural polyphenolic concentration of several temporary ponds of the Doñana N. P. were recorded during two successive hydrological periods (1990-91). Flooding produced a rapid enrichment of these compounds dissolved in the water (>12 mg/L), whereas chlorophyll.a concentration was markedly reduced. Natural polyphenolic compounds were artificially leached from littoral and terrestrial vegetation commonly abundant around the ponds. Fresh and 5-6 week-old leachates of each type of vegetation were added to laboratory cultures of *Chlamydomonas* sp., an algal species isolated from the ponds, resulting in different growth levels.

Equally, each different leachate was added separately to natural phytoplankton communities in plastic tubes inside a pond. In both cases, littoral vegetation leachates yielded higher growth level than terrestrial vegetation leachates, although only in the field experiment there were some difference between fresh and 5-6 week-old leachates. The ratio C/N of each leachate suggests that their different sensibility to microbial degradation would explain their different influence on phytoplankton growth.

INTRODUCCION

En los ecosistemas acuáticos, la materia orgánica muerta o detritus tiene dos orígenes posibles: autóctono, generado dentro del sistema y alóctono, generado en el exterior.

Tradicionalmente se ha concedido mucha importancia al estudio de la descomposición de la materia alóctona en ríos y arroyos y, no hay duda de que la hojarasca constituye una importante fuente de carbono y energía en dichos sistemas (Suberkropp et al., 1976; Fustec et al. 1988; Bunn, 1988; Allred y Giesy, 1988; Gessner y Schwoerbel, 1989). Por el contrario, en lo que se refiere a sistemas lénticos, han sido muy abundantes los estudios acerca del origen, química y funcionamiento de la materia húmica (principalmente autóctona) en lagos y embalses (Visser, 1984; De Haan et al., 1984; Mcknight et al., 1988; Moran y Hodson, 1990), pero la importancia del aporte alóctono proveniente de la vegetación emergente y terrestre en estos sistemas se ha documentado en muchos menos casos (Rich y Wetzel, 1978; Boon et al., 1982). Igualmente puede decirse de otros sistemas lénticos menores (como marismas, lagunas, turberas, zonas pantanosas, etc), a pesar de que, en la mayoría de los humedales, las rutas detriticas están dominadas por los aportes vegetales de plantas vasculares (Day, 1982; Benner et al., 1985; Webster & Benfield, 1986; Moran et al., 1989).

Durante períodos de fuerte inundación, las lagunas del Parque Nacional de Doñana reciben un gran aporte de material alóctono proveniente del lavado del suelo y la vegetación que las rodea (Serrano, 1992). Las lluvias excepcionales registradas en los últimos años produjeron un gran aumento de la concentración de compuestos polifenólicos solubles en las lagunas. Dichos compuestos, como taninos y ligninas, son característicos del metabolismo secundario de las plantas vasculares (Hedges, 1988; Haslam, 1989). Durante el tiempo que permanecieron las altas concentraciones de estos compuestos, la biomasa

fitoplanctónica fue más escasa que durante otros años sin tal perturbación (Serrano y Guisande 1990, Toja et al. 1991).

El objeto de este estudio fue ensayar el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento del fitoplancton mediante cultivos en el laboratorio de *Chlamydomonas sp.*, una especie aislada de las lagunas y contrastar los resultados con los obtenidos en comunidades naturales, a través de ensayos de campo.

AREA DE ESTUDIO

El Parque Nacional de Doñana, situado en la costa atlántica del suroeste español, está dominado por un tipo de clima mediterráneo subhúmedo, con una pluviosidad media anual de 620 mm, que se concentra en otoño y primavera; los veranos son secos, con altas temperaturas y sin apenas lluvia (5 mm media mensual).

A lo largo del margen noreste del sistema de dunas costeras, en el límite con las arenas estabilizadas, la capa freática dunar descarga en un rosario de lagunas peridunares. Dichas lagunas son generalmente temporales pudiendo secarse durante los estiajes más severos. Las cuatro lagunas que componen este estudio son temporales, pequeñas y someras, aunque llegaron a aumentar mucho su profundidad y área durante el momento de las inundaciones: Las Verdes hasta 0.3 Ha, Taraje hasta 6.1 Ha, Zahillo hasta 3.1 Ha y Charco del Toro hasta 1.9 Ha (García-Novo et al., 1991).

