



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Facultad de Ciencias

MÁSTER EN GEOFÍSICA Y METEOROLOGÍA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**CÁMARA HIPOBÁRICA CON CONTROL
CLIMÁTICO AMISTON CHCC21 Y USO EN
EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE
FLUJOS DE CO₂ Y AGUA EN PLANTAS DE
TOMATE SOMETIDAS A DIFERENTES
GRADIENTES DE CO₂, TEMPERATURA Y
PRESIÓN ATMOSFÉRICA.**

Javier Martínez Moreno

Presentado por:

Javier Martínez Moreno

Tutor:

Andrew Kowalski

Enrique Pérez Sánchez Cañete

Salvador Aljazairi López

Curso académico 2021/2022



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Resumen: El proceso de intercambio de gases es uno de los factores que dicta la calidad del funcionamiento de la fotosíntesis en una planta. Si se suponen situaciones extremas en las que la presión sea muy baja, hay posibilidad de que el transporte de gases se de por procesos no difusivos debido al aumento de la presión parcial de vapor de agua por su ebullición. Existen múltiples instrumentos para estimar dicho intercambio de gases, tanto en laboratorio como en campo. En este estudio se ha utilizado una innovadora cámara hipobárica capaz de controlar valores ambientales mientras registra datos acerca de los gases de su interior. Esta cámara nos ha servido para realizar medidas de intercambio de gases en una planta de tomate a diferentes presiones (600 mb, 750 mb, 800 mb y 950 mb). Previamente a esto, se realizaron pruebas con la cámara vacía y con suelo en su interior para estimar los flujos que no se corresponden con los realizados por parte de la planta. Los resultados han sido poco concluyentes, ya que al invertir tanto tiempo en conocer el instrumento y realizar pruebas de errores no se pudieron tomar muchas repeticiones con plantas. Aún así tenemos registrados datos con 415 ppm de CO₂ que nos dan información interesante acerca de los procesos no difusivos, ya que el flujo de CO₂ aumenta conforme aumenta la presión y el flujo de vapor de agua disminuye, lo que es compatible con la teoría acerca de los procesos no difusivos explicada con más profundidad en el cuerpo de este trabajo.

Conceptos clave: Fotosíntesis, Procesos no difusivos, Intercambio de gases, CO₂, H₂O, Cámara, Flujo, Presión.

ÍNDICE.

1. Introducción.

1.1. Objetivos.

2. Marco teórico.

2.1. Fotosíntesis.

2.2. Intercambio de gases.

2.3. Procesos difusivos en el intercambio de gases.

2.4. Procesos no difusivos en el intercambio de gases.

3. Material y métodos.

3.1. Componentes del sistema.

3.2. Diagrama de la cámara hipobárica.

3.3. Encendido y apagado de la cámara.

3.4. Descripción de los experimentos.

4. Resultados y tratamiento de datos.

4.1. Tratamiento de datos.

4.2. Resultados.

5. Discusiones.

6. Conclusiones.

1. INTRODUCCIÓN.

El proceso fotosintético en plantas, además de la luz solar, también depende del intercambio de gases que estas realizan con el medio que les rodea. El funcionamiento del intercambio de gases se rige principalmente por procesos difusivos entre los estomas y la capa límite que envuelve la hoja. En este trabajo fin de máster, aprovechando la posibilidad de contar con una innovadora cámara climática (de la que se hablará más adelante) que nos permite variar parámetros ambientales en su interior y tomar datos precisos, se va a estudiar cómo influyen los procesos no difusivos en el intercambio de gases en plantas sometidas a variaciones en la presión atmosférica

El instrumento que nos permite realizar estas medidas es la *Cámara Hipobárica con Control Climático Amiston CHCC21*. Esta cámara es única en el mundo y se ha desarrollado en una empresa Granadina (Amiston) bajo las indicaciones del grupo de investigación de física de la atmósfera de la Universidad de Granada. Este aparato consta de tres módulos principales; un analizador de gases modelo G2301 fabricado por PICARRO, un sistema de control climático desarrollado por Amiston y una cámara climática de Memmert modelo VO49COOL. El sistema adquirido por la Universidad de Granada (al que nos vamos a referir a partir de ahora como “cámara hipobárica”, “cámara de vacío” ó “cámara climática”) tiene la capacidad de medir intercambios de CO₂, CH₄ y vapor de agua bajo unas condiciones controladas de temperatura, humedad, luz, concentración de CO₂ y presión atmosférica. Esta cámara hipobárica puede reducir la presión en su interior hasta unos 400 mb gracias a una bomba de vacío colocada debajo de ésta y a la vez monitorizar las variaciones en la concentración de gases.

Este estudio realmente tiene dos fines; el primero es entender cómo funciona la cámara hipobárica ya que se trata de un instrumento nuevo, y ver los posibles errores que puede presentar al realizar medidas y así poder evaluar la fiabilidad de sus medidas. El segundo objetivo de este estudio es, como se dijo antes, observar si procesos no difusivos producidos por la disminución de la presión atmosférica influyen en el intercambio de gases entre plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum* ‘Ailsa Craig’) y la atmósfera.

La parte experimental de este trabajo se ha dividido en dos partes. La primera etapa: evaluar la estanqueidad de la cámara. Consiste en tomar datos de la concentración de CO₂ que se pierde o diluye en el interior de la cámara hipobárica sin ningún factor que lo condicione, es decir, con la cámara vacía y dejando parámetros de gases y temperatura estables, para así estimar las pérdidas y errores en las medidas de CO₂ y poder corregir los resultados obtenidos. Segunda etapa: determinación de los flujos de CO₂. Aquí se tomarán medidas con una planta en el interior de la cámara, en las que se obtendrán datos del intercambio de gases de dicha planta a diferentes presiones atmosféricas

Antes de comenzar a hablar de los datos obtenidos y analizados, es importante dejar claros algunos fundamentos teóricos acerca del funcionamiento del intercambio de gases, tanto difusivo como no difusivo. También se van a describir los instrumentos y programas informáticos que forman parte de la cámara hipobárica, así como el proceso de germinación de las plantas de tomate, y una breve descripción de cada experimento y sus etapas.

1.1 Objetivos.

En este trabajo se ha utilizado una cámara de vacío con múltiples opciones de uso, la cual, hasta el momento, no se había empleado para la investigación. Es por esto que uno de los objetivos de nuestro estudio es entender su funcionamiento, programación y capacidad para poder aplicarla en un futuro a investigaciones de apertura estomática, intercambio de gases, procesos difusivos y no difusivos, y comportamiento de plantas a distintos escenarios climáticos.

Es importante recalcar que se ha invertido mucho tiempo en conocer el instrumento, así como en aprender a ponerlo en funcionamiento tanto para toma de errores como para toma de datos definitivos. Este es un motivo para plantear otro objetivo en este proyecto; poder medir los errores en la cámara hipobárica y agilizar los métodos para su uso.

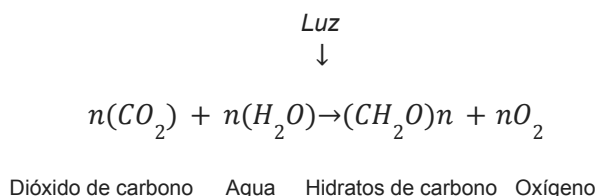
Entender cómo funciona la cámara y qué podemos hacer con ella tiene un propósito muy importante para este estudio; observar si al disminuir la presión atmosférica, la cantidad de CO₂ absorbido por las hojas de las plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum 'Ailsa Craig'*) cambia respecto a la cantidad de este gas que es retenida en condiciones normales de presión atmosférica sin variar condiciones como luz, temperatura y humedad, y, a su vez, observar cómo varía la cantidad de agua expulsada por la planta conforme disminuimos la presión del interior de la cámara.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fotosíntesis.

La fotosíntesis se trata de un proceso fisicoquímico mediante el cual las plantas, algas y bacterias fotosintéticas utilizan la energía proveniente de la luz solar para transformar compuestos inorgánicos presentes en la atmósfera en compuestos orgánicos que pueden ser usados por todas las formas de vida (Tolentino, G. L., et al., 2016; Taiz, L., & Zeiger, E. 2006; Fernández, M., & Gyenge, J. 2010; Carril, E. P. U. 2011).

Salvo en ciertas excepciones, la fotosíntesis produce una liberación de oxígeno molecular al medio (fotosíntesis oxigénica). La ecuación general de la fotosíntesis oxigénica es la mostrada a continuación (Mata, P. G. E.; Alonso, S. et al., 2020):



El proceso fotosintético se divide en dos fases.

La primera fase se denomina fase fotoquímica y tiene lugar en los tilacoides (saquitos situados en el interior de los cloroplastos). En la fase fotoquímica se absorbe la luz en los cloroplastos, más concretamente en la clorofila contenida en éstos. Los electrones

de la clorofila son excitados por la luz y se desplazan a través de transportadores electrónicos por la membrana tilacoidal (Tolentino, G. L., et al., 2016). Finalmente, estos electrones son captados por la molécula $NADP^+$ junto al hidrógeno, lo que provoca una transformación de la molécula en $NADPH_2$. En el proceso de transporte se produce un gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP (Del Valle, É. V., & Sánchez, E. 2015). Sintetizando, en la fase fotoquímica, la luz captada por la planta se almacena en las moléculas orgánicas ATP y $NADPH_2$ (Fernández, M., & Gyenge, J. 2010).

La segunda fase de la fotosíntesis es la fase bioquímica ó de fijación de carbono, que ocurre en la matriz del cloroplasto (Alonso, S. et al., 2020). Tras el ingreso del CO_2 a través de los estomas, éste se combina con la ribulosa bifosfato, que es la molécula aceptora, gracias a la actuación de la enzima 1.5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) (Fernández, M., & Gyenge, J. 2010). Esta fijación del CO_2 por parte del Rubisco forma dos moléculas de ácido-3-fosfoglicerato (PGA), que se van a transformar en ácido 1, 3 difosfoglicérico gracias a la energía del ATP (Fernández, M., & Gyenge, J. 2010). El ácido 1, 3 difosfoglicérico será reducido a gliceraldehído-3-fosfato por la acción del $NADPH^2$, y una parte de éste será utilizado para sintetizar glucosa y el restante se utiliza para generar ribulosa y dar comienzo a un nuevo ciclo (Carril, E. P. U. 2011; Fernández, M., & Gyenge, J. 2010; Cordero Ocampo, R. K. 2020) Resumiendo, la fase de fijación de carbono usa el ATP y el $NADPH_2$ producidos en la fase bioquímica para sintetizar carbohidratos a partir del carbono del CO_2 (Alonso, S. et al., 2020)¹. La síntesis de carbohidratos se comporta también como un sumidero que proporciona un flujo de átomos de carbono durante el Ciclo de Calvin cuando se da una incorporación constante de dióxido de carbono (Taiz, L., & Zeiger, E. 2006).

