

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL Y ECOLOGÍA**



**EL ESLABÓN FITOPLANCTON-BACTERIA EN  
UN ECOSISTEMA DE ALTA MONTAÑA:  
ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y REGULACIÓN**

**TESIS DOCTORAL**

**JUAN MANUEL MEDINA SÁNCHEZ**

**Granada, 2002**



**EL ESLABÓN FITOPLANCTON-BACTERIA EN  
UN ECOSISTEMA DE ALTA MONTAÑA:  
ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y REGULACIÓN**

**Memoria que el Licenciado Juan Manuel Medina Sánchez presenta para  
aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada**

**Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de:**

**Dra. Presentación Carrillo Lechuga**



**Ldo. Juan Manuel Medina Sánchez**

**Aspirante al Grado de Doctor**



**Granada, Septiembre de 2002**



**Dra. Presentación Carrillo Lechuga**

**Profesora Titular de Ecología de la Universidad de Granada**

**CERTIFICA**

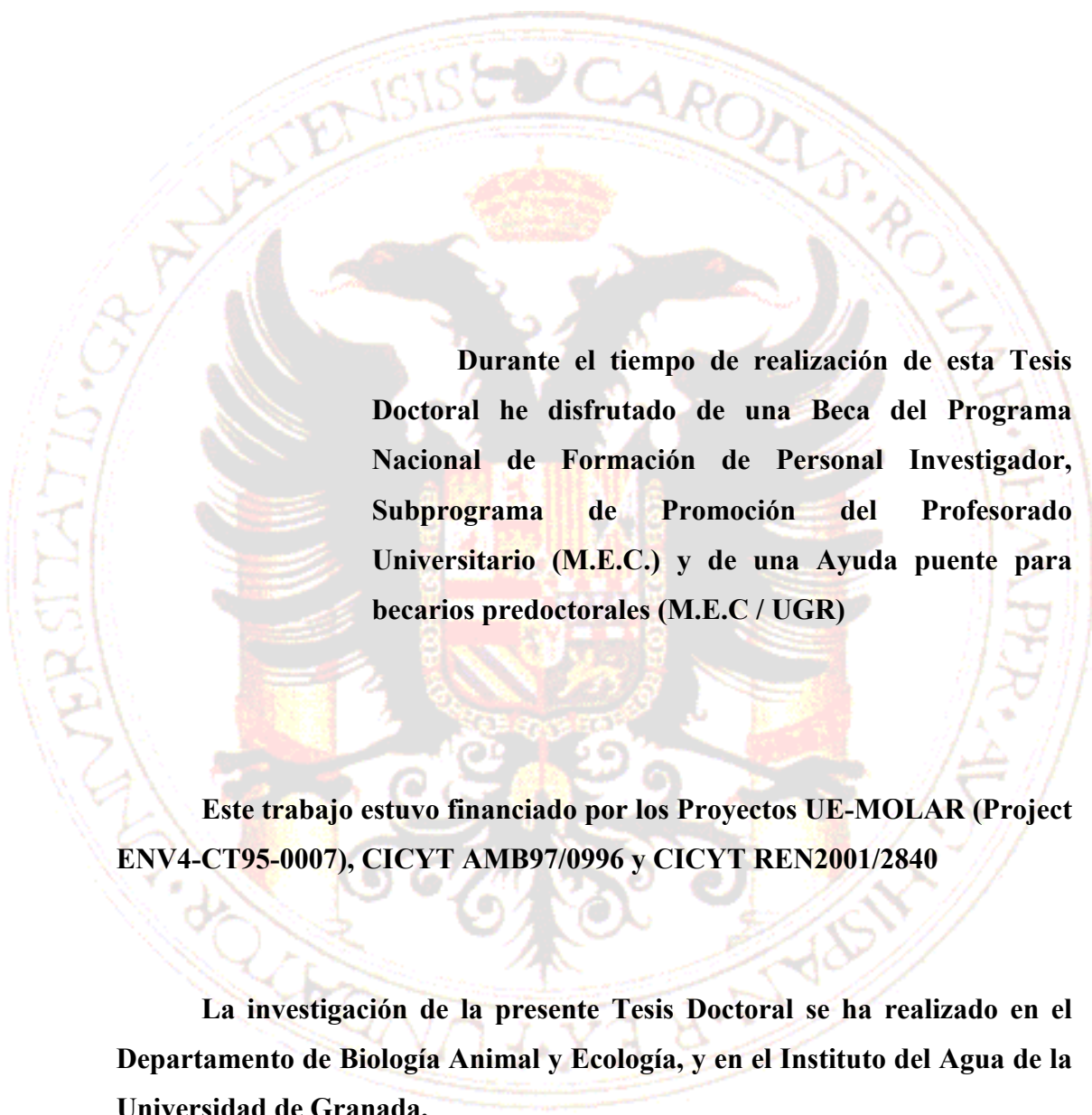
**Que los trabajos de investigación desarrollados en la Memoria de Tesis Doctoral: “*El Eslabón Fitoplancton-Bacteria en un Ecosistema de Alta Montaña: Estructura, Función y Regulación*”, son aptos para ser presentados por el Ldo. Juan Manuel Medina Sánchez ante el Tribunal que en su día se designe, para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada**

**Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendiendo el presente certificado a 16 de Septiembre de 2002.**



**Dra. Presentación Carrillo**



The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two lions. The shield is supported by two columns. The text 'UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO' is visible around the top edge of the seal, and 'L. M. P. P. R. A. L. H. I. S. P. A. N. I. A. E.' is visible around the bottom edge.

**Durante el tiempo de realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado de una Beca del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador, Subprograma de Promoción del Profesorado Universitario (M.E.C.) y de una Ayuda puente para becarios predoctorales (M.E.C / UGR)**

**Este trabajo estuvo financiado por los Proyectos UE-MOLAR (Project ENV4-CT95-0007), CICYT AMB97/0996 y CICYT REN2001/2840**

**La investigación de la presente Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Biología Animal y Ecología, y en el Instituto del Agua de la Universidad de Granada.**





**Durante la aventura intelectual que ha sido la realización de esta Tesis he contado con la inestimable ayuda de numerosas personas, que me han ofrecido su experiencia, profesionalidad, buen criterio, apoyo logístico, paciencia y amistad en las múltiples facetas del proceso de elaboración, que ahora culmina.**

**Todas estas personas han dejado un grato recuerdo indeleble en mi memoria y han sido para mí ejemplo de madurez y virtud.**