MATERIAL Y METODOS

La cantidad de lluvia se midió usando pluviómetros tipo Hellman de 200 cm² de área colectora. Para medir el nivel del agua en las cubetas de las lagunas se instalaron piezómetros de PVC de 4 cm de diámetro y varillas metálicas.

Las lagunas se muestrearon a intervalos de 1 a 8 semanas dependiendo del período de lluvias desde noviembre de 1989 hasta julio de 1991. Las muestras de agua se recogieron de la superficie con botellas de Pexiglass de 2L y se filtraron por filtros Whatman GF/C. La clorofila *a* se extrajo con metanol a 4°C durante 24 horas (Margalef, 1983) y su concentración se estimó según la fórmula de Talling y Driver (en Vollenweider 1969). La concentración total de polifenoles solubles en el agua de las lagunas y en los extractos naturales se midió siguiendo el método de Hagerman y Butler (1978) modificado por Serrano y Guisande (1990), empleando ácido tánico comercial para la curva de calibración.

Los extractos polifenólicos naturales se obtuvieron a partir de especies típicas de vegetación litoral: *Juncus effusus* (Juncaceae) y *Scirpus holoschoenus* (Cyperaceae) y de vegetación terrestre: *Halimium halimifolium* (Cistaceae). Dichas especies se sometieron a dos tratamientos diferentes: lavado de vegetación fresca durante 24-48 h con agua destilada (extractos "nuevos") y descomposición microbiana aerobia del material vegetal fresco en agua destilada durante 5-7 semanas (extractos "viejos"). La relación C/N se calculó midiendo el contenido en C y N de una alícuota de los extractos liofilizados en un analizador elemental Carlo Erba 1106. La especie de alga, *Chlamydomonas sp.*, utilizada en los cultivos de laboratorio fue aislada de la laguna de "Las Verdes" y cultivada autotróficamente en medio líquido Sueoka et al. (1967) a 30°C, en erlenmeyer de 150 mL, bajo luz y agitación continuas. Bajo estas mismas condiciones de crecimiento se realizaron los experimentos en el laboratorio, utilizando dos réplicas para cada uno de los tratamientos: controles, extracto "nuevo" de vegetación litoral, extracto "viejo" de vegetación litoral, extracto "nuevo" de vegetación terrestre y extracto "viejo" de vegetación terrestre. A los cultivos tratados se les añadió una concentración de 5-10 mg/L del extracto de polifenoles solubles correspondiente.

El crecimiento de los cultivos se estimó, por duplicado, para cada uno de los tratamientos midiendo su clorofila.a según McKinney (1941).

El ensayo de campo se realizó en la laguna de Las Verdes, utilizando tubos de metacrilato de 6 cm de diámetro y 1 m de altura clavados verticalmente en el sedimento. Se utilizaron dos tubos como controles y un tubo para cada tratamiento; la cantidad de clorofila.a se midió filtrando *in situ* un volumen de 35-50 mL cada 4-5 días a lo largo de 3 semanas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las precipitaciones registradas durante el período hidrológico de 1989-90 fueron inusualmente abundantes, concentrándose en otoño e invierno y sobrepasando la media anual de 620 mm (Fig. 1). Sin embargo, en el período 1990-91 las lluvias fueron inferiores a la media anual. Debido a la gran diferencia de precipitación registrada en los dos periodos, la fluctuación del nivel de agua en las cuatro lagunas fue drástica (Figura 1), reflejándose en el comportamiento de los restantes parámetros.

Figura 1. Evolución del nivel del agua a lo largo del periodo de estudio: Las Verdes (.....), Taraje (-----), Zahillo (-----) y Charco del Toro (.....). Las líneas verticales representan la lluvia caída en el intervalo entre muestreos. 0 = nivel del suelo.