La fotosíntesis realiza la función de fijación del CO_2 , pero hay otros procesos relacionados que producen liberación de CO_2 a la atmósfera, como la fotorrespiración y la respiración (Fernández, M., & Gyenge, J. 2010).

2.2 Intercambio de gases.

El intercambio de gases entre las plantas y el aire circundante es esencial para completar los ciclos fotosintéticos de las plantas, así como la respiración y la transpiración (Damián Nava, A., et al., 2009). Este intercambio de gases se da a través de los estomas.

La superficie de la epidermis de las hojas presenta pequeños poros llamados ostiolas cuya apertura o cierre está regulado por dos células denominadas estomáticas u oclusivas. Al conjunto que forman los ostiolas con las células oclusivas se le denomina estoma (Raven, P. H., et al., 1992). La abertura del estoma está comunicada con una cámara subestomática, una cavidad interna que permite el intercambio de gases.

Los estomas son los responsables de regular el intercambio de gases entre planta y atmósfera. Su función es permitir la entrada de CO_2 a la cámara subestomática y la salida del agua evaporada de las hojas (transpiración).

¹ Es importante recalcar que el ciclo explicado para la fase de fijación de carbono es válido para el tipo de plantas C3 (llamadas así porque el primer compuesto que se fija en el ciclo se compone por 3 carbonos), que son con las que trabajaremos en este estudio.

Para que se realicen intercambios de oxígeno y dióxido de carbono con el ambiente es necesario que se produzca la transpiración y un contacto directo entre la atmósfera y las superficies húmedas (internas) de las células. Al existir una humedad relativa superior en el interior del estoma que en el medio se producirá una salida de vapor de agua desde la cámara subestomática hacia el exterior (Taiz, L., & Zeiger, E. 2006) por procesos difusivos.

Por otro lado, la enzima RubisCO actúa en el interior de la cámara estomática retirando el CO_2 para realizar la segunda fase de la fotosíntesis. Al disminuir la concentración de dióxido de carbono en el interior del estoma, aumenta la diferencia de ésta entre el medio (mayor) y el interior de la hoja (menor), y se produce la entrada difusiva del CO_2 en la cámara subestomática (Taiz, L., & Zeiger, E. 2006).

La “expulsión” de agua desde la hoja hacia la atmósfera se da, en un 95%, a través del aparato estomático en forma de vapor de agua, debido a que la capa externa de las hojas denominada cutícula es impermeable para protegerla de la desecación (Taiz, L., & Zeiger, E. 2006). El recorrido del H_2O desde su absorción en las raíces de la planta incluye su succión por parte del xilema hasta su llegada a las paredes del mesófilo y se evapora ocupando los espacios aéreos de las hojas. Es tras esto cuando se produce su salida hacia la atmósfera a través de los estomas (Taiz, L., & Zeiger, E. 2006). Un gradiente de concentración controla el movimiento del agua, lo que hace que los procesos difusivos sean los principales responsables de esta ruta (Chaves M. M., et al., 2004).

Al igual que para el agua, la cutícula de las hojas es impermeable al CO_2 , por lo que casi toda la entrada que se produce de dióxido de carbono en una planta se realiza mediante los estomas (Hugalde, I. P., 2011). Una vez el dióxido de carbono haya entrado en las cavidades subestomáticas de la planta se difunde de manera líquida hacia el interior del cloroplasto, disuelto en el agua presente en las paredes celulares (Taiz, L., & Zeiger, E. 2006).

La ruta que se acaba de mencionar es la misma que la ruta seguida por el agua, pero en sentido opuesto (Taiz, L., & Zeiger, E. 2006). Este hecho sumado a que la entrada y salida de gases se da en el mismo punto, puede provocar dicotomías funcionales en una planta. En el caso que el aire circundante sea seco, el gradiente de pérdida de agua será mucho mayor que el de asimilación de dióxido de carbono. Si no se produce el cierre estomático, se facilitará la entrada de CO_2 , pero habrá una severa pérdida de agua (Taiz, L., & Zeiger, E. 2006).

2.3 Efectos de procesos difusivos en el intercambio de gases.

Las variaciones dentro del intercambio de gases en una planta están sujetas a condiciones tanto externas como internas. Según las teorías acerca del intercambio de gases en las plantas, la emisión de vapor de agua y la entrada de CO_2 en el estoma son debidas exclusivamente a procesos difusivos, por ejemplo, una alta concentración de dióxido de carbono en el aire que rodea a una planta puede incrementar el CO_2 intercelular (Damián Nava, A., et al., 2009). Otros factores que pueden influir en los parámetros fotosintéticos (pero siempre asociados a procesos difusivos) son las variaciones de temperatura, una variación de la llegada de radiación a las hojas y el grado de hidratación de la planta. Por ejemplo, una situación de sequía puede producir el cierre de las células oclusivas de los estomas para evitar la pérdida de agua,

evitando así también la entrada de CO₂, y provocando una disminución de la fotosíntesis (Damián Nava, A., et al., 2009, Fernández, M., & Gyenge, J. 2010).

Los factores explicados anteriormente son esenciales para entender cómo funciona la apertura y cierre estomático o para comprender mejor los procesos que permiten la entrada o salida de gases en el interior de la planta, no obstante, no es el punto principal de este estudio, pero se veía necesario realizar una explicación de los procesos principales que rigen el intercambio de gases para entender el por qué se va a usar la cámara hipobárica y para entender la pequeña teoría acerca de los procesos no difusivos que se va a explicar a continuación.

2.4 Procesos no difusivos en el intercambio de gases.

Si afirmamos que el 100% de los procesos que actúan en la entrada y salida de gases dentro de los estomas de una planta son difusivos, dejamos de tener en cuenta el empuje de otros gases presentes por parte del vapor de agua si se da una situación extrema en la que el flujo de éste abandone la hoja con una fuerza superior a la dada en situaciones normales debido, como se va a plantear ahora, a la presión atmosférica.

Partimos de la Ley de las presiones parciales de Dalton

$$P_T = P_1 + P_2 + P_3 \dots P_N$$

donde suponemos que en una mezcla de gases que no interactúan químicamente entre ellos, la presión total será la suma de las presiones parciales que ejerce cada gas de manera individual.

En presiones bajas se produce un descenso del punto de ebullición del agua, al someter una planta a estas condiciones se produce una mayor tasa de evaporación en el interior de la cámara subestomática y un aumento de la presión parcial del vapor de agua en ésta. Al aumentar la presión parcial del vapor, la presión total de la cámara estomática también va a aumentar (siguiendo la ley de Dalton), lo que puede producir una diferencia de presiones entre el interior del estoma y el medio circundante. Esta diferencia de presión puede derivar a una salida “a chorro” de vapor de agua por el estoma que impida al CO₂ acceder al interior del estoma y arrastre otros gases del interior del estoma como pueda ser principalmente el Nitrógeno (N₂). Dichos fenómenos pueden provocar un impedimento hacia la planta de realizar la fotosíntesis de forma adecuada (falta de CO₂), y un déficit de N₂.

El porcentaje de vapor de agua dentro de la cámara del estoma no es despreciable. En una situación de ebullición dentro del estoma la velocidad de salida de vapor va a ser mayor que la velocidad de entrada del CO₂, el vapor va a salir en forma de chorro y arrastrando con él gases del interior de la cámara, e impidiendo que el CO₂ pueda entrar por difusión a la cámara.

En la mayoría de los casos, el vapor de agua es un gas traza, por lo que su transporte va a ser difusivo, pero si es el gas mayoritario no va a ocurrir la difusión, ya que la evaporación es tan fuerte que expulsa moléculas fuera de la cámara subestomática y produce, como se dijo anteriormente un chorro de vapor cuyo transporte va a ser el dominante.

La oportunidad de contar con una cámara de vacío con control climático y de gases nos invita a realizar de forma experimental algunas de las medidas necesarias para comprobar la variación en los flujos fotosintéticos dependiendo de la presión atmosférica a la que esté sometida la planta. Estas situaciones son extremas a las que nos acercamos para poder discutir los procesos difusivos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Hay varios factores que afectan al funcionamiento de la fotosíntesis; la radiación recibida por el sol, la temperatura, la concentración de CO₂, la disponibilidad de agua, concentración de O₂, etc (*Carril, E. P. U. 2011*). Algunos de estos factores, son responsables directos del intercambio de CO₂ y de vapor de agua entre los estomas y la atmósfera. Dicho intercambio siempre ha estado ligado a procesos de difusión y a procesos que afectan a la difusividad de una planta. Nosotros queremos ver con los experimentos realizados, cómo puede afectar la variación en la altitud (regulada por la presión atmosférica) y en la temperatura en el intercambio de gases. Para esto es fundamental la importancia de la Cámara Hipobárica con control climático AMISTON CHCC21, un sistema con la capacidad de medir dichos intercambios bajo condiciones ambientales controladas (humedad, temperatura, luz, [CO₂] y presión)

Antes de comenzar con el análisis de los datos tomados, vamos a describir la cámara hipobárica, así como la metodología seguida para su uso y los programas empleados para la obtención de datos.

3.1 Componentes del sistema.

El instrumento fabricado por Amiston consta de una cámara hipobárica de marca Memmert modelo VO49COOL que integra un control de presión y temperatura, un sistema analizador de gases modelo Picarro G2301 para las medidas de agua, dióxido de carbono y metano, y un sistema de control climático. Tanto la cámara hipobárica como el analizador Picarro pueden ser utilizados como módulos independientes y tienen su propio manual de uso.

- Cámara Hipobárica Memmert.

La cámara de vacío fabricada por Memmert se encarga de controlar la presión y la temperatura de su interior. En este dispositivo de 0.05 metros cúbicos se introduce el objetivo del que se desean obtener datos sobre su intercambio de gases.

Debajo de la cámara de vacío, se encuentra un módulo auxiliar que contiene una bomba de retirada e inyección de aire. Dicha bomba regula la presión que se haya indicado para la cámara climática extrayendo el aire del interior de ésta para disminuir la presión o introduciendo aire a la misma para aumentar la presión. Para regular la presión, además de contar con el programa informático Atmocontrol (el cual se explicará más adelante), podemos utilizar los controles de la cámara hipobárica que Memmert ha incluido y variar la presión de forma manual durante el tiempo que deseemos (siempre dejando un margen de tiempo considerable si la diferencia entre las presiones introducidas es muy alta).

Durante la toma de datos, el sistema de válvulas inyecta o retira determinados gases (CO_2 , Aire O_2 , aire externo) de la cámara hipobárica para poder alcanzar los parámetros indicados. Esto puede producir variaciones en la presión del interior de la cámara que serán contrarrestadas por la acción de la bomba de presión situada en el módulo inferior del sistema.