**Ahora, como entonces, les reitero mi más profundo agradecimiento.**



**A María José**

**A mis padres**



## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I.- Introducción: la interacción alga-bacteria</b>	1
Breve bosquejo histórico	2
¿Cuál es el vínculo directo que conecta la producción primaria con la bacteriana?	3
Causas y mecanismos de la excreción de C orgánico de origen fotosintético por algas “sanas”	4
Consecuencias ecológicas de la liberación de carbono fotosintético en la interacción alga-bacteria	12
La interacción alga-bacteria: predominio bucle microbiano vs. cadena de pastoreo	16
Sistema estudiado y justificación	20
Conocimientos previos de la interacción alga-bacteria en La Caldera	21
<b>OBJETIVOS</b>	23
<b>CAPÍTULO II.- Materiales y Métodos</b>	25
Precipitaciones atmosféricas	26
Análisis del perfil vertical	26
Variables estructurales	27
Variables físicas, químicas y biológicas: toma de muestras	27
Variables físicas, químicas y biológicas: determinaciones en laboratorio	28
Compuestos de fósforo	28
Compuestos de nitrógeno	28
Parámetros biológicos	29
Variables funcionales	34
Producción primaria, excreción algal de carbono orgánico y su reasimilación bacteriana	34
Producción bacteriana y eficiencia de uso del C fotosintético	37

Determinación del factor de conversión bacteriana en La Caldera	40
Introducción	40
Método	41
Resultado	42
Discusión	42
<b>CAPÍTULO III.- Estructura de la comunidad pelágica</b>	45
Introducción	46
Material y Métodos	48
Resultados	48
Caracterización abiótica	48
Fitoplancton	52
Bacterioplancton	54
Nanoflagelados heterotrófos y ciliados	54
Zooplancton	56
Relación entre los componentes abióticos y bióticos	58
Discusión	60
Componentes abióticos	60
Fitoplancton	61
Bacterioplancton	64
Nanoflagelados heterotrófos y ciliados	65
Zooplancton	65
Razón autótrofo:heterótrofo	66
<b>CAPÍTULO IV.- El eslabón alga-bacteria: los procesos</b>	69
Introducción	70
Material y Métodos	71
Diseño experimental	71
Análisis estadísticos	73
Resultados	74
Los procesos según una escala estacional e interanual	74

Producción y productividad primaria, y excreción de C por las algas	74
Producción y productividad bacteriana	76
Relación fitoplancton-bacterias	79
Los procesos según una escala diaria	82
Abundancias y biomasa fitoplanctónica y bacteriana	82
Producción y productividad primaria, y excreción de C por las algas	82
Producción y productividad bacteriana	85
Relación fitoplancton-bacterias	85
Discusión	87
Producción y productividad primaria, y excreción de C por las algas	87
Producción y productividad bacteriana	92
Interacción alga-bacteria: escalas temporales	93
Interacción alga-bacteria: escala espacial	94
Relación entre estructura y procesos	95
<b>CAPÍTULO V.- Efectos del espectro de radiación solar</b>	97
Introducción	98
Material y métodos	102
Diseño experimental	102
Medidas de radiación solar	104
Análisis estadísticos	105
Resultados	106
Medidas de radiación solar	106
Efectos del espectro de radiación solar sobre la producción primaria y la liberación de C orgánico por las algas	108
Efectos del espectro de radiación solar sobre la incorporación de TdR por las bacterias	110
Efectos del espectro de radiación solar sobre el uso bacteriano del C orgánico suministrado por las algas	110
Discusión	112

Efectos del espectro de radiación solar sobre la producción primaria y la liberación de C orgánico por las algas	113
Efectos del espectro de radiación solar sobre la incorporación de TdR por las bacterias	114
Efectos del espectro de radiación solar sobre el uso bacteriano del C orgánico suministrado por las algas	119
Conclusiones e implicaciones	120
<b>CAPÍTULO VI.- Efectos interactivos luz-nutrientes</b>	123
Introducción	124
Material y Métodos	125
Diseño experimental	125
Análisis estadísticos	125
Resultados	127
Efectos del enriquecimiento con P sobre la respuesta del fitoplancton al espectro de radiación solar: producción primaria y excreción de C fotosintético	127
Efectos del enriquecimiento con P sobre la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar	135
Efectos del enriquecimiento con P y del espectro de radiación solar sobre la interacción algas-bacterias: uso bacteriano del C fotosintético	136
Discusión	140
Efectos del enriquecimiento con P sobre la respuesta del fitoplancton al espectro de radiación solar: producción primaria y excreción de C fotosintético	140
Efectos del enriquecimiento con P sobre la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar	144
Efectos del enriquecimiento con P y del espectro de radiación solar sobre la interacción algas-bacterias: uso bacteriano del C fotosintético	146
Implicaciones	147
<b>CAPÍTULO VII.- Modulación de la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar por algas y nutrientes</b>	151
Introducción	152



Material y métodos	153
Diseño experimental	153
Análisis estadísticos	155
Resultados	156
Patrones de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar (agua entera)	156
Efectos de las algas sobre la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar	158
Efecto de las algas y del enriquecimiento con P sobre la respuesta de bacterias deficientes en P al espectro de radiación solar	160
Discusión	162
Conclusiones	167
<b>CAPÍTULO VIII.- Epílogo: mixotrofia en las algas</b>	169
Introducción	170
Material y métodos	173
Diseño experimental	173
Análisis estadísticos	176
Resultados	177
Discusión	178
Aspectos metodológicos	178
Aspectos ecológicos	181
Consecuencias de la mixotrofia: la estructura de la comunidad pelágica	183
<b>SÍNTESIS</b>	187
<b>CONCLUSIONES</b>	195
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	199
<b>Abreviaturas</b>	242



# CAPÍTULO I

---

## Introducción: la interacción alga-bacteria

Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una persona, aunque estuviera toda ella dedicada al cielo, será insuficiente para investigar una materia tan vasta... Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar.

Séneca (4AC-65DC), *Cuestiones naturales*, libro 7

### **Breve bosquejo histórico**

Hasta mediados de la década de los 70, el bacterioplancton fue considerado un componente minoritario de la red trófica de ecosistemas acuáticos, y se asumía que casi toda la producción primaria fitoplanctónica era consumida por el zooplancton, por lo que el flujo de C seguiría básicamente la cadena de pastoreo (Steele 1974). Sin embargo, se fueron acumulando evidencias de que el bacterioplancton juega un importante papel en el flujo de materia y energía de la mayoría de los ecosistemas acuáticos gracias al desarrollo de:

- técnicas de microscopía de epifluorescencia, fluorocromos específicos, análisis de imágenes, cromatografía de alta resolución, ultrafiltración (Porter y Feig 1980, Psenner 1990, Cotner et al. 2001, Cotner y Biddanda 2002),
- trazadores de crecimiento y respiración bacteriana (Meyer-Reil 1978, Fuhrman y Azam 1982, Packard 1985, Kirchman et al. 1985, Rodríguez et al. 1992, Smith y Azam 1992, Karner y Fuhrman 1997),
- análisis de actividades enzimáticas (Reichardt et al. 1967, Ammerman y Azam 1985, Boavida y Wetzel 1998),
- análisis de carbono orgánico e inorgánico disuelto, isótopos estables, etc.