La evolución de la concentración de polifenoles solubles a lo largo de este tiempo refleja la variación del nivel del agua en las lagunas (Fig. 2). La concentración de clorofila.a presenta también profundas oscilaciones, siguiendo un patrón generalmente opuesto al de los compuestos polifenólicos solubles.

La máxima concentración de éstos corresponde al período de precipitación más intensa -invierno de 1990 (Fig. 2)-. En la laguna del Charco del Toro la concentración de polifenoles comienza a incrementarse a partir de finales del verano de 1990 y llega a alcanzar, de nuevo, valores altos tras el estiaje de 1991. Este aumento no está relacionado con la precipitación sino que, más bien, se debe al efecto de concentración debido a la brusca bajada del nivel de agua que sufrieron estas lagunas.

Estudios previos han señalado que el diferente tamaño de cada laguna también está en relación con el momento en que se alcanza la máxima concentración de polifenoles solubles (Serrano, 1992).

Así, en la laguna menor (Las Verdes) el máximo enriquecimiento de estos compuestos se alcanzó antes que en las demás lagunas (Fig. 2). Esto sugiere la existencia de diversas fuentes que pueden aportar polifenoles al agua de estas lagunas. El lavado del suelo y la vegetación por la lluvia, junto con el arrastre por escorrentía, podrían explicar el enriquecimiento súbito inicial como ocurre en la laguna menor. La inundación de la vegetación que rodea a las

lagunas, como consecuencia de la subida del nivel del agua, explicaría su aumento posterior, especialmente en las lagunas mayores que poseen un mayor área de inundación. Además, se sabe que la vegetación que rodea estas lagunas es capaz de liberar altas concentraciones de polifenoles solubles con la lluvia y que, dicha concentración, aumenta gradualmente desde las zonas más cercanas al litoral hasta la vegetación xerofítica que crece sobre sustrato arenoso (Serrano, 1992).

Figura 2. Evolución de la concentración de polifenoles solubles (—●—) y clorofila.a (---○---) en las lagunas.

Por tanto, el inusual y súbito enriquecimiento de polifenoles solubles durante el invierno de 1990 sugiere que existe un aporte externo a la habitual zona de inundación de las lagunas (caracterizada por la presencia de juncos). Este aporte debe llegar de la vegetación terrestre, tan rica en polifenoles solubles. Por ello, se utilizaron dos tipos de extractos polifenólicos en los ensayos en el laboratorio que corresponden con estos dos tipos de vegetación: una eminentemente xerofítica (*Halimium halimifolium*, Cystaceae) y otra higrofitica (*Juncus effusus*, Juncaceae y *Scirpus holoschoenus*, Cyperaceae).

En términos generales, se considera que la descomposición de las plantas vasculares consta de tres fases: a) una rápida pérdida inicial por lavado ("leaching"), b) una descomposición microbiana y c) una fragmentación mecánica y debida a macroinvertebrados. Durante el lavado, los compuestos más solubles son liberados muy rápidamente, con pérdidas sustanciales de compuestos orgánicos e inorgánicos, a veces más del 50% de la materia seca (Gopal, 1984). Algunos autores estiman que esta pérdida supone un 25% durante las primeras 24 h (Webster y Benfield, 1986), otros sugieren que oscila entre un 10-40% en el caso

de los compuestos lignocelulósicos (Suberkropp et al., 1976), pero todos coinciden en que esta liberación es completa tras las primeras 2-4 semanas de descomposición y que el material que queda es más resistente a la degradación, de modo que ésta prosigue más lentamente. Por ello, a cada tipo de vegetación (xerofítica y palustre) se le aplicaron dos tratamientos que reflejaran estas dos fases de la descomposición: a) extracto "nuevo" y b) extracto "viejo".

Figura 3.- Crecimiento de los cultivos en los distintos tratamientos: control (—○—), vegetación palustre "nueva" (---△---) y "vieja" (----△----), vegetación terrestre "nueva" (---□---) y "vieja" (----□----).