- Analizadores CRDS Y PICARRO G2301

El analizador de gases incorporado en el sistema de la cámara hipobárica nos servirá para medir las concentraciones de CO_2 , CH_4 y H_2O en los diferentes experimentos que se realizarán. Este analizador se trata del modelo G2031 de la marca Picarro, y utiliza la espectroscopía vibracional de cavidad (CRDS por sus siglas en inglés *Cavity Ring-Down Spectroscopy*), una técnica espectroscópica de alta sensibilidad. Este analizador nos puede aportar medidas muy precisas de agua en partes por millón, y de metano y dióxido de carbono en partes por billón. Según la página web de Picarro, el analizador de gases tiene una sensibilidad con una desviación insignificante para las ciencias atmosféricas.

Antes de continuar indicando algunas características del analizador de gases utilizado en este experimento, es necesario explicar, aunque sea de una forma muy breve, el funcionamiento general de los analizadores CRDS.

- Analizadores CRDS.

La espectroscopia vibracional de cavidad o CRDS se trata de un método con alta sensibilidad en comparación con otras técnicas de absorción más clásicas. Se trata de una técnica de espectroscopia basada en la absorción láser que permite medir la extinción óptica absoluta a partir de muestras que absorben y dispersan la luz (*Wheeler, M. D., et al., 1998*). La absorción que realiza esta técnica es directa, y se puede realizar con fuentes de luz continua o discontinua (*Berden, G., et al., 2000*).

La técnica que usan los analizadores CRDS consiste en la medición de la tasa de absorción, presentando insensibilidad a fluctuaciones de la intensidad de luz. La técnica CRDS, según *Berden, G., et al., (2000)*, es muy efectiva en fases gaseosas, para absorciones fuertes de componentes en cantidades mínimas, y absorciones débiles en especies muy abundantes.

Un CRDS consta de un láser que ilumina una cavidad óptica, que a su vez tiene dos espejos altamente reflectantes. Una vez se apaga el láser, se mide la intensidad de la luz que decae a $1/e$ de la intensidad inicial por escape de la cavidad, y, durante esa desintegración de la luz, ésta se refleja de un espejo a otro miles de veces, lo que proporciona una longitud de onda efectiva para la extinción (*O'Keefe, A., & Deacon, D. A., 1988*).

Cuando se introduce un material absorbente en la cavidad, la vida media de éste disminuye a medida que la luz rebota, pudiendo absorber la luz por completo o sólo una parte de la intensidad de luz inicial. Los CRDS, miden el tiempo que tarda en decaer la luz desde su intensidad inicial, utilizando ese tiempo para calcular la concentración de la sustancia absorbente (*O'Keefe, A., & Deacon, D. A., 1988*).

² Aire compuesto por Oxígeno (21%) y Nitrógeno (79%).

Una vez el pulso láser queda atrapado en la cavidad de detección, la intensidad de pulso disminuirá en un porcentaje fijo debido a la absorción. La intensidad de luz en la cavidad “ $I(t)$ ” se calcula como una función exponencial del tiempo usando la siguiente expresión:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$$

El principio de la técnica es la medición de una tasa de desintegración en vez de calcular la absorbancia absoluta. τ es la constante de desintegración, es decir, el tiempo que necesita la intensidad de luz en caer a 1/e de la inicial y que depende de la pérdida dentro de la cavidad. La dispersión y la refracción también afectan a la constante de desintegración para una cavidad vacía, así como también afecta la pérdida del espejo.

$$\tau_0 = (n/c) \cdot (l/(1 - R + X))$$

Donde

n es el índice de refracción en la cavidad

c es la velocidad de la luz

l es la longitud de la cavidad

R es la reflectividad del espejo

X tiene en cuenta otras pérdidas ópticas

para x cercano a 0, se asume que $\ln(1 + x) = x$. Siguiendo la ley de Beer-Lambert, la presencia de un absorbente en la cavidad aumentará las pérdidas, y suponiendo una ocupación total de la cavidad por parte de la muestra;

$$\tau = (n/c) \cdot l/(1 - R + X + \alpha l)$$

Donde

α es el coeficiente de absorción en la longitud de onda de resonancia para una concentración específica de la muestra.

La absorbancia “ A ” del analito, se calcula con los tiempos de desintegración a partir de la siguiente expresión:

$$A = n/c \cdot l/2.303 \cdot (1/\tau - 1/\tau_0)$$

Y, por último, a partir de la relación entre los tiempos de desintegración y con la fórmula

$$\tau_0/\tau = 1 + (\alpha l/(1 - R)) = 1 + 2.303 \epsilon l C/(1 - R)$$

se calcula:

ϵ , que es la absortividad molar (cantidad de luz absorbida por la disolución) y

C , que corresponde a la concentración del analito³.

³ https://en.wikipedia.org/wiki/Cavity_ring-down_spectroscopy

- **PICARRO G2301**

El analizador Picarro, incluye su propio programa, que se pone en funcionamiento en cuanto se enciende el sistema completo.

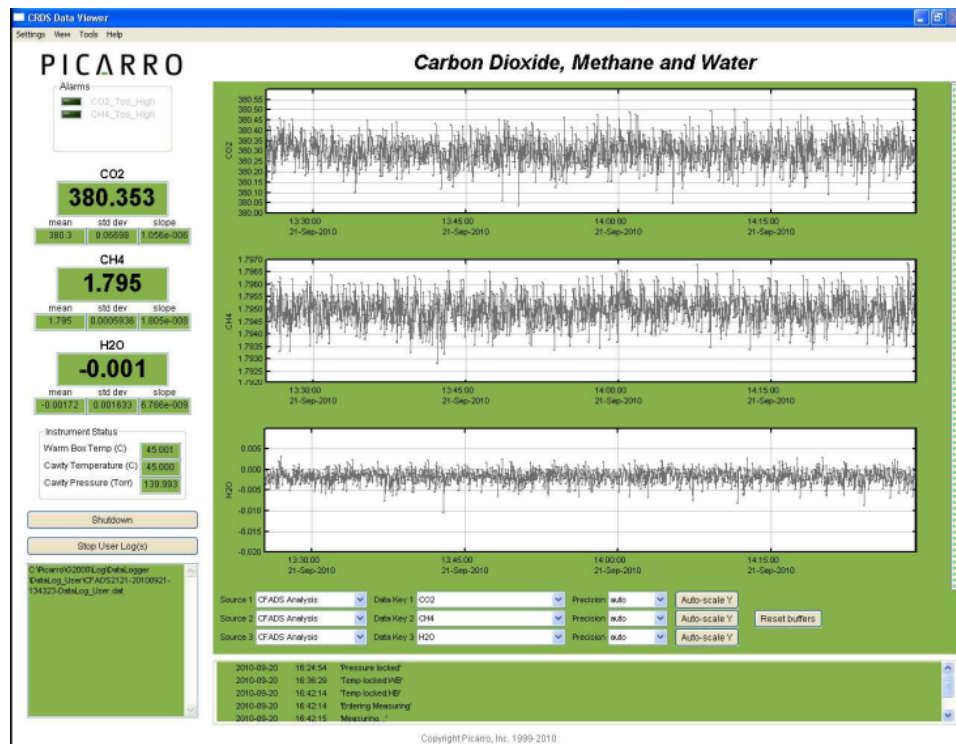


Figura 1. Interfaz del programa del Picarro. Imagen extraída del manual de uso del analizador para CO₂, CH₄, y H₂O G2301⁴.

Dicho programa, nos da las opciones de abrir y cerrar las válvulas del sistema, de establecer alarmas para valores altos o bajos de los parámetros deseados, de hacer un seguimiento gráfico y numérico de la evolución de las concentraciones y porcentajes de los 3 gases que analiza, así como de guardar los datos analizados. En el manual de uso del analizador, se explica con detalle el funcionamiento y desarrollo del modelo de Picarro G2301.

- **Sistema de control climático.**

El sistema de control climático es el encargado de regular las condiciones ambientales deseadas y las concentraciones de gases para el interior de la cámara hipobárica. Consta de los siguientes componentes (*Manual de Usuario y Mantenimiento Cámara Hipobárica con Control Climático Amiston CHCC21*):

- Sistema de humidificación y de secado. Este sistema tiene la función de regular la concentración de vapor de agua en el interior de la cámara.
- Sistema de entrada de gases, que regula las concentraciones de CO₂ y aire cero. Dicho sistema consta de dos botellas conectadas a la entrada de gas auxiliar; una que puede aportar aire cero y otra que aporta CO₂. Los gases se inyectan con una presión de 0.2 bar, y un sistema de válvulas solenoides

⁴<https://static1.squarespace.com/static/5876205e2e69cfaf7c9fe5a4/t/5a5f2f8f24a6940b31cc90b8/1516187566565/G2301-m+Manual+rev+2-11-11.pdf>

regula la entrada. Este sistema está situado encima de la cámara de vacío y conecta los tubos de las bombonas de gases con esta. Además, lleva incorporado un secador de aire con piedras de *sulfato de calcio anhidro* (denominado Drierite de manera comercial) en su interior, un compuesto utilizado para la desecación.

- Sistema de luz fotosintética con regulación de intensidad.
- Ordenador de control donde se recogen los datos. Mediante este ordenador, controlamos la presión y la temperatura de la cámara utilizando el programa Atmocontrol. Con otro programa llamado Amicontrol definimos la humedad y el CO₂ deseados y registramos los resultados de las medidas realizadas por el analizador de espectroscopia láser (Picarro G2301).
- Cámara.



Figura 2. Imagen de la Cámara Hipobárica con Control Climático Amiston CHCC21.

- ATMOCONTROL.

Atmocontrol es un programa desarrollado por Memmert para programar y documentar los procesos en los equipos fabricados por esta misma compañía. Este software tiene la capacidad de programar ciertos procesos climáticos dentro de la cámara hipobárica de una manera intuitiva y directa. En la página web de la compañía Memmert, se explica con más detalle el funcionamiento y las características de este programa⁵.

En nuestro estudio, hemos usado el programa Atmocontrol para controlar la temperatura y la presión en el interior de la cámara, aunque también se pueden modificar otros parámetros como la humedad relativa ó la intensidad de la luz.

⁵ <https://www.memmert.com/es/por-que-memmert/lideres-en-innovacion/atmocontrol/>

No vamos a hacer hincapié en el uso exacto del programa, ya que, en nuestro caso, no hemos usado todas las opciones que ofrece Atmocontrol. Sin embargo, vamos a explicar de una manera muy breve el protocolo usado para programar los cambios de temperatura y de presión, así como los periodos de estabilidad de ciertos valores de dichos parámetros.



Figura 3. Interfaz del programa Atmocontrol.

Para incrementos/decrementos de temperatura ó de presión, se utilizan las rampas de subida, en las cuales podemos indicar un cambio (aumento ó disminución) del parámetro en un determinado tiempo, y, durante ese periodo, el programa, conectado con la cámara, aumentará o disminuirá el parámetro a los valores indicados por el usuario. A la hora de mantener estable la temperatura o la presión, tenemos que, después de la rampa (si la presión o temperatura es diferente a la inicial), introducir un periodo de tiempo en el que queramos mantener estable el parámetro (en la parte resultados mostraremos los pasos seguidos de cambios de temperatura y presión).