En la actualidad sabemos que el bacterioplancton constituye una importante fracción de la biomasa del compartimiento planctónico heterotrófico (Sieburth et al. 1978). Su alta razón superficie:volumen (mayor que la del resto de la comunidad planctónica) y su alta tasa de crecimiento, hace que la producción de biomasa bacteriana constituya un importante vínculo entre la materia orgánica muerta y los niveles tróficos superiores (Fenchel y Blackburn 1979, Wetzel 1982, Cho y Azam 1988). Además, su papel en los procesos la remineralización de C orgánico y nutrientes minerales hace que este componente planctónico sea clave en los ciclos globales de éstos (del Giorgio y Cole 1998, Hansell y Carlson 1998, Carlson et al. 1999). Por tanto, la comprensión de este carácter dual (productor vs. mineralizador) del bacterioplancton en los ecosistemas acuáticos es un paradigma central de la ecología microbiana contemporánea (Ducklow y Carlson 1992).

Ha sido comúnmente aceptado en la literatura que, en muchos ecosistemas, la producción bacteriana heterotrófica está controlada por el suministro de C orgánico procedente del fitoplancton (Cole 1982, Kirchman 1990). Esta idea está soportada por

trabajos ya clásicos que mostraron una covariación positiva entre los parámetros estructurales (biomasa y abundancia) y funcionales (ej. producción) del bacterioplancton y los del fitoplancton (Bird y Kalf 1984, Cole et al. 1988) a lo largo de un amplio rango trófico, tanto de ecosistemas marinos como de agua dulce. Estas relaciones han generado un modelo conceptual de dependencia bacteriana, directa o indirecta, de la producción algal como fuente primera de sustratos orgánicos. Además, aunque la proporción de bacterias activas suele ser baja en condiciones naturales (Pedrós-Alió y Newell 1989, Choi et al. 1999, Sherr et al. 1999 a, b), en aquellos trabajos clásicos se estimó que la producción de biomasa bacteriana medida en la capa trofогénica del conjunto de ecosistemas estudiados representaba en promedio un 20% de la producción primaria (Williams 1981, Cole et al. 1988), e incluso duplicaba a la producción del macrozooplancton (Cole et al. 1988).

### **¿Cuál es el vínculo directo que conecta la producción primaria con la bacteriana?**

Las células algales en estado de crecimiento activo liberan una parte sustancial del carbono orgánico producido. Este proceso es generalmente denominado como ‘excreción’, ‘exudación’ o ‘liberación extracelular de carbono orgánico producido fotosintéticamente’ (Sundh 1989). Esta excreción de carbono orgánico (EOC) por algas “sanas” ha sido cuantificada tanto en cultivos algales (Mague et al. 1980, Malinsky-Rushansky y Legrand 1996) como en poblaciones naturales de fitoplancton marino y de agua dulce (Hellebust 1965, Lancelot 1984, Sundh 1989, Lignell 1990a, Maurin et al. 1997).

La composición química de estos productos extracelulares algales es altamente variada, ya que incluye compuestos nitrogenados (aminoácidos, péptidos, vitaminas), ácidos orgánicos (glicolato, ácidos tricarbóxicos), ácidos grasos y carbohidratos (mono, oligo y polisacáridos) (Hellebust 1974, Lancelot 1984, Sundh 1989, 1992). Esta diversidad química se puede “simplificar” clasificando a los compuestos por su peso molecular. Así, Carlson et al. (1985) y Benner et al. (1992) consideran un umbral de 1000 Da para diferenciar estos compuestos entre LMW (low-molecular-weight, <1000 Da) y HMW (high-molecular-weight, >1000 Da). Un conjunto de estudios mostraron que los compuestos <1000 Da representaron más del 50% del material orgánico fotosintético excretado por las algas (Hellebust 1965, Iturriaga y Zsolnay 1983, Jensen 1983, Lignell

1990 a, Maurin et al. 1997). No obstante, algunos estudios previos documentan un predominio de compuestos HMW (Lancelot 1984, Nalewajko y Schindler 1976). Carlson et al. (1985) y Benner et al. (1992) encontraron que los compuestos <1000 Da (LMW) y >1000 Da (HMW) del DOM de la capa trofógena del océano aparecen en unas proporciones aproximadas de 30% de HMW y 70% de LMW, similares a la del DOM recién liberado por el fitoplancton marino (Biddanda y Benner 1997). Maurin et al. (1997) documentaron que las bacterias reasimilaron hasta un 90% (promedio  $42 \pm 22\%$ ) de los productos excretados, estableciéndose una estrecha relación entre la excreción de C orgánico desde las algas y su consumo por las bacterias. Los compuestos <700 Da fueron los más consumidos por las bacterias (66% del total de compuestos asimilados, en promedio), mientras que los compuestos de mayor peso molecular fueron consumidos por las bacterias a una tasa más baja. Además, Amón y Benner (1996) mostraron que los compuestos de bajo peso molecular mantienen eficiencias de crecimiento bacterianas más elevadas que los de alto peso molecular en ambientes oceánicos. Por lo tanto, los compuestos orgánicos excretados por las algas constituyen el vínculo de la interacción comensalista fitoplancton-bacterias, ya que proporciona el C y la energía necesaria para las bacterias.

### **Causas y mecanismos de la excreción de C orgánico de origen fotosintético por algas “sanas”**

Cuando las células algales no son deficientes en nutrientes minerales experimentan un crecimiento equilibrado, es decir, con una tasa específica de crecimiento similar para todos los constituyentes celulares (Falkowski y Raven 1997). Además, en las células algales con crecimiento equilibrado, los macronutrientes se encuentran presentes en unas proporciones relativamente constantes, tal y como ya establecieron Redfield et al. (1963). Para mantener la biosíntesis de nuevas células, debe existir un adecuado flujo de los diferentes elementos que constituyen la biomasa celular. Sin embargo, la fotosíntesis aporta solamente el carbono reducido, gran parte del cual es usado como fuente de energía al ser sustrato de la respiración, que supone unas pérdidas de 10-60% de todo el C fijado fotosintéticamente (Geider 1992). Por ello, la fotosíntesis es una vía metabólica necesaria, pero no suficiente, para sostener el crecimiento de nuevas células, de modo que las tasas de incorporación de los otros elementos constituyentes de la biomasa (N y S para proteínas, P para ácidos nucleicos y ATP, etc.) tienen que ser proporcionales a las de la

síntesis de C orgánico para conseguir unas adecuadas razones elementales. Las cantidades de estos elementos que son requeridas para producir una biomasa dada son generalmente denominadas “cuota celular”.