En la figura 3 se muestra el efecto de estos extractos sobre el crecimiento de *Chlamydomonas* sp. cultivada en el laboratorio. En primer lugar, se observa que el comportamiento de estos cultivos es diferente a lo largo del tiempo, siendo notablemente alto el crecimiento de los cultivos tratados con extracto de vegetación palustre al término de la fase de crecimiento exponencial. Así mismo, en el ensayo de campo, el crecimiento en los tubos tratados con este tipo de extracto también fue superior a los demás, mientras que los tubos tratados con extracto de vegetación terrestre registraron el crecimiento más bajo (Fig. 4).

En este ensayo se midieron las concentraciones de polifenoles inicial y final, de modo que se pudo estimar la degradación de estos productos a lo largo del tiempo (Tabla 1).

Figura 4. Crecimiento del fitoplancton en el ensayo de campo bajo los mismos tratamientos: control (—○—) vegetación palustre "nueva" (---△---) y "vieja" (----△----), vegetación terrestre "nueva" (---□---) y "vieja" (----□----).

Tabla 1.- Concentraciones medias de compuestos polifenólicos solubles (mg/L) en el ensayo de campo y porcentaje de los mismos desaparecido.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION		% DESAPARECIDO
	INICIAL	FINAL	
Controles	10.7	3.2	70
Extracto nuevo veget. palustre	20.6	3.3	84
Extracto viejo veget. palustre	22.4	2.5	83
Extracto nuevo veget. terrestre	23.0	3.5	84
Extracto viejo veget. terrestre	25.2	5.1	79

Dado que los cultivos de laboratorio eran axénicos pero no estériles, se produjo también una degradación de los extractos a medida que se desarrollaba el cultivo. Así, la distinta tasa de degradación de estos compuestos, según su origen vegetal, podría explicar el diferente crecimiento de los cultivos tratados con los extractos en las últimas etapas del experimento. La existencia de distintas tasas de descomposición se debe a la notable diferencia que poseen las especies vegetales utilizadas en la relación C/N: para la vegetación tipo junco "nuevo" y "viejo" es 7 y 9, respectivamente, mientras que para la vegetación terrestre dicha relación es 27 y 28.7, respectivamente.

Numerosos autores utilizan la relación C/N para predecir la subsecuente descomposición microbiana de ese material ya que, cuanto mayor sea dicha relación, menor será la producción bacteriana y menor la descomposición del material vegetal (Suberkropp et al., 1976; Day, 1982,). Además, son muchos los estudios acerca de la descomposición terrestre y acuática de la hojarasca que demuestran la correlación negativa entre la tasa de descomposición y el contenido inicial de lignina (Suberkropp et al., 1976; Webster y Benfield, 1986; Moran et al., 1989).

El extracto vegetal terrestre deriva de plantas leñosas con un contenido de componentes estructurales superior al de la vegetación tipo junco, aunque se sabe que *Juncus effusus* es una especie rica en componentes lignocelulósicos (Boon et al., 1982).

El que las diferencias más notables en el crecimiento aparezcan al término de la fase exponencial se explica por el hecho de que estos compuestos producen una limitación nutricional, al ser capaces de acomplejar los metales traza necesarios para el crecimiento (Serrano y Guisande, 1990). Dado que los extractos vegetales palustres son más susceptibles a la degradación microbiana que los extractos terrestres, se puede suponer que las diferencias estadísticamente significativas, obtenidas en el crecimiento de los cultivos tratados, se deben a la desigual tasa de degradación. Además, aquellos cultivos tratados con extractos palustres superan a los controles durante las últimas etapas de crecimiento, como si poseyeran otras sustancias beneficiosas para el crecimiento de los cultivos, cuyo efecto se hiciera aparente cuando los constituyentes polifenólicos de los extractos han sido finalmente degradados o sólo permanecen en bajas concentraciones. De hecho, compuestos no lignocelulósicos como azúcares simples, aminoácidos, proteínas, lípidos y cationes (Ca^{++} , K^+ , etc) son también lavados rápidamente del material detrítico (Suberkropp et al., 1976; Webster y Benfield, 1986). El efecto positivo de los extractos vegetales polifenólicos a baja concentración ya ha sido constatado antes en estudios a cerca de la actividad de exoenzimas acuáticos (Serrano & Boon, 1991).