Una vez que termina el experimento, y los datos hayan sido guardados, vamos a obtener un archivo de hoja de cálculo con los datos recogidos por Atmocontrol.

Date	Temp	Shelf 1	Alarm	Alarm	Alarm	Shelf2	Shelf 3	Shelf 4	Vac.	Vac.	Al. Vac.	Al. Vac.	Inert
	Set		Low	High	T. Real				Set		Low	High	Gas
	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(mbar)	(mbar)	(mbar)	(mbar)	(0/1)

Tabla 1. Datos guardados por Atmocontrol.

Donde:

Date es fecha y hora.

Temp. Set es el valor nominal de la temperatura.

Shelf 1 es el valor nominal de temperatura de la 1ª placa calefactora.

Alarm Low es el valor de alarma de temperatura inferior

Alarm High es el valor de alarma de temperatura superior

Alarm T. Real es el valor real de temperatura medida realmente, o en el caso de dispositivos de vacío, temperatura de la 2ª placa calefactora.

Shelf 2 es el valor de la 2ª placa calefactora

Shelf 3 es el valor de la 3ª placa calefactora

Shelf 4 es el valor de la 4ª placa calefactora

Vac. Set valor nominal del vacío

Vac. valor de medición de vacío

Vac. Low valor de la alarma inferior para vacío

Vac. High valor de la alarma superior para vacío

Inert Gas es el gas utilizado actualmente, donde 0=aire fresco y 1=gas inerte.

- AMICONTROL

Para que el usuario pueda manipular a su gusto las concentraciones de gases en el interior de la cámara, se utiliza la interfaz Amicontrol, que, además, permite observar los datos de agua en porcentaje además de los datos de dióxido de carbono y de metano en partes por millón (ppm) en tiempo real mediante gráficas en la zona central de la interfaz del programa. Para la visualización de estas gráficas, el programa da las opciones de mostrar los datos correspondientes a todo el experimento, o mostrar los datos más recientes.

Dentro del programa Amicontrol, encontramos una ventana debajo de las gráficas para visualizar los valores exactos de las concentraciones, además, al lado de ésta, hay otra ventana donde se pueden indicar observaciones del experimento que se mostrarán en los datos guardados en un fichero de hoja de cálculo en la casilla correspondiente al momento en el que se hayan apuntado.

En la parte izquierda de la pantalla, se encuentra una pestaña para indicar la temperatura y la presión (que sólo sirven para que esos valores aparezcan en el fichero donde se graban los datos, ya que estos parámetros los controla Atmocontrol). Debajo de dicha pestaña, hay otra para el H₂O y el CO₂, donde, ahora sí, se pueden escribir los valores de concentraciones que se quieren alcanzar en el interior de la cámara. El programa, una vez las concentraciones deseadas hayan sido alcanzadas, da la posibilidad de mantenerlas de manera indefinida mediante el control por válvulas. En nuestro estudio, una vez alcanzadas las concentraciones de CO₂ y H₂O deseadas, cerramos el control por válvulas, para medir la variación de la cantidad de CO₂ y agua en el interior de la cámara.

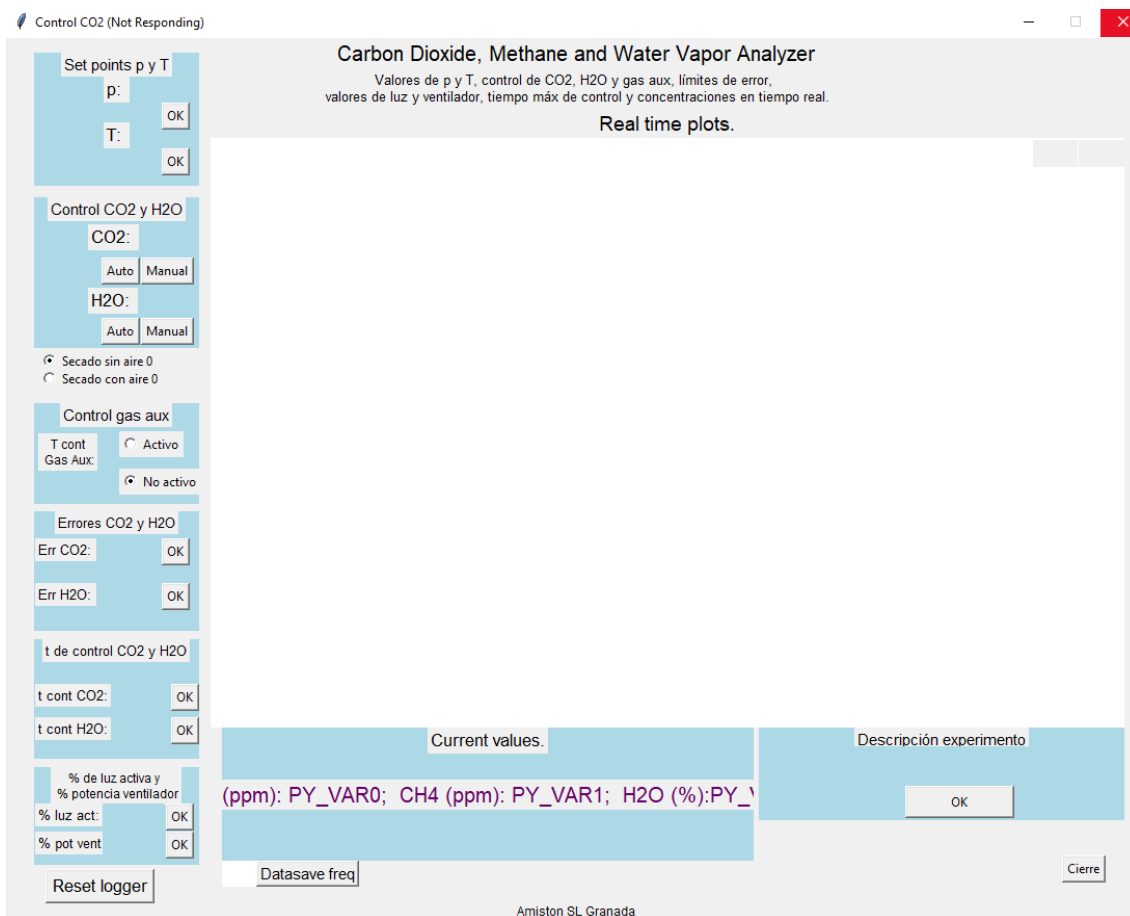


Figura 4. Interfaz del programa AmiControl.

Para el apagado de la cámara, tenemos que realizar el secado de su interior. Para esto, se puede utilizar el circuito de secado que usa la Drierita que se encuentra en un tubo de plástico en el sistema de válvulas, podemos conectar otro tubo con drierita en el interior de la cámara, o bien, se puede utilizar aire 0. Esto también se activa desde el programa Amicontrol, que, en nuestro caso, lo hemos llevado a cabo disminuyendo el % de H₂O hasta 0-0.3.

Otras opciones que ofrece el programa son indicar el porcentaje de potencia de luz y de ventilador, los tiempos de control de CO₂ y H₂O, que vienen definidos a 45 minutos, a partir de los cuales, el programa se detendrá y dejará de controlar la concentración. Por lo que habría que iniciar el programa de nuevo si no se han alcanzado las concentraciones deseadas.

En el programa, podemos indicar la frecuencia con la que se guardan en la pestaña *Datasave freq* (por defecto, la frecuencia de guardado de amicontrol es de 1.15 segundos). Por último, para guardar los datos, el programa presenta la opción de hacerlo cada determinado tiempo con la etiqueta de *Reset logger*, o de guardarlos todos juntos una vez cerremos el programa.

Los datos de Amicontrol se guardan en una hoja de cálculo.

Fecha	Hora	CO2	CH4	H2O	Err CO2	Err H2O	P	T	Luz	Ventilador	Comentario
		ppm	ppm	%	ppm	%	mbar	K	%	%	

Tabla 2. Datos recogidos por el programa AmiControl.

3.2 Diagrama de la cámara hipobárica.



Figura 5. Diagrama de la cámara hipobárica.

En la anterior figura, se puede observar la posición de cada una de las partes que componen la Cámara Hipobárica con la que hemos trabajado, se puede comparar con la *Figura 2* para identificar cada componente en la imagen real.

3.3 Encendido y apagado de la cámara.

Para poner en funcionamiento la cámara hipobárica, tenemos que seguir un protocolo desarrollado por los creadores de ésta. A continuación, se van a describir los pasos a seguir para el encendido y apagado del sistema completo.

Encendido:

1. Abrir la puerta de la cámara.
2. Encender la regleta que proporciona corriente a todo el equipo.
3. Encender la batería auxiliar (SAI).
4. Encender la bomba del Picarro y esperar 1 minuto.
5. Encender el Picarro y esperar 5 minutos.
6. Abrir la botella de aire 0 (0.2 bar).
7. Abrir la botella de CO₂ (0.2 bar).
8. Si hay una botella auxiliar de metano, oxígeno, etc, se debe encender en este paso.
9. Encender la cámara y su sistema de válvulas; pulsamos tanto el interruptor de la cámara como el interruptor del módulo auxiliar

10. Encender los ordenadores.
11. El Picarro ya está optimizado para medir los valores ambientales.

Apagado:

1. Llevar la presión de la cámara climática a la presión ambiental
2. Llevar la temperatura de la cámara a temperatura ambiental
3. Cerrar botellas de CO₂ y aire cero.
4. Apagar la bomba de la cámara.
5. Guardar los datos de Atmocontrol.
6. Cerrar los programas AmiControl y Atmocontrol.
7. Bajar la concentración de CO₂ a unos 400 ppm
8. Bajar el contenido de agua a < 0.3%. Esto se puede hacer a través de la dilución de H₂O en el interior de la cámara mediante la inyección de aire cero, conectando al sistema de secado un tubo con *sulfato de calcio anhidro* en su interior, un compuesto utilizado para la desecación, o utilizando el propio desecante presente en el sistema de válvulas.
9. Apagar el programa de ordenador del Picarro.
10. Esperar a que la presión interna del Picarro sea como la atmosférica, y apagarlo.
11. Apagar la bomba del Picarro.
12. Apagar el sistema de válvulas de la cámara.
13. Apagar batería auxiliar.
14. Apagar regleta.

3.4 Descripción de los experimentos.

Estos estudios se han llevado a cabo en el Instituto Interuniversitario de Investigación del Sistema Tierra en Andalucía (IISTA-CEAMA) situado en Granada.

Podemos dividir este estudio en dos partes; la primera tiene la finalidad de ver las posibles pérdidas de CO₂ en el interior de la cámara y estimar los errores que pueda tener para luego aplicarlos a la segunda parte del ensayo, que consiste en medir el intercambio de H₂O y CO₂ en plantas de tomate aplicando una variación de la presión, de la temperatura, y del CO₂ ambiental según el caso.

- Toma de datos para evaluar la estanqueidad de la cámara (Medidas en cámara vacía).