En el medio natural, las condiciones ideales requeridas para el crecimiento equilibrado ocurren sólo de forma transitoria. Lo más frecuente es que las células algales estén limitadas por uno o más nutrientes. Para superar tales períodos de escasez de nutrientes, muchas especies fitoplanctónicas han desarrollado estrategias de “consumo de lujo” de nutrientes esenciales, que almacenan en compartimentos celulares, para después ser movilizados durante los períodos de escasez (Sterner 1995, Dubinsky y Berman-Frank 2001). Estos almacenamientos favorecen una cierta, aunque limitada, independencia del crecimiento celular con respecto a la concentración de nutrientes en el ambiente. Cuando las condiciones ambientales imponen una continuada limitación de nutrientes y los contenidos celulares de los mismos se agotan (proceso que ocurre en días o semanas, según las especies y su estado fisiológico), se produce una disminución de la tasa de crecimiento celular. Si las condiciones de luz son saturantes, se puede mantener una tasa fotosintética relativamente alta en relación con los requerimientos celulares de respiración y crecimiento, por lo que se llega a un desacople entre fijación de C y crecimiento (Berman-Frank y Dubinsky 1999). La extensión temporal durante la que puede mantenerse este desacople varía considerablemente entre especies algales. Al final, la carencia de N, P y otros nutrientes interferirá con el recambio de componentes celulares esenciales, como enzimas o ácidos nucleicos, lo que conllevará la muerte celular.

Existe una variedad de respuestas celulares del fitoplancton al desacople entre fotosíntesis y crecimiento, y que son consideradas en la literatura como manifestaciones de estrés celular. Algunas de las respuestas descritas incluyen: cambios en la proporción pigmentaria de clorofilas y ficobilinas por carotenoides frente a una limitación por N (Dubinsky y Polna 1976, Dubinsky y Berman 1979, Turpin 1991); transformación de células vegetativas en aplanosporas inmóviles (Zlotnik et al. 1993); variaciones en los polímeros de almacenamiento y, por consiguiente, en la flotabilidad de cianofíceas (Klemer et al. 1996); mayor desarrollo de las placas tecales polisacáridicas de dinoflagelados (Criscuolo et al. 1981).

Pero las respuestas al desacople entre fotosíntesis y crecimiento probablemente más estudiadas y que tienen una importante repercusión ecológica son:

- (1) la excreción de C orgánico de origen fotosintético
- (2) la acumulación intracelular de carbohidratos de reserva.

En una reciente revisión, Plaxton y Carswell (1999) documentan las bases fisiológicas que favorecen el incremento de la excreción de ácidos orgánicos (ej. málico, cítrico, etc.) y la acumulación en cloroplastos de carbohidratos de reserva en situaciones de limitación de P.

(1) *La excreción de C orgánico de origen fotosintético.*- El incremento de la excreción de compuestos orgánicos es consecuencia de una respuesta general a la limitación de P que implica la activación de rutas alternativas de la glicólisis, del transporte electrónico mitocondrial y de las bombas de H<sup>+</sup> tonoplastidial. Estas rutas alternativas están catalizadas por enzimas que son dependientes de pirofosfato (PPi) en vez de adenilatos (ATP/ADP), lo que es pertinente porque en condiciones de limitación de P se reducen los niveles de nucleósidos fosfato como consecuencia de la disminución de Pi citosólico (Theodorou et al. 1991), mientras que los niveles de PPi, subproducto de multitud de reacciones anabólicas tales como la biosíntesis de ADN, ARN, proteínas, lípidos y polisacáridos, se mantienen relativamente constantes (Dancer et al. 1990, Stitt 1990). Las rutas alternativas, además de permitir el mantenimiento del catabolismo necesario para satisfacer las demandas de energía y de esqueletos de C, generan Pi como subproducto, por lo que favorecen el mantenimiento y reciclado de los niveles de Pi citoplasmáticos (Plaxton 1996, Plaxton y Carswell 1999). Los pasos clave de estas rutas alternativas se representan en la Figura 1-1 como flechas gruesas:

- (i) la conversión de sacarosa a hexosas fosfato sigue la ruta dependiente de PPi: sacarosa sintasa → UDP-glucosa pirofosforilasa → nucleósido difosfato kinasa, como alternativa a la ruta dependiente de ATP constituida por invertasa, hexoquinasa y fructoquinasa;
- (ii) la fosforilación de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato es catalizada por fosfofructokinasa dependiente de PPi (PFP) y generadora de Pi, como alternativa a la fosfofructoquinasa dependiente de ATP (PFK);
- (iii) la conversión de gliceraldehído-3-fosfato a 3-fosfoglicerato es catalizada por la NADP-G3PDH como alternativa de la NAD-G3PDH dependiente de Pi;
- (iv) el fosfoenolpiruvato (PEP), que normalmente es transformado a piruvato por la piruvato quinasa (PK) dependiente de ATP, puede ser convertido a oxalacetato (OAA) por medio de la PEPCasa que genera Pi. El OAA es reducido a malato, y

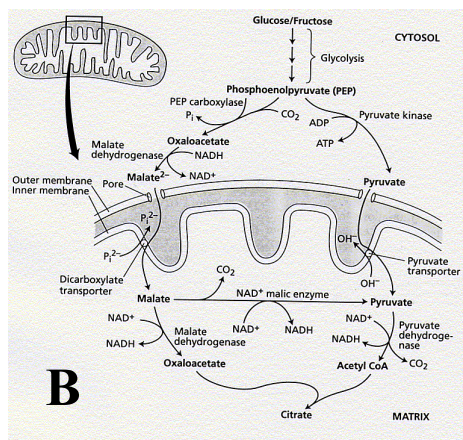
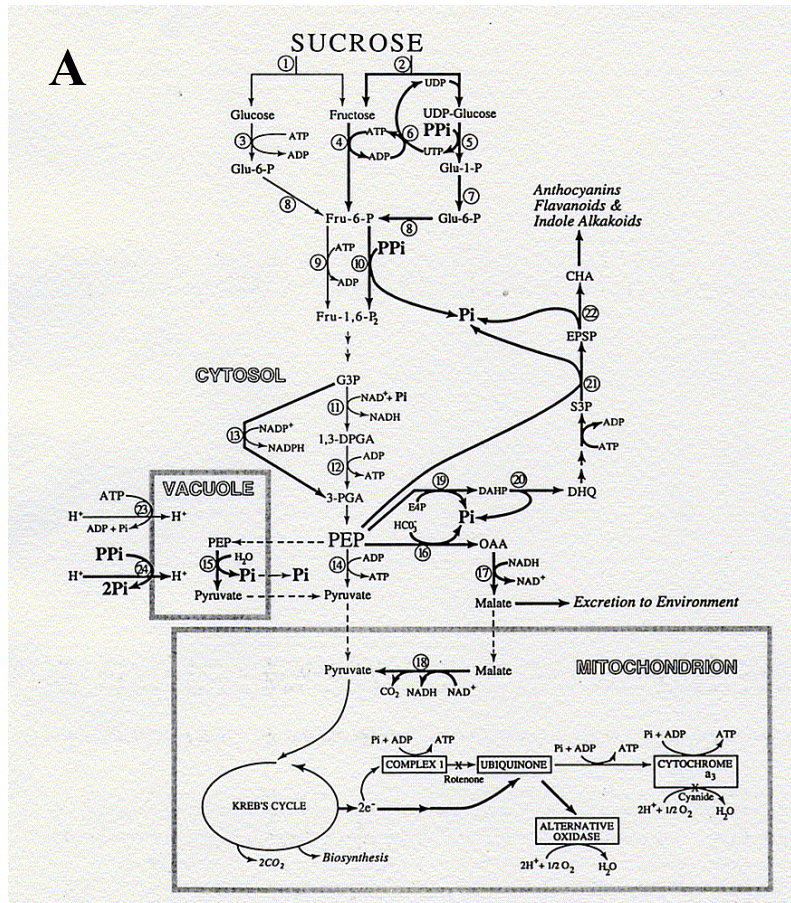