CONCLUSIONES

En conclusión, el crecimiento de *Chlamydomonas* sp. en el laboratorio aparece mas afectado por el origen del extracto añadido que por el estado de degradación en que éste se encuentre. En los cultivos tratados con extractos de vegetación palustre, el crecimiento de los cultivos fue superior al de los controles y al de los cultivos tratados con extractos de vegetación terrestre. Por el contrario, en el campo, el crecimiento de los controles fue superior al de los tubos tratados con extractos de vegetación terrestre, similar al de los tratados con vegetación palustre "vieja" e inferior al tratamiento con vegetación palustre "nueva". El escaso número de réplicas impide confirmar estadísticamente los resultados. Estos y los obtenidos del resto de parámetros medidos en el campo durante el año 1989-91, sugieren que las características de estos extractos y su relación con el medio natural podrían explicar la inusual pérdida de la biomasa fitoplanctónica en las lagunas durante periodos extremadamente lluviosos. En los años secos y normales, la materia orgánica alóctona es aportada a las lagunas, fundamentalmente, por la vegetación palustre cercana, sin que exista un deterioro notable en el fitoplancton (como sucedió durante el periodo 1990-91). Sin embargo, en años excepcionalmente lluviosos las lagunas reciben mayores aportes de materia procedente de la vegetación terrestre, capaces de producir un drástico y prolongado descenso en la biomasa y producción fitoplanctónica. Esta alternancia de altas y bajas productividades fitoplanctónicas a lo largo de desiguales ciclos hidrológicos ha determinado que en la literatura se haya calificado el estado trófico de las lagunas peridunares de forma muy diferente: desde la eutrofia-mesotrofia a la distrofia, la pluviometría de los años estudiados en cada trabajo (Allier et al., 1974; Montes et al., 1982; López et al., 1991, Toja et al., 1991).

BIBLIOGRAFIA

- Allier, C.L., L. Ramírez-Díaz & F. González Bernáldez. 1974. Doñana: Mapa Ecológico. Publicaciones del CSIC, Sevilla. 12 pp.
- Allred, P.M. & J.P. Giesy. 1988. Use of in situ microcosms to study mass loss and chemical composition of leaf litter being processed in a blackwater stream. Arch. Hydrobiol. 114: 231-250.
- Benner, R., M.A. Moran & R.E. Hodson. 1985. Effects of pH and plant source on lignocellulose biodegradation rates in two wetland ecosystems, the Okefenokee Swamp and a Georgia salt marsh. Limnol. Oceanogr. 30: 489-499.
- Boon, J., R.G. Wetzel & G.L. Godshalk. 1982. Pyrolysis mass spectrometry of some *Scirpus* species and their decomposition products. Limnol. Oceanogr. 27: 839-848.
- Boon et al, 1988
- Bunn, S.E. 1988. Processing of leaf litter in a northern jarrah forest stream, Western Australia: I. Seasonal differences. Hydrobiologia 162: 201-210.
- Day, F.P., Jr. 1982. Litter decomposition rates in the seasonally flooded Great Dismal Swamp. Ecology 63: 670-678.
- De Haan, H., T. De Boer, J. Voerman, H.A. Kramer & J.R. Moed. 1984. Size classes of "dissolved" nutrients in shallow, alkaline, humic and eutrophic Tjeukemeer, The Netherlands, as fractionated by ultrafiltration. Verh. Internat. Verein. Limnol. 22: 876-881.
- Fustec, E., E. Chauvet, G. Gas, D. Lacaze & M. Escutier, 1988. Degradation of softwood(¹⁴C lignin) lignocelluloses and its relation to the formation of humic substances in rivers and pond environments. Hydrobiologia 159: 169-176.
- García-Novo, F., D. Galindo, J.A. García Sánchez, C. Guisande, J. Jáuregui, T. López, N. Mazuelos, J.C. Muñoz, L. Serrano, J. Toja. 1991. Tipificación de los ecosistemas acuáticos sobre sustrato arenoso del Parque Nacional de Doñana.

