

## **Nannochloropsis gaditana sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina**

L. M. Lubián (\*)

**Resumen:** Lubián, L. M. *Nannochloropsis gaditana sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina*. *Lazaroa*, 4: 287-293 (1982).

Se describe *Nannochloropsis gaditana* Lubián *sp. nov.*, *Eustigmatophyceae* aislada de la Bahía de Cádiz, como resultado de los estudios sobre su morfología, ultraestructura, composición de pigmentos y fisiología del crecimiento. *N. gaditana* se diferencia de las otras dos especies, *N. oculata* (Droop) Hibberd y *N. salina* Hibberd cultivadas en las mismas condiciones, en su morfología y capacidad para producir  $\alpha$ -caroteno.

**Abstract:** Lubián, L. M. *Nannochloropsis gaditana sp. nov., a new marine Eustigmatophyceae*. *Lazaroa*, 4: 287-293 (1982).

A new marine species of *Eustigmatophyceae*, *Nannochloropsis gaditana* Lubián, isolated from Cádiz Bay, is described as a consequence of studies about its morphology, ultrastructure, pigment composition and growth physiology. The differences among *N. gaditana* and the other species, *N. oculata* (Droop) Hibberd and *N. salina* Hibberd cultured in the same conditions, are related to morphology and ability to produce  $\alpha$ -carotene.

### INTRODUCCION

El género *Nannochloropsis* Hibberd (1981) comprende dos especies, *N. oculata* (Droop) Hibberd y *N. salina* Hibberd, la primera subsférica de 2-4 micras de diámetro y la segunda cilíndrica de  $3-4 \times 1,5-1,7$  micras. Debido a su reducido tamaño, la taxonomía de estas algas ha sido dudosa y en un principio *N. oculata* fue incluida en el género *Nannochloris* Naumann (*Chlorophyceae*; DROOP, 1955), mientras que *N. salina* se consideró perteneciente al género

---

(\*) Instituto de Investigaciones Pesqueras, Cádiz.

*Monallantus* Pascher (*Xanthophyceae*; BOURRELLY, 1957). Posteriormente, ANTIA & al. (1975a) estudiaron la ultraestructura y composición de pigmentos de estas dos algas llegando a la conclusión de que ambas pertenecen a las *Eustigmatophyceae*, clase algal establecida por HIBBERD & LEEDALE (1970, 1971, 1972). Del mismo modo, a nivel específico se diferencian ligeramente en su pigmentación pero no en su ultraestructura. Respecto a su fisiología, aunque no existen apenas estudios comparativos en iguales condiciones de cultivo, se sabe al menos que sus respuestas de crecimiento, frente a diversas fuentes de nitrógeno, no son las mismas (ANTIA & al., 1975b).

Desde 1974 se cultiva en el Instituto de Investigaciones Pesqueras de Cádiz, un organismo aislado de la Bahía de Cádiz (cepa B-3) que inicialmente se consideró perteneciente al género *Nannochloris*. Después de estudiar comparativamente su morfología, ultraestructura y composición de pigmentos, respecto a *N. oculata* y *N. salina* en las mismas condiciones de cultivo, y una vez comprobada su pertenencia a la clase *Eustigmatophyceae* (LUBIÁN, 1982; LUBIÁN & ESTABLIER, 1982), ahora se propone su designación como *Nannochloropsis gaditana* sp. nov.

## MATERIAL Y METODOS

La cepa B-3 de la nueva especie se aisló de una muestra de agua de la Bahía de Cádiz y desde entonces se mantiene en cultivo, en las condiciones especificadas por LUBIÁN (1979). El clon axénico se obtuvo en el Dunstaffnage Marine Research Laboratory (Oban), donde quedó registrado como *Nannochloris* sp. (cepa n.º 269).

Las observaciones sobre la morfología de las algas in vivo se hicieron con un microscopio Wild, M-20, provisto de equipo de fotografía y tubo de dibujo. La metodología utilizada para el estudio de su ultraestructura y composición de pigmentos ha sido descrita anteriormente por LUBIÁN (1982) y LUBIÁN & ESTABLIER (1982).