éste se libera al exterior, formando parte de la excreción de C orgánico de origen fotosintético, o bien entra en la mitocondria para ser reoxidado a OAA o descarboxilado oxidativamente a piruvato y después a acetil CoA, que, junto con OAA, ingresa en el ciclo de Krebs. Alternativamente, el PEP puede penetrar en la vacuola y ser defosforilado a piruvato por la PEP fosfatasa que actúa óptimamente al pH ácido mantenido en el interior de la vacuola por la actividad de una bomba de  $H^+$  dependiente de  $PPi$  como alternativa a la bomba de protones dependiente de ATP. El piruvato resultante puede ser excretado al exterior o entrar en la mitocondria para seguir el ciclo de Krebs;

- (v) el poder reductor generado durante la fotosíntesis y en las rutas catabólicas descritas aumenta durante la limitación de P, ya que se incrementan las razones  $NADPH:NADP^+$  y  $NADH:NAD^+$ ; parte de este poder reductor se disipa como calor y agua siguiendo la ruta de transporte electrónico asociado a la oxidasa alternativa, que no genera ATP, a diferencia de la cadena de transporte electrónico constituida por el complejo I y el citocromo  $a_3$ .

Los compuestos orgánicos excretados mantienen un pH ácido en las inmediaciones de la célula que favorece la solubilización del P mineral, generalmente acompañado como fosfatos de Ca, Fe o Al, facilitando así su absorción como ión fosfato.

(2) *La acumulación intracelular de carbohidratos de reserva.*- Durante una situación de limitación por P se produce un descenso en los niveles de  $P_i$  del estroma del cloroplasto, lo que limita la actividad de las ATP sintasas de la membrana tilacoidal, así como de la RuBisCo, por lo que disminuye la fijación de C por fotosíntesis. A pesar de esto, la actividad fotosintética puede seguir generando una cantidad de C que excede las necesidades para el crecimiento celular, dada la escasez en el suministro de los otros nutrientes esenciales, con lo que se sigue manteniendo el desacople entre fotosíntesis y crecimiento celular. La deficiencia en  $P_i$  interrumpe en gran medida la exportación de las triosas fosfato, generadas en la fotosíntesis, desde el estroma cloroplastidial al citosol por el translocador dependiente de  $P_i$ , lo que provoca la acumulación de las mismas en el cloroplasto (Natr 1992). Buena parte de este fotosintato se convierte en almidón que queda almacenado en los cloroplastos, especialmente durante el día. Como consecuencia, el fotosintato queda inaccesible para el crecimiento celular, aunque con la contrapartida de una liberación de  $P_i$  asociada a la síntesis de almidón que puede ser usado para mantener la fotosíntesis, aunque a una tasa menor (Natr 1992).



**Figura 1-1. A)** Integración de las rutas catabólicas alternativas (flechas gruesas) que favorecen el reciclado intracelular de Pi. Las enzimas implicadas en la reacciones son: 1, invertasa; 2, sacarosa sintasa; 3, HK; 4, fructokinasa; 5, UDP-glucosa pirofosforilasa; 6, nucleósido difosfato kinasa; 7, fosfoglucomutasa; 8, fosfoglucosa isomerasa; 9, PFK; 10, PFP; 11, NAD-G3PDH; 12, 3-PGA kinasa; 13, NADP-G3PDH; 14, PK; 15, PEP fosfatasa; 16, PEPCasa; 17, malato deshidrogenasa; 18, enzima málico; 19, DAHP sintasa; 20, 3-desidroquinato deshidratasa; 21, EPSP sintasa; 22, corismato sintasa; 23, H<sup>+</sup>-ATPasa tonoplastidial; 24, H<sup>+</sup>-PPi-asa tonoplastidial. Tomado de Plaxton y Carswell (1999). **B)** Detalle de las reacciones en la mitocondria. Tomado de Taiz y Zeiger (1998).

Por último, otra respuesta celular al desacople fotosíntesis-crecimiento es la acumulación o liberación de metabolitos secundarios de naturaleza aromática (antocianinas, flavonoides, alcaloides indólicos, etc). Estos compuestos sirven como protección química contra los herbívoros, y además, dada su capacidad para absorber luz ultravioleta, ejercen una función fotoprotectora sobre ácidos nucleicos (Takahashi et al. 1991) y aminoran el daño fotoinhibidor que pueden sufrir los cloroplastos durante la fotosíntesis limitada en nutrientes (Heber et al. 1989). Como muestra la Figura 1-1, la secuencia de reacciones implicadas en la ruta biosintética de estos compuestos aromáticos también permite reciclar cantidades significativas de Pi a partir de diversos ésteres fosfato (Fischer et al. 1993, Plaxton y Carswell 1999).

A pesar de lo expuesto, los mecanismos que operan en la liberación de los diferentes compuestos excretados por el fitoplancton son aún poco conocidos. Bjørnsen (1988) argumentó que el mecanismo de exudación podría consistir en un transporte pasivo a través de la membrana celular, facilitado por un gradiente de concentración mantenido por el consumo de los exudados por parte del bacterioplancton. Este mecanismo resultaría en un mayor liberación de exudados en las células pequeñas, debido a su mayor razón superficie:volumen, y particularmente en ambientes oligotróficos, donde las concentraciones externas de compuestos orgánicos son bajas por lo que el gradiente de difusión intracelular-extracelular se mantiene elevado. Este autor asumió que los exudados son moléculas pequeñas, tales como glucosa o aminoácidos, que pueden atravesar la bicapa lipídica por difusión pasiva. Sin embargo, la presencia de compuestos de elevado peso molecular en los exudados requiere un transporte facilitado o activo catalizado por permeasas (Raven 1984). Tal y como argumentaron Sundh y Bell (1992), la existencia de compuestos de distintos pesos moleculares en los exudados algales implica que su liberación es el resultado de diversos mecanismos activos y pasivos actuando simultáneamente. Por otro lado, en estudios intrasistema (Lignell 1990 a, Maurin et al. 1997) o en estudios comparativos intersistémicos (Baines y Pace 1991), se documenta una significativa relación positiva entre tasa de excreción y de producción primaria, pero no entre tasa de excreción y biomasa fitoplanctónica. Estos resultados no apoyarían la propuesta de Bjørnsen (1988) de que la exudación podría ser interpretada como una pérdida continua desde la biomasa algal ('property tax') más que una liberación activa del exceso de fotosintatos ('income tax').