Antes de realizar el primer experimento para comprobar las variaciones en las pérdidas de CO₂ respecto a los resultados finales y poder calcular los errores que vamos a tener en la medición de flujos fotosintéticos, realizamos una puesta a punto del sistema de válvulas de nuestro instrumento revisando todas las mangueras y bocas del circuito para asegurarnos que no se pueda dar ninguna pérdida que pueda alterar los resultados.

Para comenzar la toma de datos de la cámara hipobárica, se procede al encendido de todo el sistema (resumido en el apartado interior). Tras esto, y con el programa Atmocontrol, se definen los parámetros que consideramos importantes para realizar el estudio con su tiempo correspondiente. A continuación, indicamos las rampas de Presión y Temperatura deseadas para la cámara hipobárica. Es preciso indicar que debemos dejar programadas todas las rampas (variaciones de temperatura y/o

presión) en AtmoControl al principio del experimento, porque una vez que este arranque, no se pueden modificar. Con el programa AmiControl sí podemos modificar sus parámetros durante el desarrollo del experimento.

- Encendemos el sistema completo y abrimos AtmoControl.
- Mantenemos la temperatura constante a 25°C.
- Creamos una rampa de 1100 mb a 950 mb.
- Mantenemos constantes los 950 mb durante 50 minutos.
- Comenzamos la subida de CO₂ hasta ± 1000 ppm.

Aquí se nos plantea el primer problema, ya que, una vez pasado el tiempo de los 950 mb, el CO₂ no había alcanzado su pico de subida y no podíamos quitar el aporte para observar sus fugas, por lo que no vamos a poder utilizar los datos a 950 mb para esta parte del estudio.

- Rampa de 950 mb a 800 mb durante 10 minutos.
- Mantenemos constante la presión a 800 mb durante 45 minutos.
- Rampa de 800 mb a 700 mb durante 10 minutos.
- Mantenemos constante la presión a 700 mb durante 45 minutos.
- Rampa de 700 mb a 600 mb durante 10 minutos.
- Mantenemos constante la presión a 600 mb durante 45 minutos.
- Rampa de 600 mb a 960 mb durante 15 minutos.
- Bajamos el CO₂ a 400 ppm y el % de agua a ± 0.0 .
- Guardamos los datos de AtmoControl, cerramos Amicontrol y el programa del Picarro, y apagamos el sistema.

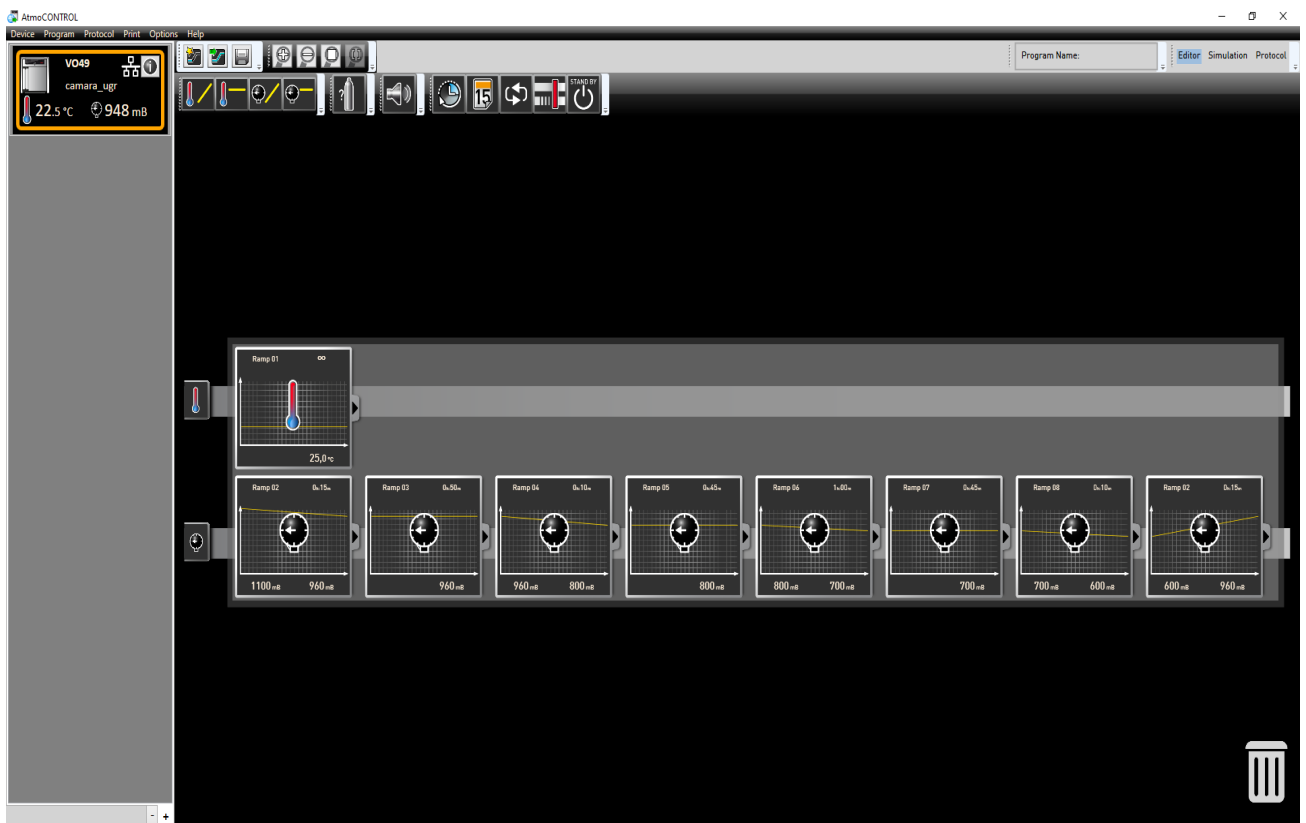


Figura 6. Rampas programadas para la toma de datos del escape de gases en la cámara hipobárica sin fugas.

- Medición en maceta sin planta.

A la hora de tomar las medidas del intercambio de gases de nuestra planta, debemos tener en cuenta cualquier factor que haya en el interior de la cámara que pueda alterar los resultados.

Es por esto que se ha decidido realizar medidas sólo con el suelo, para observar la emisión o absorción de gases por parte de éste y los microorganismos que puedan habitar en él y poder eliminar estos datos de los flujos finales.

Para realizar esta toma de datos se ha preparado un tarro de vidrio con un recipiente dentro que sólo contenga tierra en su interior.



Figura 7. Tarro con suelo en su interior preparado para llevar a cabo la toma de datos.

Esta preparación debe de sellarse muy bien con masilla ó *BluTack* y asegurar su aislamiento envolviendo el tarro en *film* transparente para imitar los pequeños huecos que pongan en contacto el suelo con el ambiente del interior de la cámara que dejaremos en los experimentos finales con la planta dentro del tarro. De esta manera, la emisión/absorción de gases por parte del suelo será la misma en ambos experimentos y podremos reducir los errores.

Tras esto, introducimos el recipiente en la cámara climática y programamos las siguientes variaciones de presión y temperatura:

Rampa 0: 25°C cte 07h30min

Rampa 2: 1100 ↘ 600 mb durante 30 minutos
Rampa 3: 600 → 600 mb durante 90 minutos
Rampa 4: 600 ↗ 750 mb durante 20 minutos
Rampa 5: 750 → 750 mb durante 90 minutos
Rampa 6: 750 ↗ 800 mb durante 20 minutos
Rampa 7: 800 → 800 mb durante 90 minutos
Rampa 8: 800 ↗ 950 mb durante 20 minutos
Rampa 9: 950 → 950 mb durante 90 minutos

La toma de datos se repetirá 4 veces por presión; siendo cada medida de 15 minutos (excepto para 600 mb que fueron medidas de 11 minutos), dejando 10 entre cada una para el restablecimiento de la concentración de CO₂ en sus valores iniciales.

- Mediciones con planta.

Antes de introducir la planta de tomate en la cámara hipobárica y comenzar a registrar datos de fotosíntesis y transpiración, debemos asegurarnos de que las variaciones en concentraciones de CO₂ y H₂O se deban principalmente al intercambio de gases que se produce en los estomas de las hojas (tendremos en cuenta los errores de la cámara y la actividad del suelo). Para esto, vamos a introducir la maceta en un tarro de vidrio, le pondremos agua hasta 100 ml para que aguante toda la noche durante la bajada de presión y todo el día durante la toma de datos. El tapón del tarro presenta un agujero por el que puede pasar el tallo y las hojas, para que estas sean las únicas superficies de la planta y de la maceta que estén en contacto directo con el ambiente de la cámara. Tras esto, se procede a sellar con masilla adhesiva todas las posibles aperturas que pueda presentar el tapón del tarro, y se precinta con papel film.



Figura 8: Planta de tomate preparada para su introducción en la cámara hipobárica.

Para evitar procesos de cavitación⁶ en el xilema de las plantas, se ha visto oportuno a realizar una bajada progresiva de la presión la noche antes de la toma de datos, siendo las rampas de presión utilizadas en AtmoControl las siguientes:

- Rampa 1: 950 ↘ 900 mb durante 120 minutos
- Rampa 2: 900 ↘ 850 mb durante 100 minutos
- Rampa 3: 850 ↘ 800 mb durante 100 minutos
- Rampa 4: 800 ↘ 750 mb durante 100 minutos
- Rampa 5: 750 ↘ 700 mb durante 100 minutos
- Rampa 6: 700 ↘ 650 mb durante 100 minutos
- Rampa 7: 650 ↘ 600 mb durante 100 minutos

Tras esta disminución de presión durante las horas nocturnas, se procede a aportar luz a la planta para que comience a hacer la fotosíntesis y podamos medir la absorción de CO₂ partiendo de los siguientes parámetros:

Se decidió disminuir la temperatura de 20°C a 10°C durante una hora, dejando la cámara a 10°C durante toda la noche, para luego hacer una subida progresiva hasta 25°C para el cambio de la noche al día, y dejando los 25°C constantes durante toda la toma de datos.

⁶ La cavitación es un fenómeno que ocurre en el xilema de las plantas debido a varios factores como el estrés hídrico o la variación de presión. Se trata de la formación de burbujas o cavidades de vapor en las paredes del xilema que limitan el agua contenida, lo que puede alterar el flujo y ser perjudicial para la planta (Hugalde, I. P., 2011; Calderón, J., et al., 2019).

Día 1 (21/06/2022)	Planta expuesta a T = 25°C, [CO ₂] = 415 ppm y VPD = 20mb
Día 2 (22/06/2022)	Planta expuesta a T = 25°C, [CO ₂] = 200 ppm y VPD = 20mb

Tabla 3. Cronograma de los experimentos llevados a cabo.

El tiempo y la variación en las presiones durante el día fueron los mismos para los 4 experimentos, variando únicamente las concentraciones de CO₂ y las temperaturas. La toma de datos se realizó 4 veces cada 10 minutos por presión, dejando 10 minutos tras cada toma para la subida de CO₂ a 415 ó 200 ppm de CO₂ según el caso.