- III Simposio sobre el Agua en Andalucía. Córdoba. Instituto Tecnológico Geominero de España.
- Gessner, M.O. & J. K. Schwoerbel. 1989. Leaching kinetics of fresh leaf litter with implications for the current concept of leaf-processing in streams. Arch Hydrobiol. 115: 81-90.
- Gopal, B., 1984. Comparison of leaching losses from decomposing litter of the terrestrial and marsh plants on land and in water. Verh. Internat. Verein Limnol. 22: 947-950.
- Hagerman, A.E. & L.G. Butler, 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. J. Agric. Food Chem. 26: 809-812.
- Haslam, E. 1989. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge University Press. 230 pp.
- Hedges, J.J. 1988. Polymerization of humic substances in natural environments. En Humic substances and their role in the environment. F.H. Frimmel & R.F. Chritsman (eds). J. Wiley & Sons, N.Y., 45-48 p.
- López, T., J. Toja & N. Gabellone, 1991. Limnological comparison of two peridunar ponds in the Doñana National Park (Spain). Arch. Hydrobiol. 120: 357-378.
- Margalef, R., 1983. Limnología. Ed. Omega. Barcelona. 110 p.
- McKinney, J., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140: 315-353.
- McKnight, D.M., K.A. Thorn, R.L. Wershaw, J.M. Bracewell & G.M. Robertson. 1988. Rapid changes in dissolved humic substances in Spirit Lake and South Fork Castle Lake, Washington. Limnol. Oceanogr. 33: 1527-1541.
- Montes, C., J. Amat & L. Ramírez-Díaz. 1982. Ecosistemas del Bajo Guadalquivir (SW España). Variación estacional de los componentes físico-químicos y biológicos de las aguas. Studia Oecologica 3: 159-180.
- Moran, M.A., R. Benner & R.E. Hodson. 1989. Kinetics of microbial degradation of vascular plant material in two wetland ecosystems. Oecologia 79: 158-167.
- Moran, M.A. & R.E. Hodson. 1990. Bacterial production on humic and non-humic components of dissolved organic carbon. Limnol. Oceanogr. 35: 1744-1756.
- Rich, P.H. & R.G. Wetzel. 1978. Detritus in the lake ecosystem. Am. Natur. 112: 57-71.
- Serrano, L. & C. Guisande. 1990. Effects of polyphenolic compounds on phytoplankton. Verh. Internat. Verein Limnol. 24: 282-288.
- Serrano, L. 1992. Leaching from vegetation of soluble polyphenolic compounds, and their abundance in temporary ponds of the Doñana National Park (SW, Spain). Hydrobiol. 229: 43-50.
- Serrano, L. & P. Boon. 1991. Effect of polyphenolic compounds on alkaline phosphatase activity: its implication for phosphorus regeneration in Australian freshwaters. Arch Hydrobiol. 123: 1-19.
- Suberkropp, K., G.L. Godshalk & M.J. Klug. 1976. Changes in the chemical composition of leaves during processing in woodland streams. Ecology. 57: 720-727.
- Sueoka, N., K.S. Chiang & J.R. Kates. 1967. Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Mol. Biol. 25: 47-67.
- Toja, J., T. López & N. Gabellone. 1991. Successional changes in two dune ponds (Doñana National Park). Verh. Internat. Verein Limnol. 24: 1556-1559.
- Visser, S.A. 1984. Seasonal changes in the concentration and colour of humic substances in some aquatic environments. Fresh. Biol. 14: 79-87.
- Vollenweider, R.A.. 1969. Primary production in aquatic environments IBP. Blackwell Sci. Publ. Oxford & Edinburgh. Handbook 12. 213 p.
- Webster, J.R. & E.F. Benfield. 1986. Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. Ann. Rev. Ecol. Sys. 17: 567-594.