El hecho de que la excreción de C de origen fotosintético sea un proceso activo dependiente de la tasa de fijación fotosintética de C, no implica necesariamente que la

exudación represente un porcentaje constante de la producción primaria. Así, Baines y Pace (1991), en su estudio de revisión, encontraron un amplio rango (0-100 %) en el porcentaje de producción primaria que es liberada por las algas (%EOC). Sin embargo, estos autores no identificaron cuál podría ser la causa principal de esta variación, aunque rechazaron que fuera la tasa de producción primaria *per se*, al menos entre sistemas, porque esta variable no explicó la varianza de %EOC. Sterner et al. (1997) propusieron que la causa de la variación de %EOC podría estar en la razón luz:nutrientes. Así, con una alta razón luz:P puede producirse un exceso de carbono fijado con respecto a las necesidades celulares, por lo que se incrementaría el porcentaje de excreción de fotosintato. Esta hipótesis está directamente relacionada con la idea del desacople fotosíntesis-crecimiento (Berman-Frank y Dubinsky 1999). Obernosterer y Herndl (1995) sustentan experimentalmente esta idea al encontrar un mayor porcentaje de liberación de carbohidratos y aminoácidos disueltos en condiciones de limitación de nutrientes (alta razón luz:nutrientes). Maurin et al. (1997) documentaron altos porcentajes de excreción en las capas superiores de un lago oligo-mesotrófico durante el verano, por tanto, cuando la intensidad de luz es alta, y el mismo fenómeno también fue observado en diversas determinaciones *in situ* (Feuillade et al. 1986). El papel que puede ejercer la intensidad y calidad de radiación solar por sí misma sobre la excreción de C fotosintético es desconocido en ambientes naturales, aunque en condiciones de cultivo se ha documentado que no parece existir un incremento de la tasa de excreción bajo exposición a UV (Pausz & Herndl 1999). Por otro lado, se ha encontrado un incremento en las tasas de excreción de C fotosintético debido a una deficiencia en nutrientes, tanto en condiciones de cultivo (Ignatiades y Fogg 1973, Myklestad 1977, Watanabe 1980) como en ambientes naturales (Anderson y Zeutschel 1970, Thomas 1971, Berman y Holm-Hansen 1974, Larsson y Hagström 1982, Kaltenböck y Herndl 1992).

Wood y Van Valen (1990) propusieron que la exudación algal tendría lugar fundamentalmente bajo condiciones de alta intensidad de luz y escasez de nutrientes, de modo que la exudación serviría como un mecanismo alternativo a la fotorespiración. Así en lugar de ser fotorespirados, los fotosintatos producidos en exceso con respecto a las necesidades celulares, o a su capacidad de almacenamiento, serían excretados fuera de la célula. Este mecanismo proporcionaría una protección al aparato fotosintético bajo exposición a alta intensidad de luz ya que permite disipar el exceso de energía contenido en los coenzimas reductores formados durante la fase luminosa de la fotosíntesis. Al mismo tiempo, se mantiene la maquinaria fotosintética activa, minimizando el tiempo de retardo que requiere un ajuste metabólico hacia crecimiento cuando se incrementa la

disponibilidad de nutrientes. Por ello, la exudación permite mantener la integridad metabólica en un ambiente variable en cuanto a luz y disponibilidad de nutrientes (Wood y Van Valen 1990).

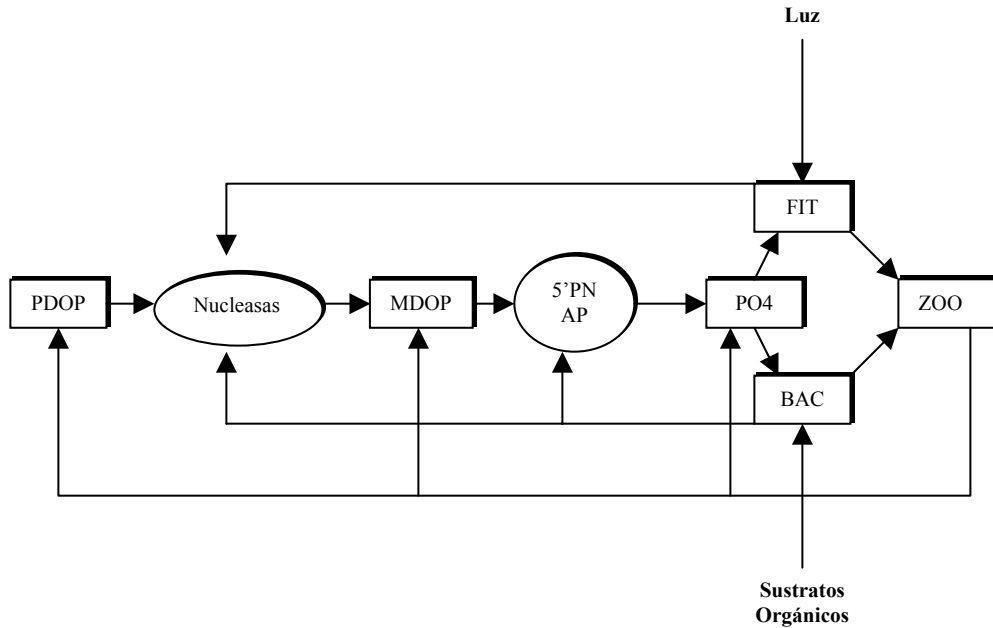
Un tamaño celular pequeño sería más susceptible al grado de desacople fotosíntesis-crecimiento, lo que determinaría un mayor %EOC (Malinsky-Rushansky y Legrand 1996), debido a una menor capacidad de almacenamiento de los nutrientes (Suttle et al. 1987, Suttle et al. 1990, Cotner y Wetzel 1992, Horne y Goldman 1994). No obstante, en condiciones de limitación de nutrientes también es ventajoso el tamaño celular pequeño ya que se consigue una alta razón superficie:volumen y una mayor afinidad por los nutrientes disueltos (Button 1986). Por tanto, existirá una solución de compromiso entre las ventajas de los tamaños celulares grandes y las de los pequeños que determinará el tipo de organismos que dominan y se suceden en un ecosistema dado.