El hecho de someter las plantas a 415 ppm de CO₂ es debido a que queremos ver el comportamiento de estas con unas concentraciones de este gas similares al promedio atmosférico para el año 2021. El hecho de someterlas también a 200 ppm es simplemente por ver cómo varía la actividad de la planta si reducimos el CO₂.

Mediante el programa Amicontrol se van a dejar valores fijos de CO₂ y H₂O para alcanzar la estabilidad de los parámetros. A continuación, quitaremos el aporte de dióxido de carbono y agua para tomar los datos de la variación de ambos parámetros producidos por la planta dentro de la cámara.

El tiempo de cada presión para la toma de datos es el siguiente:

- Rampa 1: 600 → 600 mb durante 160 minutos (esta presión es la más duradera ya que necesitamos una hora para alcanzar la temperatura de 25°C y compensar ese tiempo).
- Rampa 2: 600 ↗ 750 mb durante 20 minutos.
- Rampa 3: 750 → 750 mb durante 100 minutos.
- Rampa 4: 750 ↗ 800 mb durante 20 minutos.
- Rampa 5: 800 → 800 mb durante 100 minutos.
- Rampa 6: 800 ↗ 950 mb durante 20 minutos.
- Rampa 7: 950 → 950 mb durante 100 minutos.

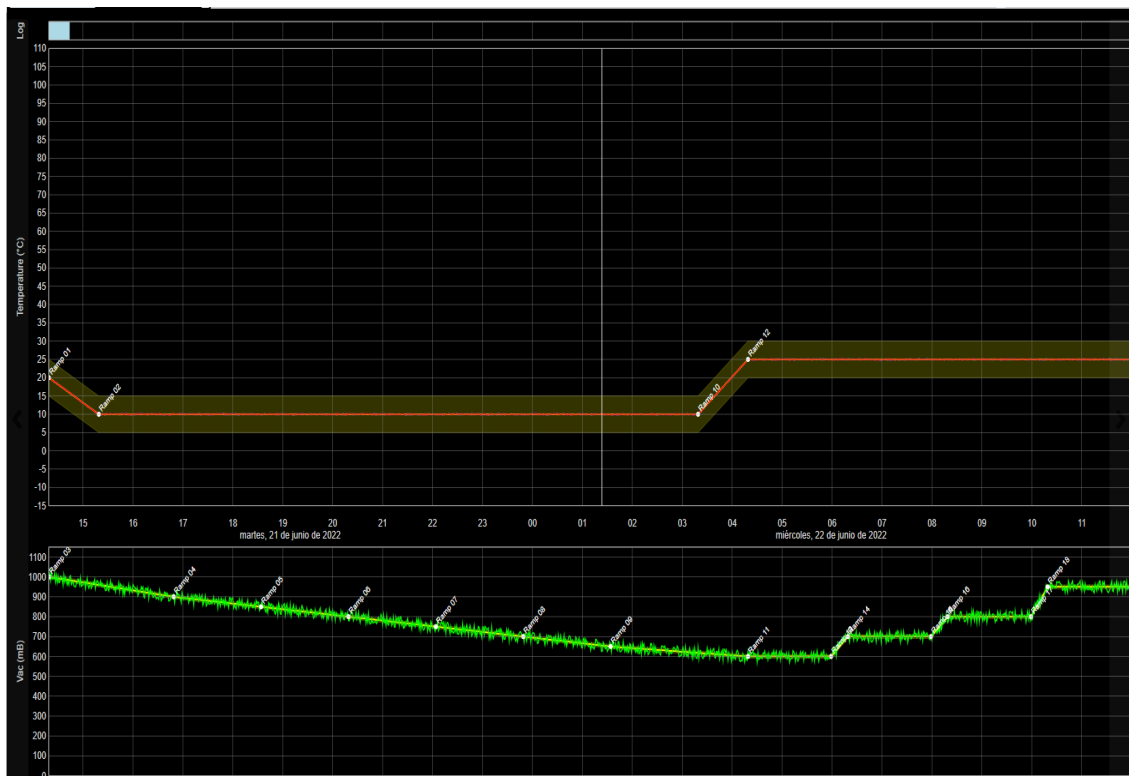


Figura 9: Visualización a través del programa ATMOCONTROL de las rampas de temperatura (roja) y presión (verde) durante un día entero de toma de datos. La temperatura se mantuvo estable a 10°C durante la noche y a 25°C durante el día.

4. RESULTADOS Y TRATAMIENTO DE DATOS.

4.1 TRATAMIENTO DE DATOS.

Para el tratamiento de datos se han utilizado los archivos generados directamente del programa Amicontrol. Estos datos han sido ordenados respecto al tiempo que toma el programa en realizar cada medida (varía entre 3 y 5 segundos), calculando el tiempo total en segundos para después dividirlo por el número de datos de esa medida y agrupar en el eje X desde 0 a N segundos (el tiempo que dure la medida) y el eje y las concentraciones correspondientes.

Tras esto, se graficó cada serie de datos y se calculó una línea de tendencia para obtener la pendiente de las rectas que se corresponde con la variación de la cantidad de gas por segundo.

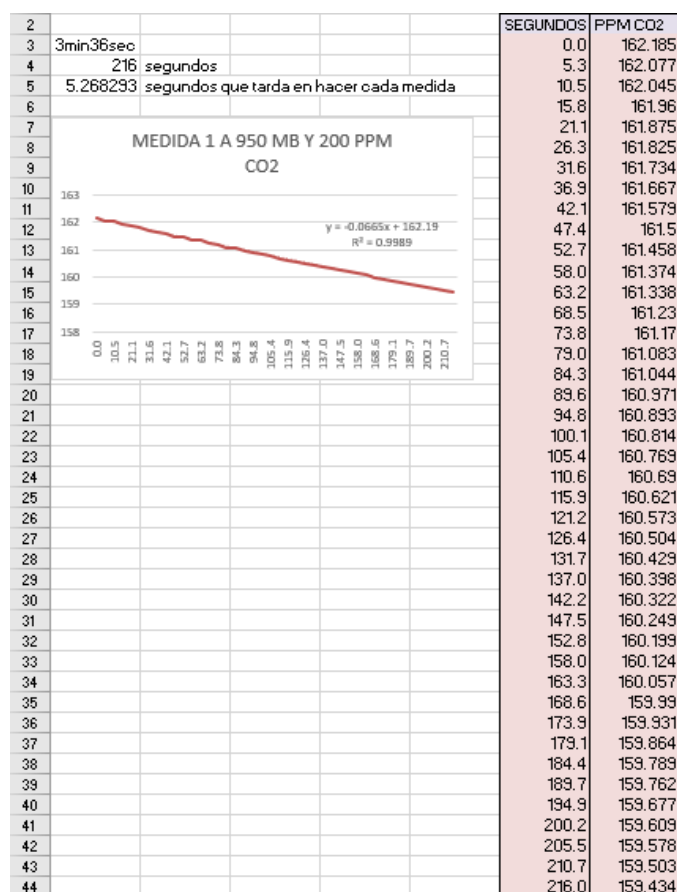


Figura 10. Ejemplo de hoja de cálculo en la que se muestran los datos usados para realizar las gráficas de variación de $[CO_2]$ y poder calcular la pendiente.

4.1.1 Cálculo del flujo neto de CO_2 .

Para calcular el flujo de carbono hemos tomado como referencia el artículo titulado “Analysing uncertainties in the calculation of fluxes using whole-plant chambers: random and systematic errors” (Pérez-Priego, O. et al., 2015) y la fórmula utilizada ha sido la siguiente:

$$\text{Flujo neto} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{segundo}} \right) = \frac{dC}{dt} (t) * \frac{PV}{RT}$$

Donde:

dC/dt representa la variación de la concentración de CO_2 en el tiempo (la pendiente de cada gráfica)

P es la presión en Pascales (pa)

V es el volumen de la cámara de climática en metros cúbicos (m^3)

T es la temperatura en Kelvin (K)

y R es la constante de los gases ideales ($8.314 \text{ pa} \cdot m^3 / \text{mol} \cdot \text{Kelvin}$).

Las unidades finales de la ecuación anterior son micromoles/segundo ($\mu\text{mol/s}$), y, con nuestros datos, la fórmula se quedaría de esta manera, en la que sólo nos falta introducir el término dC/dt :

$$\text{Flujo neto} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{segundo}} \right) = \frac{dC}{dt} (t) * \frac{(600 \text{ ó } 750 \text{ u } 800 \text{ ó } 950)10^2 * 0.049}{8.314 * 298.15}$$

Como nuestro instrumento nos mide las variaciones de gases que se producen en su interior, el flujo calculado es por unidad de planta

4.1.2 Cálculo del flujo de H_2O .

El analizador de gases nos facilita las variaciones de vapor de agua en porcentaje, y al calcular la pendiente las unidades que nos quedan son de %/segundo, por lo que necesitamos pasar este flujo de porcentaje a moles/segundo para más tarde convertirlo en micromoles/segundo.

En primer lugar, usamos la ley de los gases ideales, donde se puede hallar el número de moles a partir del volumen, la presión, la constante de los gases y la temperatura;

$$n = \frac{PV}{RT}$$

A continuación, multiplicamos la pendiente de la gráfica en porcentaje/segundo por el número de moles que hemos calculado en el paso anterior y lo dividimos entre cien para calcular el número de moles que corresponden a cada porcentaje.

Una vez terminado estos pasos, se nos queda un resultado de flujo de agua en moles/segundo, que posteriormente pasaremos a $\mu\text{mol/s}$ y estos serán los datos definitivos que analizaremos más adelante.