## OBSERVACIONES

### *Morfología y ultraestructura*

El tamaño y la forma de las algas estudiadas son susceptibles de variación con las condiciones de cultivo y a lo largo de su crecimiento. No obstante, las células de *N. gaditana*, cuando la población algal está en fase de crecimiento activo, presentan una forma elipsoidal de  $3,5-4 \times 2,5-3$  micras y en estas circunstancias pueden distinguirse de las de *N. oculata* y *N. salina*. Las restantes características morfológicas son similares en las tres algas. Son inmóviles, desprovistas de flagelos y poseen un cromatóforo sencillo parietal de color ver-

de pálido que ocupa gran parte de la célula. El citoplasma es fuertemente basófilo y el tratamiento con Negro Sudán B pone en evidencia una gran acumulación de lípidos. Además, se observa frecuentemente la presencia de un glóbulo extraplasmático, de color rojo, sobre todo en cultivos envejecidos. La pared celular es lisa y formada de una sola pieza, aunque en *N. gaditana* parece más gruesa y resistente que en las otras dos especies. En ningún caso se han detectado zoósporas ni formas de resistencia y la reproducción se realiza exclusivamente mediante fisión binaria de las células.

La ultraestructura no se ha podido analizar con detalle debido principalmente a que es difícil conseguir una óptima fijación del material celular. No obstante, las características observadas en *N. gaditana* se dan igualmente en las otras dos especies (fig. 1). El cloroplasto, que ocupa la mayor parte de la célula, contiene una serie de laminillas paralelas formadas por tres tilacoides cada una y carece de laminilla envolvente (LUBIÁN, 1982). Asimismo, su envoltura está formada por cuatro membranas, de las cuales las dos exteriores corresponden al retículo endoplásmico. Aunque no se ha podido confirmar definitiva-

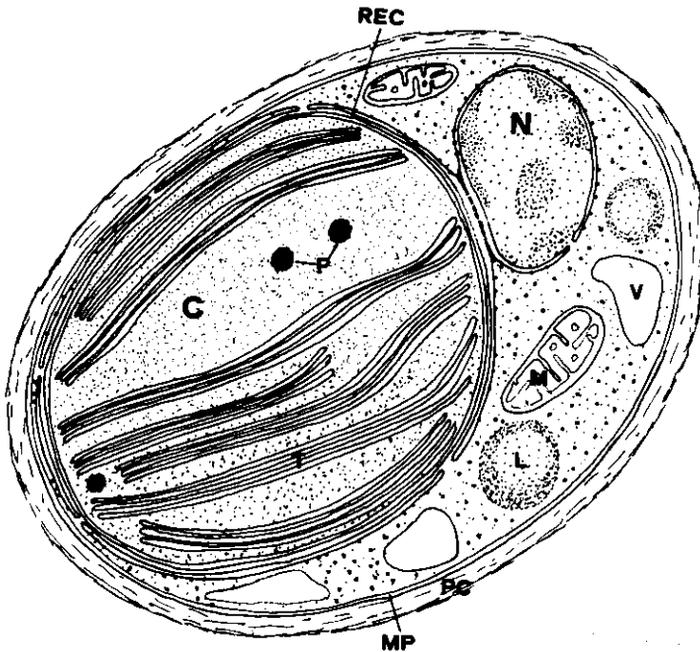


Fig. 1.—Esquema representativo de las principales características ultraestructurales de *Nannochloropsis gaditana*. C: cloroplasto; MP: membrana plasmática; N: núcleo. M: mitocondria; REC: retículo endoplásmico asociado al cloroplasto; T: tilacoides; PC: pared celular; V: vacuolas; L: lípidos; P: glóbulos plastidiales.

mente, éste parece conectar con la membrana nuclear al igual que ocurre en *N. oculata* y *N. salina* (ANTIA & al., 1975a). Sin embargo, a diferencia de lo observado por estos autores, no hemos encontrado en ninguna de las tres especies otras estructuras típicas de este grupo como son vesículas laminadas y pirenoides.

### Composición de pigmentos

Al igual que el resto de las *Eustigmatophyceae*, *N. gaditana* presenta clorofila *a*,  $\beta$ -caroteno, violaxantina como carotenoide mayoritario y vaucheriaxantina (LUBIÁN & ESTABLER, 1982). Estos pigmentos, junto a otros carotenoides secundarios entre los que se encuentran la cantaxantina y cetocarotenoides del tipo de la astaxantina, también son comunes a *N. oculata* y *N. salina*. La diferencia fundamental entre ellas concierne a la presencia constante de  $\alpha$ -caroteno en *N. gaditana*, mientras que las otras dos especies carecen de este pigmento.

Los cultivos de estos organismos tienen color verde durante la fase exponencial de crecimiento, pero conforme envejecen se vuelve amarillentos y llegan a ser de color naranja-rojo. Este cambio ocurre más rápidamente en ausencia de nitrógeno o frente a una alta radiación lumínica y es entonces cuando se hace especialmente patente en las células el glóbulo coloreado indicado anteriormente. Dicha inclusión, que aparece en las tres algas, parece ser un acúmulo de cetocarotenoides y podría explicar en el caso de *N. oculata* la observación de DROOP (1955) acerca de la presencia de un estigma en esta especie (LUBIÁN, 1981; ANTIA & CHENG, 1982).