Como conclusión, la exudación de C fotosintético se puede considerar como un mecanismo por el que la célula se “deshace” de la diferencia entre la asimilación fotosintética neta de carbono y su utilización para la síntesis de biomasa. Por ello, cuando las células están expuestas a una alta razón luz:nutrientes, con limitación de nutrientes, los productos de la exudación tienen altas razones C:N, aunque su alejamiento de la razón C:N = 7 de Redfield dependerá de la especie (Biddanda y Benner 1997). La naturaleza estequiométrica de los productos de exudación puede determinar la acumulación de DOM poco biodegradable con alta razón C:N en mares y océanos, generalmente limitados por N (Dugdale y Goering 1967). Esta acumulación es más acentuada tras “blooms” fitoplanctónicos primaverales (Obernosterer y Herndl 1995, Williams 1995). Es asimismo importante destacar que la composición estequiométrica de los productos extracelulares excretados por conjuntos algales con metabolismo mixotrófico puede desviarse de este patrón. Así, cuando los mixótrofos actúan predominantemente como fagótrofos, pueden liberar los nutrientes procedentes del reciclado de sus presas (bacterias) como  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{PO}_4^{3-}$ , hasta el punto de poder estimular el crecimiento de los fotótrofos obligados con los que coexisten. En condiciones de limitación de nutrientes minerales (P), los mixótrofos tienden a retener el P bacteriano para su propio crecimiento fotosintético, no estimulando el crecimiento de los fotótrofos obligados (Rothhaupt 1997).

### **Consecuencias ecológicas de la liberación de carbono fotosintético en la interacción alga-bacteria**

Los compuestos orgánicos excretados por las algas suelen tener un bajo contenido de nutrientes minerales, por lo que el crecimiento bacteriano que dependa de este C requerirá de un simultáneo consumo de nutrientes disueltos para la síntesis de biomasa bacteriana. De este modo, cuando las razones C:N, C:P o N:P de los sustratos orgánicos son mayores que las de las propias bacterias, el crecimiento bacteriano estará limitado por nutrientes minerales como N ó P (Thingstad et al. 1999, Touratier et al. 1999 y referencias citadas). Por tanto, en un ambiente donde la producción primaria esté limitada por la disponibilidad de nutrientes minerales se tiende a una interacción competitiva entre el fitoplancton y las bacterias heterotróficas por los nutrientes limitantes (Bratbak y Thingstad 1985, Currie 1990, Thingstad et al. 1993), cuyo resultado puede potencialmente influenciar no sólo la composición específica de las comunidades fitoplanctónica y bacteriana, sino el funcionamiento de la red trófica microbiana, al cambiar el equilibrio a favor de la dominancia de una de las comunidades (Bratbak y Thingstad 1985).

Como ilustración del mecanismo íntimo de la interacción competitiva entre fitoplancton y bacterias por un nutriente limitante (ej. P), Thingstad et al. (1993) propusieron un modelo que representa un ciclo microbiano de P, en el que tanto algas como bacterias producen de forma paralela enzimas extracelulares (fosfatasas alcalinas y 5'-nucleotidasas) que hidrolizan los monoésteres de fosfato (MDOP), compitiendo ambas comunidades por el ortofosfato liberado (Figura 1-2). Diversos estudios revelaron la presencia de ambos tipos de enzimas tanto en algas (Flynn et al. 1986) como en bacterias (Thompson y McLeod 1974, Bengis-Garber y Kushner 1981, 1982, Ammerman y Azam 1985, Tamminen 1989), de ambientes marinos (Bengis-Garber 1985, Ammerman y Azam 1991) y de aguas dulces (Cotner y Wetzel 1991), lo que acentúa el paralelismo de funcionamiento de ambas comunidades. Los resultados experimentales obtenidos para probar este modelo mostraron una superioridad de las bacterias sobre las algas para consumir ortofosfato a bajas concentraciones del mismo (Thingstad et al. 1993), implicando una significativa proporción del consumo de P en ambientes marinos y de agua dulce (Currie et al. 1986, Currie 1990, Kirchman 1994). Estos resultados eran consistentes con los obtenidos por Currie y Kalff (1984) y Cotner y Wetzel (1992) y en principio esperables, al considerar la mayor razón superficie:volumen de las bacterias.



**Figura 1-2.** Diagrama idealizado del ciclo microbiano de P en el que algas y bacterias juegan un papel paralelo en la producción de enzimas extracelulares para la hidrólisis de ésteres de fósforo, y compiten por el ortofosfato liberado. Nótese que la fuente de energía es distinta para las algas y para las bacterias. Leyenda: PDOP, polímeros de ésteres de P; MDOP, monómeros de ésteres de P; 5'PN, 5' nucleotidasa; AP, fosfatasa alcalina; PO<sub>4</sub>, ortofosfato; FIT, fitoplancton; BAC, bacterias; ZOO, zooplancton. Modificado de Thingstad et al. (1993).

En el modelo anterior, lo que justifica la diferenciación de 2 grupos funcionales distintos, a pesar de su paralelismo como consumidores de ortofosfato, es la fuente de energía que conduce el proceso de consumo: luz en el caso de las algas y materia orgánica en el caso de las bacterias. Dado que las algas, a través de los procesos de excreción, son fuente de materia orgánica, particularmente en situaciones de limitación de nutrientes, surge una situación paradójica: el fitoplancton estresado por la escasez de nutrientes minerales responde estimulando a las bacterias, sus competidores potenciales por los nutrientes, a través de la exudación de C orgánico (Bratbak y Thingstad 1985). Este aparente conflicto se resuelve considerando tanto la capacidad mineralizadora de las bacterias como la actividad de los depredadores de las mismas. Estos últimos constituyen un factor controlador de la biomasa bacteriana y favorecen la regeneración de los

nutrientes contenidos en las bacterias (Bratbak y Thingstad 1985, Stone 1990, Rothhaupt 1992, 1997, Thingstad y Rassoulzadegan 1995, Reche et al. 1997), las cuales suelen presentar una composición elemental relativamente rica en nutrientes minerales como N y P (Bratbak 1985, Nagata 1986, Vadstein et al. 1988).

En la excelente revisión realizada por Berman-Frank y Dubinsky (1999) se abre una nueva interpretación en la que los productos de excreción existentes en las regiones limítrofes de las superficies fitoplanctónicas funcionan como una zona de selección de especies o cepas bacterianas que pueden monopolizar este nicho rico en energía y limitado en nutrientes, por lo que actúan favoreciendo procesos coevolutivos entre algas y bacterias. Para el fitoplancton resulta ventajoso estar rodeado de una “micronube” donde existe un incremento local en la concentración de nutrientes limitantes procedente de la remineralización bacteriana, y formar agregados denominados “puntos o manchas calientes” o “sistemas soporte de vida” (Goldman 1984, Azam y Smith 1991, Azam et al. 1995), en los que su asociación con bacterias remineralizadoras y con los otros componentes del bucle microbiano potencia de modo sinérgico el crecimiento de algas, bacterias y demás organismos del agregado. Algunos ejemplos de estos “puntos calientes” abarcarían desde las placas tectales de los dinoflagelados, que constituyen un escudo polisacárido particularmente desarrollado en condiciones de limitación de nitrógeno, hasta las propias espumas marinas o lacustres, en cuya constitución interviene básicamente geles de carbohidratos denominados exopolímeros particulados transparentes (Allredge et al. 1993, Logan et al. 1995, Engel 2000, Engel et al. 2002), con alta razón C:N (Engel y Passow 2001, Engel et al. 2002), originados a partir de carbohidratos extracelulares exudados por el microplancton, particularmente por diatomeas (Passow 2000), tanto en ambientes naturales marinos o dulceacuícolas (Logan et al. 1995, Mari y Kjørboe 1996, Grossart et al. 1997), como en sistemas experimentales (Grossart et al. 1997, Engel 2000), pero siempre en condiciones de limitación de nutrientes (Obernosterer y Herndl 1995, Corzo et al. 2000).