4.2 RESULTADOS.

En las gráficas que se podrán ver a continuación están representadas las variaciones de la concentración de CO_2 respecto al tiempo. Las medidas tienen una duración diferente según la presión debido a que ha habido que descartar datos por interferencias (entrada de CO_2 , aire externo o aire cero en la cámara), el número de repeticiones de medidas han sido 1 para la comprobación de fugas, y 4 para los experimentos restantes (en algunos casos las repeticiones aceptadas en el estudio han sido de 3 ó 2 debido a la invalidez de algunas me

RESULTADOS GRÁFICOS					
PRESIÓN		600 mb	750 mb	800 mb	950mb
PRUEBA DE ERRORES	CO ₂				-
	H ₂ O				-
DATOS SIN PLANTA	CO ₂				
	H ₂ O				
200 PPM	CO ₂				

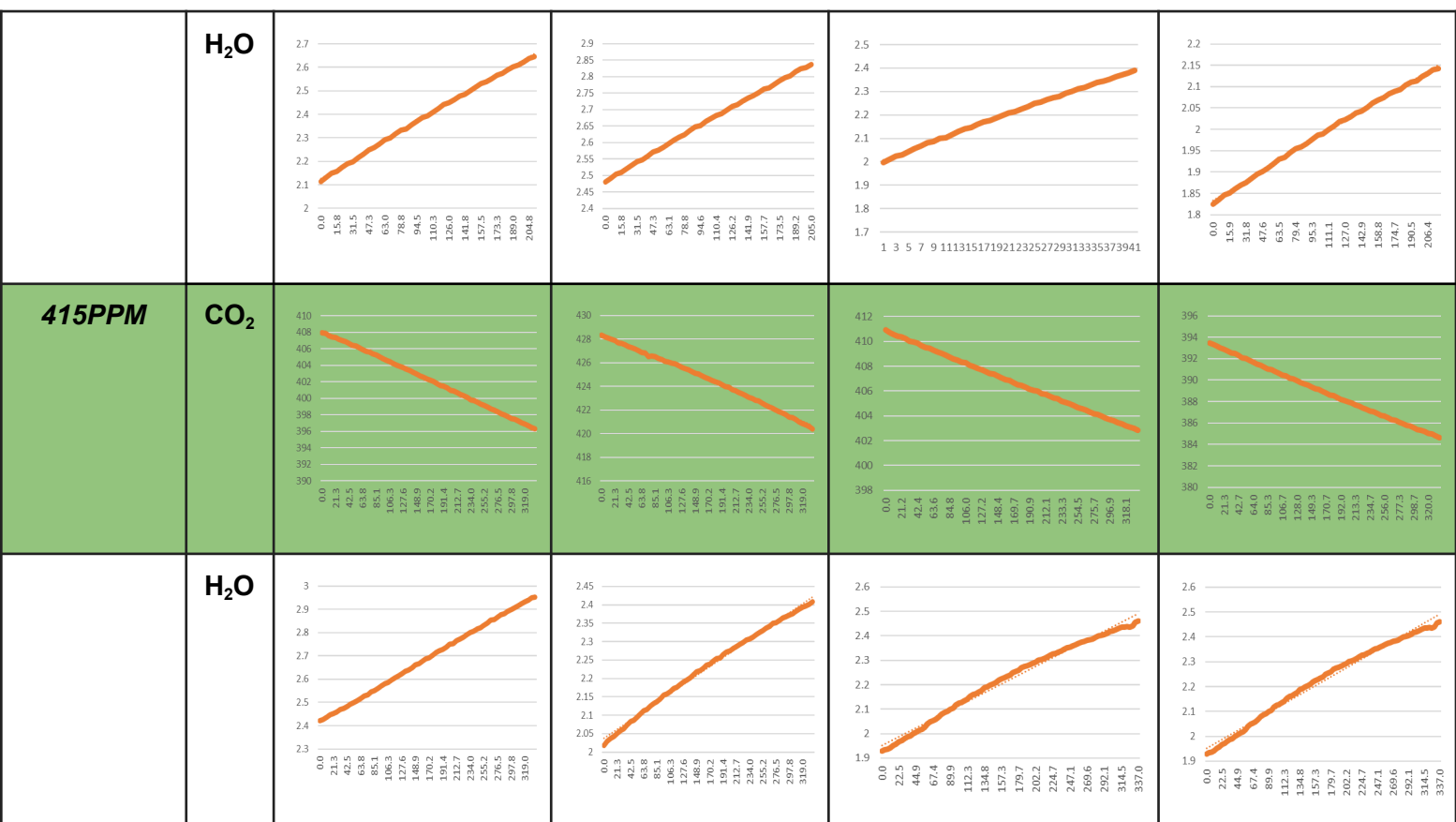


Tabla 4. Cuadro de gráficos correspondientes a los resultados de las medidas tomadas.

En la tabla anterior se aprecia la tendencia del CO₂ y el H₂O en los resultados finales para cada presión en cada grupo de experimentos. La tendencia que sigue el CO₂ y el agua es la misma dentro de cada grupo de medidas (excepto para los datos que no hemos considerado válidos), por esto, hemos puesto un ejemplo cogiendo una de las 4 medidas hechas en cada experimento para representar estas tendencias visualmente.

Las unidades de las pendientes de dióxido de carbono en las gráficas son de micromoles/segundo, por otro lado, las concentraciones de agua en las gráficas vienen dadas en porcentaje.

CÓMPUTO DE RESULTADOS

PRESIÓN		600 mb ($\mu\text{mol/s}$)	Desv.	750 mb ($\mu\text{mol/s}$)	Desv.	800 mb ($\mu\text{mol/s}$)	Desv.	950mb ($\mu\text{mol/s}$)	Desv.
PRUEBA DE ERRORES	CO ₂	-0.0015	⁷	-0.0023	-	-0.058	-	-	-
	H ₂ O	0.95	-	0.36	-	1.11	-	-	-
DATOS SIN PLANTA	CO ₂	0.0033	0.0013	0.0028	0.00036	0.0029	0.00064	-0.0019	0.00013
	H ₂ O	4.14	0.59	5.43	0.70	7.89	0	7.03	0.64
200 PPM	CO ₂	-0.14	0.026	-0.15	0.021	-0.096	0.011	-0.17	0.047
	H ₂ O	129.3	21.93	147.11	16.76	136.3	19.52	166.95	32.26
415PPM	CO ₂	-0.2116	0.011	-0.2183	0.029	-0.24	0.026	-0.28	0.029
	H ₂ O	92.9	8.88	85.84	11.9	84	31.35	61.86	10.7

Tabla 5. Resultados de las medidas de flujo en $\mu\text{mol/s}$

En la *Tabla 5* observamos los datos numéricos de los flujos de CO₂ y H₂O calculados a partir de los datos obtenidos del Picarro siguiendo los métodos explicados en el apartado previo.

Debido a que en los primeros experimentos para medir los errores de la cámara sólo realizamos una repetición de la toma de datos para cada presión, no hemos podido obtener una desviación típica, por lo que no ha sido posible calcular el error de estos datos.

Los resultados correspondientes a las medidas con la cámara vacía presentan una línea de tendencia negativa para el caso del CO₂, cuyos valores son cercanos a cero, por lo que la disminución de la concentración de este gas es prácticamente nula si no hay ningún factor en el interior que altere la composición del aire. En el caso del vapor

⁷ Debido a que en los primeros experimentos para medir los errores de la cámara sólo realizamos una repetición de la toma de datos para cada presión, no hemos podido obtener una desviación típica, por lo que no ha sido posible calcular el error de estos datos.

agua vemos una tendencia positiva, es decir, el porcentaje de H_2O aumenta respecto al tiempo. Los valores de aumento de la cantidad de agua con la cámara vacía, son notablemente menores en comparación a los valores que obtenemos cuando introducimos una planta en su interior.

En cuanto se introduce un factor que tenga influencia en el aire del interior de la cámara, observamos un aumento en la variación de la cantidad de agua. Siguiendo la tendencia positiva de las pruebas con la cámara vacía, cuando introducimos suelo sin planta podemos ver que los valores del porcentaje de agua aumentan. Por otro lado, los datos del suelo sin planta registrados por el Picarro para el CO_2 siguen, al contrario que los anteriores, una tendencia positiva (excepto los datos de 950 mb). Aún así, siguen siendo datos cercanos a cero.

En último lugar, tenemos los datos registrados esta vez con la planta de tomate ya introducida en el interior de la cámara. En ambos casos (200 ppm y 415 ppm de CO_2) observamos una disminución del CO_2 respecto al tiempo en todas las presiones debido a la absorción de dióxido de carbono por parte de los estomas. Los valores medios de CO_2 representados en la Tabla 5 para estos casos muestran una tendencia positiva respecto a las presiones (conforme aumenta la presión aumenta la absorción de CO_2), excepto en el caso de 800 mb a 200 ppm cuyo valor de flujo de CO_2 es demasiado bajo y rompe esta tendencia.

La tendencia esperada en el agua respecto a la presión es la contraria a la esperada con el CO_2 (conforme aumenta la presión disminuye la salida de agua). En los datos correspondientes a 200 ppm observamos un aumento del flujo de agua respecto a la presión (exceptuando de nuevo los datos de 800 mb), y en los datos obtenidos con la planta de tomate expuesta a 415 ppm de CO_2 sí se observa la tendencia esperada, disminuyendo el flujo de agua que sale de la planta conforme aumentamos la presión.

5. DISCUSIONES.

En cuanto a las discusiones del funcionamiento de la cámara hipóbarica no tenemos una gran cantidad de referencias debido a que es un modelo que sólo está presente en la Universidad de Granada. Por esto, compararemos su capacidad de analizar y medir el intercambio de gases con otro tipo de cámaras capaces de recoger datos del intercambio de gases en plantas.

La precisión de nuestra cámara es bastante alta, ya que tiene la capacidad de dar datos de agua en partes por millón (aunque nuestra configuración fuera en porcentajes) y de partes por billón en los gases externos como el CO_2 ó el CH_4 . En comparación con cámaras utilizadas en otros ensayos como el representado en el artículo "Free-air CO_2 enrichment (FACE) using pure CO_2 injection: system description" de Okada, M., Lieffering, Me., et al (2001) en el que utilizan cámaras manuales con analizadores de infrarrojo (IRGA) de CO_2 , observamos que las muestras se monitorean cada segundo, tiempo menor al proporcionado por nuestro analizador (entre 3 y 5 segundos).

Por otro lado, el Picarro posee una gran precisión a la hora de recoger datos, como se dijo en el apartado en el que describimos el analizador de gases, pudiendo medir en partes por billón el CO_2 y en partes por millón el H_2O . Tomando como referencia a Zheng, X., et al., 2008, en el que podemos leer que la precisión de sus analizadores es de aproximadamente 0.5% (unos 5000 ppm), entendemos que gozamos de un

analizador de gases que nos proporciona datos muy exactos. En otros artículos, como por ejemplo el titulado “A whole-plant chamber system for parallel gas exchange measurements of Arabidopsis and other herbaceous species” de Katharina Kölling y compañía, podemos encontrar analizadores IRGA con precisiones similares a las que nos da nuestro Picarro.

En el artículo que acabamos de comentar en el que se mide el intercambio de gases en varias especies herbáceas con un mes de crecimiento, se dan valores máximos de 8.4 micromoles/segundo en la asimilación de CO₂ en condiciones de luz intensa. Otros estudios muestran valores un poco más bajos, pero sin variar mucho. Este es el caso del estudio de Óscar Pérez-Priego, et. al., de 2015 en el que usan analizadores IRGA en cámaras para medir el intercambio de gases de plantas enteras con unos flujos calculados de entre 2.75 y 0.6 micromoles/segundo. En nuestro caso observamos unos valores mucho más pequeños como se mostraba en la tabla de resultados, en torno a 0.2 micromoles/segundo. Que los flujos obtenidos sean tan pequeños se puede deber a varios factores, como limitar el CO₂ en el caso de 200 ppm, la poca presión a la que se sometió las plantas y la dificultad para su posterior adaptación a otras presiones, el tamaño de la planta, ya que nuestra planta era muy pequeña y no gozaba de una gran cantidad de hojas, o de que la planta no recibiese la luz de lleno, ya que ésta sólo la alumbraba a través de la puerta con un foco que se puso aparte.