### Características fisiológicas

En un trabajo anterior se han señalado algunas características fisiológicas del crecimiento de *N. gaditana* (LUBIÁN, 1979). Por otra parte, LOEBLICH III & LOEBLICH (1978) han hecho una recopilación de los resultados de varios estudios sobre crecimiento, fisiología y nutrición realizados en distintas especies de *Eustigmatophyceae*.

*N. gaditana*, al igual que las restantes especies del grupo, es autótrofa y no requiere vitaminas para su crecimiento. Si se le suministra nitrato, nitrito, amonio o urea como fuentes de nitrógeno, a una concentración en el medio de cultivo de 0,5 mg-átomo de N/litro, se obtiene un crecimiento óptimo con los tres primeros compuestos, mientras que éste es sensiblemente menor con urea. El comportamiento es semejante al mostrado por *N. oculata* y diferente al de *N. salina*, cuyas respuestas de crecimiento concuerdan con las obtenidas por ANTIA & al. (1975b).

Además de fosfato inorgánico, *N. gaditana* y *N. salina* pueden utilizar glicerofosfato como fuente alternativa de fósforo, y de hecho poseen actividad

fosfatásica alcalina (Establier & Lubián, inéd.), mientras que esto no ocurre en *N. oculata*.

Frente a factores como la salinidad, temperatura e intensidad lumínica, no se ha realizado un estudio comparativo sistematizado entre las tres algas, pero de las observaciones realizadas se puede afirmar que todas toleran un amplio rango de salinidades, y que la intensidad saturante de luz es bastante baja en comparación con otras algas. Esto es debido probablemente a la presencia de una sola clorofila, lo que confiere una menor estabilidad al aparato fotoquímico en presencia de altas intensidades de luz.

## DISCUSION

Dado su pequeño tamaño, es difícil basar la taxonomía de estas algas en su morfología y ciclo biológico. Por otra parte existen problemas a la hora de obtener material celular convenientemente fijado, lo que impide con frecuencia una observación detallada de los ya escasos caracteres de ultraestructura. Esta puede ser una de las razones del por qué no se han detectado vesículas lamina-das ni pirenoides reconocibles como tales, aunque ANTIA & al. (1975a) consideran a estos últimos como estructuras transitorias cuya presencia depende del estado metabólico del alga.

En este caso, los datos bioquímicos y fisiológicos obtenidos a partir de organismos en cultivo, proporcionan caracteres adicionales que junto con los anteriores permiten delimitar más claramente su situación taxonómica. Así, el conocimiento de la composición de los pigmentos mayoritarios en *N. gaditana* ha sido lo que ha decidido su integración en la clase *Eustigmatophyceae* y por otra parte, su morfología, tamaño y el hecho de que no produce zoósporas permiten considerarla como perteneciente al género *Nannochloropsis* (*Monopsidaceae*).

*N. gaditana* contiene además  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, mientras que *N. oculata* y *N. salina* producen solamente  $\beta$ -caroteno. Las estructuras del  $\alpha$ -caroteno [(6'R)- $\beta$ ,  $\epsilon$ -caroteno] y  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno) son diferentes y estudios genéticos han comprobado la formación por separado de los anillos  $\beta$  y  $\epsilon$ , es decir que la capacidad para formar los dos tipos de anillos parece ser heredada independientemente (TOMES, 1967 en BRITON, 1976).

Finalmente conviene hacer notar que la taxonomía del género *Nannochloropsis* permanece aún inestable, ya que junto a caracteres típicos de las *Eustigmatophyceae* (HIBBERD, 1981) estas algas presentan otros diferentes a los del resto del grupo, como la conexión entre el núcleo y el retículo endoplásmico asociado al cloroplasto (ANTIA & al., 1975a) o la producción de 4-cetocarotenoides (ANTIA & CHENG, 1982). Ahora se pone de manifiesto además la presencia de  $\alpha$ -caroteno en *N. gaditana*, que no sólo la diferencia de *N. oculata* y *N. salina* sino de las restantes *Eustigmatophyceae* estudiadas hasta el momento (NORGARD & al., 1974; LOEBLICH III & LOEBLICH, 1978; ANTIA & CHENG, 1982).

No obstante, en base a la situación taxonómica actual se propone a *Nannochloropsis gaditana* como nueva especie perteneciente a la clase *Eustigmatophyceae*, la cual se describe a continuación.