6. CONCLUSIONES

En este estudio se ha realizado una presentación de la Cámara Hipobárica con Control Climático Amiston CHCC21 y sus posibilidades y capacidades a la hora de obtener datos precisos del intercambio de gases de una planta de tomate.

En primer lugar, vemos conveniente indicar que el instrumento usado para este estudio se trata de una cámara de control climático asociada a un analizador de gases y a un sistema de válvulas, creando un complejo de instrumentos innovador y no usual a la hora de adquirir información acerca del intercambio de gases en plantas. Dicho esto, podemos admitir, observando los resultados, que se trata de una cámara confiable y precisa. En un futuro, se comprobará de una forma más exhaustiva su funcionamiento con otro tipo de plantas realizando más medidas con más repeticiones de cada una, además de poder introducir otro gas más al sistema de válvulas para su medición o para ver cómo puede afectar a una planta (como puede ser óxido nitroso (N₂O)).

El trabajo implicado en el uso de la cámara hipobárica no se ha centrado únicamente en observar el comportamiento de la planta de tomate variando la presión total, si no que ha conllevado una serie de pruebas y estudios para entender el instrumento. De hecho, la mayoría de las estancias en el laboratorio consistieron en conocer la cámara e intentar ponerla en marcha de una manera en la que los resultados fueran lo más fiables posibles.

Para comprobar el vacío de la cámara se hicieron pruebas anteriores a la toma de datos. Dichas pruebas consistieron en introducir presiones desde 500 mb hasta 950 mb con la cámara vacía y con una planta en su interior, desactivando el módulo auxiliar (que controla la presión) en el momento que alcanzase la presión seleccionada. El resultado fue un aumento progresivo de la presión cuando la planta estaba en su interior y ninguna variación de la presión cuando la cámara estaba vacía. Estos resultados nos brindan más información del funcionamiento de la cámara de

vacío; si no hay ningún factor que modifique el aire de su interior, es capaz por sí sola de mantener la presión fija (a los valores que sean). La cuestión que explica el aumento de presión cuando introducimos una planta se debe a su actividad (y la del suelo) de intercambio de gases que puede afectar en la composición y presión total del aire del interior de la cámara.

Es conveniente indicar que el aporte de gases hacia el interior de la cámara se lleva a cabo mediante el sistema de válvulas, que están conectadas con las botellas de CO_2 y aire cero. También es de interés comentar que el aporte de aire por parte del módulo auxiliar se llevaba a cabo en casi todas las etapas del experimento, ya que, es necesario tanto para subir la presión como para mantenerla cuando hay incremento de CO_2 y cuando se quita el aporte de CO_2 . Esto puede explicar ciertas bajadas drásticas en la concentración de CO_2 en los datos tomados cuando se producen inyecciones de aire por parte del sistema.

Otra observación importante acerca de las medidas es la disminución en la pérdida de CO_2 conforme las presiones bajan. Este hecho se debe a la falta de necesidad por parte del sistema en inyectar aire, por lo que la presión parcial del CO_2 se mantiene constante, y, por lo tanto, su concentración también y las pérdidas son mucho menores.

El problema principal que nos ha presentado la cámara hipobárica se ha dado a la hora de introducir valores de CO_2 y H_2O para comenzar la toma de datos, ya que cuando se intenta disminuir el % de H_2O en el interior de la cámara, y, a su vez, aumentar el valor de CO_2 hasta cantidades deseadas, se da una disminución de la cantidad de CO_2 , hasta valores mínimos, haciendo imposible introducir valores de déficit de vapor de agua correspondientes a cada presión. Esto puede ser debido, a que cuando se introduce vapor de agua en el interior de la cámara, la presión parcial de este gas aumenta y, por lo tanto, disminuye la concentración de CO_2 en el interior de nuestro aparato.

En el caso de los datos de CO_2 obtenidos sin planta en el interior de la cámara, vemos cierta similitud entre la prueba de errores y los datos con suelo; ambos se acercan a 0, aunque en la prueba de errores vemos que puede haber algún factor que provoque una disminución de la concentración de dióxido de carbono respecto al tiempo, y en las medidas con suelo en el interior de la cámara vemos flujos positivos de CO_2 debidos muy probablemente a la respiración del suelo. En cuanto al H_2O en estos casos, se observa una diferencia notoria debido a la humedad presente en nuestro suelo al que le introducimos agua al igual que a las plantas para tener en cuenta su influencia en los resultados finales.

Si continuamos evaluando los datos medidos con la planta de tomate dentro de la cámara, encontramos una anomalía correspondiente al CO_2 en 800 milibares. La tendencia esperada es un aumento de flujo conforme aumenta la presión, que sí se aprecia en los demás datos, sin embargo, en el señalado vemos un flujo muy pequeño que se puede deber al estrés al que está sometida la planta debido a cambios bruscos de presión.

La planta, al estar sometida a una concentración baja de CO_2 , presenta una tasa de absorción de carbono menor que a concentraciones más altas, aunque se produzca una apertura estomática. Esto último explica la gran cantidad de H_2O expulsada por la planta de tomate a 200 ppm.

Con 415 ppm de CO_2 el flujo de CO_2 aumenta casi el doble en comparación con las medidas de 200 ppm. También se observa como dicho flujo es mayor conforme mayor es la presión. Al contrario, pasa con el flujo de agua que abandona la planta, que es menor que en el caso de 200 ppm y disminuye conforme disminuye la presión. El hecho de que se produzca una mayor salida de agua y una menor entrada de CO_2 a bajas presiones puede ser debido al aumento de la presión saturante de vapor por la disminución del punto de ebullición del agua, que provoque una salida energética de ésta y limite la entrada del CO_2 .

El porcentaje de error calculado con la desviación típica varía entre el 10 y el 30% en nuestros datos, una cifra demasiado alta, pero se debe a las pocas repeticiones realizadas en las medidas. En futuros estudios con la cámara hipobárica, se deben realizar tomas de datos más exhaustivas, ya que, de esta manera, se pueden descartar más datos anómalos y reducir los errores, aportando una fiabilidad mayor y obteniendo conclusiones más robustas.

Otro apunte que consideramos importante, y del que nos hemos dado cuenta analizando los resultados, se encuentra en el hecho de haber realizado las medidas a diferentes presiones el mismo día. Se cree conveniente que, a partir de ahora, las tomas de datos con diferentes presiones se lleven a cabo en diferentes días, ya que, de esta manera, no sometemos la planta a un gran estrés y es más fácil que se adapte a cada presión, lo que nos aporta unas medidas más fiables del funcionamiento estomático e intercambio de gases de las plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Wheeler, M. D., Newman, S. M., Orr-Ewing, A. J., & Ashfold, M. N. (1998). Cavity ring-down spectroscopy. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 94(3), 337-351.
- Berden, G., Peeters, R., & Meijer, G. (2000). Cavity ring-down spectroscopy: Experimental schemes and applications. *International reviews in physical chemistry*, 19(4), 565-607.
- O'Keefe, A., & Deacon, D. A. (1988). Cavity ring-down optical spectrometer for absorption measurements using pulsed laser sources. *Review of scientific instruments*, 59(12), 2544-2551.
- Manual de Usuario y Mantenimiento Cámara Hipobárica con Control Climático Amiston CHCC21
- Solarte, M. E., Moreno, L., & Melgarejo, L. M. (2010). VI. Fotosíntesis y pigmentos vegetales. *Experimentos en fisiología vegetal*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. p, 107-122.
- Carril, E. P. U. (2011). Fotosíntesis: aspectos básicos. *Reduca (Biología)*, 2(3).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Fernández, M., & Gyenge, J. (2010). *Técnicas de medición en ecofisiología vegetal. Conceptos y procedimientos*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires.
- Mata, P. G. E. FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN.
- Alonso, S., Babino, Á., & Pellegrino, V. (2020). Fotosíntesis.
- Del Valle, É. V., & Sánchez, E. (2015). Adaptaciones fotosintéticas en las plantas para mejorar la captación del carbono. *Revista ciencia*, 74-79.
- Cordero Ocampo, R. K. (2020). La fotosíntesis y sus etapas en el proceso de producción de glucosa en las plantas (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2020).
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (1992). *Biología de las plantas*. Reverté.
- Damián Nava, A., Ramírez Ramírez, I., Peña Valdivia, C. B., Díaz Villaseñor, G., & González Hernández, V. A. (2009). Características del intercambio de gases en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(2), 119-126.
- Martínez, S., 2007. SUELO Y PREPARACIÓN DEL TERRENO. *Conjunto Tecnológico para la Producción de Tomate de Ensalada de Bogotá*, C. D. C. (2015). *Manual tomate*.
-https://www.ehowenespanol.com/duracion-del-semilla-tomate-fruta-madura-sobre_431149/
- CORPOICA., & Noreña, J. E. J. (2013). *Tecnología para el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas*. Produmedios.
- Jaramillo Norña, J., Rodríguez, V. P., Guzmán, A., & Zapata, M. A. (2007). *Manual técnico buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas* (No. Doc. 22213) CO-BAC, Bogotá).
- [https://www.intiasa.es/repositorio/images/docs/GUIATOMATE\(0\).pdf](https://www.intiasa.es/repositorio/images/docs/GUIATOMATE(0).pdf)
- Chaves, M. M., Osorio, J., & Pereira, J. S. (2004). *Water use efficiency and photosynthesis* (pp. 42-74). CRC Press: Boca Raton, FL.

Hugalde, I. P. (2011). *Relaciones entre cavitación y cierre estomático en vides sometidas a déficit hídrico* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.).

González, J. C. R. *COMPRESIÓN, ANÁLISIS Y EMPATÍA POR UN CIENTÍFICO DESTACADO, JOHN DALTON*.

Calderón, J., Marroquin, A., Luviano, L., Maqueda, V., Marín, E., & Calderón, A. (2019). *Sonido, Ultrasonido y Cavitación*. *Latin-American Journal of Physics Education*, 13(4), 11.

TOLENTINO, G. L., ARGUELLO, B. M., & RICARDO, H. L. S. (2016). *Medición de intercambio gaseoso, área foliar e índice de clorofila en plantas elicitadas con nanopartículas*.

PÉREZ-PRIEGO, Oscar; et al. *Analysing uncertainties in the calculation of fluxes using whole-plant chambers: random and systematic errors*. *Plant and soil*, 2015, vol. 393, no 1, p. 229-244.

Zheng, X., Xie, B., Liu, C., Zhou, Z., Yao, Z., Wang, Y., ... & Butterbach-Bahl, K. (2008). *Quantifying net ecosystem carbon dioxide exchange of a short-plant cropland with intermittent chamber measurements*. *Global Biogeochemical Cycles*, 22(3).

Okada, M., Liefferring, M., Nakamura, H., Yoshimoto, M., Kim, H. Y., & Kobayashi, K. (2001). *Free-air CO₂ enrichment (FACE) using pure CO₂ injection: system description*. *New Phytologist*, 150(2), 251-260.