***Nannochloropsis gaditana* Lubián *sp. nov.***

*Cellulis non mobilibus, ellipticis, dimensionibus 3,5 — 4 × 2,5 — 3 μ. Parietes cellulae sine vagina mucilaginis levis est. Chloroplastus unicus parietalis maior partis cellulae occupat, cum thylacoidibus parallelis in circulis triae consociatis, sine lamella involvente. Reticulus endoplasmicus chloroplastum circumdat. Pigmenta propria Eustigmatophyceae habet et praeterea α-carotenum continet. Reproductione per simplice divisione cellularis. Zoosporas neque formas sexuales nesciunt.*

*Origo: Sinus Gadium (Hispania)*

*Holotypus: figura nostra 1.*

Células inmóviles, elipsoidales, de dimensiones 3,5 — 4 × 2,5 — 3 μ. Pared celular lisa sin cubierta mucilaginosa. Un único cloroplasto parietal ocupa la mayor parte de la célula, con tilacoides asociados en grupos de tres, sin lamina envolvente. El retículo endoplásmico rodea al cloroplasto. Contiene α-caroteno además de los pigmentos propios de las *Eustigmatophyceae*. Reproducción mediante simple división celular. No se conocen zoósporas ni formas sexuales.

Origen: Bahía de Cádiz (España).

Holotipo: figura 1.

#### AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento por revisar y criticar el manuscrito a los Profesores Dr. Benito Valdés y Dr. José Luis Pérez-Cirera, así como a D.<sup>a</sup> Lydia Lubián y D. Antonio Picardo a los que debo la traducción latina de la descripción de la especie.

#### BIBLIOGRAFIA

- Antia, J. N., Bisalputra, T., Cheng, J. Y. & Kalley, J. P. —1975a— Pigment and cytological evidence for reclassification of *Nannochloris oculata* and *Monallantus salina* in the Eustigmatophyceae — J. Phycol., 11: 339-343.
- Antia, J. N., Berland, B. R., Bonin, D. J. & Maestrini, S. Y. —1975b— Comparative evaluation of certain organic and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae — J. Mar. Biol. Ass. U.K., 55: 519-539.
- Antia, N. J. & Cheng, J. Y. —1982— The keto-carotenoids of two marine coccooid members of the Eustigmatophyceae — Br. phycol. J., 17: 39-50.
- Bourrelly, P. —1957— Note systématique sur quelques algues microscopiques des cuvettes supralittorales de la région de Dinard — Bull. Laboratoire Maritime de Dinard, 43: 111-118.

- Briton, G. —1976— Biosynthesis of carotenoids. In: Goodwin, T. W.: Chemistry and Biochemistry of plants pigments. Vol. 1: 262-327. Academic Press.
- Droop, M. R. —1955— Some new supra-littoral protista — J. Mar. Biol. Ass. U.K., 34: 233-245.
- Hibberd, D. J. —1981— Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae) — J. Linn. Soc., Bot., 82 (2): 93-119.
- Hibberd, D. J. & Leedale, G. F. —1970— Eustigmatophyceae — a new algal class with unique organization of the motile cell — Nature, 255: 758-760.
- Hibberd, D. J. & Leedale, G. F. —1971— A new algal class — Eustigmatophyceae — Taxon, 20 (4): 523-525.
- Hibberd, D. J. & Leedale, G. F. —1972— Observations on the cytology and ultrastructure of the new algal class, Eustigmatophyceae — Ann. Bot., 36: 49-71.
- Loeblich III, A. R. & Loeblich, L. A. —1978— Division Eustigmatophyceae. In: Laskin, A. I. & Lechevalier, H. A. Handbook of Microbiology. Vol. II: 481-487. C.R.C. Press.
- Lubián, L. M. —1979— Factores que afectan al crecimiento en cultivo del alga planctónica marina *Nannochloris* sp. — Inf. Téc. Inst. Inv. Pesq., 67: 1-14.
- Lubián, L. M. —1981— Crecimiento en cultivo de cuatro cepas de *Nannochloris* (alga planctónica). Estudio de su citología y composición de pigmentos, como base para el esclarecimiento de su situación taxonómica. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 186 pp.
- Lubián, L. M. —1982— Ultraestructura y pigmentos de algunas Chlorophyceae y Eustigmatophyceae planctónicas de morfología similar — Collectanea Botanica, 13 (2): 873-880.
- Lubián, L. M. & Establier, R. —1982— Estudio comparativo de la composición de pigmentos en varias cepas de *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) — Inv. Pesq., 46 (3): 379-389.
- Norgard, S., Svec, W. A., Liaaen-Jensen, S., & Guillard, R. R. L. —1974— Chloroplast pigments and algal systematics — Biochemical Systematics and Ecology, 2: 3-6.