Otras ventajas adicionales que supone para el fitoplancton los “puntos calientes” es su función de escudo protector, bien contra un exceso de radiación ultravioleta, debido a la presencia de compuestos aromáticos que absorben en este rango del espectro, bien contra infecciones virales, ya que el conjunto de bacterias y protistas que rodean al fitoplancton contribuye a inactivar o controlar a los virus parásitos de las algas (Murray 1995).



Estos efectos fotoprotectores y antivirales asociados a la exudación son consecuencias indirectas, que ilustran cómo procesos funcionalmente neutros pueden conferir secundariamente ventajas a los organismos, lo que potencia su mantenimiento evolutivo mientras permanezcan dichas ventajas (Berman-Frank y Dubinsky 1999). Para el fitoplancton formador de “puntos calientes” la combinación de beneficios directos e indirectos de la exudación debe ser mayor que los costes ocasionados por la competencia con las bacterias por los nutrientes minerales (Wood y Van Valen 1990). En conclusión, las consecuencias de los procesos de exudación se extienden más allá de las células individuales y trascienden hasta las interacciones interespecíficas y entre niveles tróficos. Tal y como Lignell (1990a) argumentó, la excreción algal representa una importante fuente de información en la red de comunicación de las comunidades planctónicas.

La exudación por el fitoplancton es considerada como la fuente más importante de sustratos orgánicos autóctonos que permiten el mantenimiento de la producción bacteriana heterotrófica, aunque otros procesos como la lisis viral de bacterias y algas o la depredación por protistas y metazoos (excreción, “sloppy feeding”, desintegración de partículas fecales, etc.) también aportan una significativa cantidad tanto de sustratos orgánicos como de nutrientes minerales (Lampert 1978, Güde 1988, Jumars et al. 1989, Peduzzi y Herndl 1992, Bratback et al. 1994, Hygum et al. 1997, Rothhaupt 1997). Este C autóctono es la base de la interacción comensalista que se establece entre algas y bacterias.

Como ya indicábamos al comienzo de esta Introducción, la interacción comensalista alga-bacteria ha sido tradicionalmente inferida a partir de correlaciones significativas entre bacterias y fitoplancton (biomasas, producciones...), tanto en un mismo ecosistema como entre ecosistemas diferentes (Bird y Kalf 1984, Cole et al. 1988, White et al. 1991, Jeppesen et al. 1997, Bouvy et al. 1998, Conan et al. 1999). Sin embargo, una correlación simple no prueba de forma inequívoca una relación causal, y subyacente a esta interpretación se asume que las bacterias no están limitadas por nutrientes minerales (Chrzanowski y Grover 2001), ya que si tanto las bacterias como el fitoplancton están restringidos por la disponibilidad de un mismo recurso, su biomasa y producción covariarán con respecto a éste (Cole et al. 1988, Rivkin y Anderson 1997). De hecho, diversos estudios realizados en sistemas oligo y mesotróficos han mostrado que el grado de acople entre fitoplancton y bacterias está mediado principalmente por una respuesta similar de ambas comunidades a factores reguladores comunes, como el P (Currie 1990), o la temperatura (Coveney y Wetzel 1995, Chrzanowski y Grover 2001).

Estas covariaciones también han sido establecidas en sistemas más productivos (Morris y Lewis 1992, Vrede et al. 1999) y en ambientes marinos (Rivskin y Anderson 1997). Le et al. (1994), en experimentos de mesocosmos, mostraron que el grado de acoplamiento entre ambas comunidades dependía de la razón N:P inorgánica, de forma que cuando ésta es alta se esperará un estrecho acoplamiento entre fitoplancton y bacterias al presentar un mismo patrón de respuesta a la dinámica de P. Sin embargo, cuando son diferentes los nutrientes minerales que limitan el crecimiento de algas y el de bacterias, puede esperarse un crecimiento desacoplado de ambas comunidades (Vrede et al. 1999).

Por otro lado, aunque exista una buena correspondencia entre las variaciones de parámetros algales y bacterianos, tanto intra como intersistémica, ésta no se mantiene necesariamente cuando se reducen las escalas espaciales o temporales de análisis. Así, Pace y Cole (1994a) encontraron una débil correlación entre las producciones primaria y bacteriana a lo largo de un perfil vertical en tres lagos, aunque la mejor relación según la escala espacial se encontró en el lago más oligotrófico y con menor carga alóctona de nutrientes.

Por el contrario, cuando se incrementa la escala de análisis (ej. al considerar datos obtenidos en diferentes sistemas siguiendo un gradiente trófico), hay que ser cauteloso en las conclusiones que se obtengan a partir de relaciones acopladas entre los parámetros de ambas comunidades, ya que el estado trófico puede influenciar y sesgar las magnitudes relativas del metabolismo algal y bacteriano (Simon et al. 1992, del Giorgio y Peters 1993, 1994, Coveney y Wetzel 1995). Finalmente, las fluctuaciones ambientales pueden enmascarar una potencial relación acoplada entre fitoplancton y bacterias. Así, Van Wambeke et al. (2002 b) encontraron que los procesos de transporte horizontal de masas de agua en el Mar Mediterráneo crearon situaciones de desacople entre fitoplancton y bacterias que se tradujeron en desequilibrios en el balance de C.

### **La interacción alga-bacteria: predominio bucle microbiano vs. cadena de pastoreo**

Al iniciar esta revisión ya sugerimos la importancia de la interacción comensalista en el flujo del C a través de las bacterias. Para finalizar esta Introducción profundizamos en el papel de la interacción comensalista alga-bacteria en la red trófica.

La interacción comensalista alga-bacteria es el vínculo entre el C fotosintético liberado y el resto de la red trófica. Así las bacterias asimilan este C y lo canalizan hacia protistas heterotróficos (ciliados y flagelados heterotróficos), que constituyen el denominado bucle microbiano o red trófica microbiana (Pomeroy 1974, Azam et al. 1983, Sherr et al. 1988, Banse 1992, Azam et al. 1995, Azam 1998), y/o hacia protistas mixotróficos (Fenchel 1982, Bird y Kalff 1986, 1987, Sanders y Porter 1988, Caron et al. 1990, Nygaard y Tobiesen 1993, Isaksson et al. 1999) que implican una ampliación del concepto de bucle microbiano. Se considera que aproximadamente entre el 30-60% de la producción primaria es canalizada por el bucle microbiano a partir de las bacterias (Ducklow y Carlson 1992, Azam 1998). El bucle microbiano implica, en parte, sólo un desvío parcial y temporal del flujo de C orgánico a través de la tradicional cadena alimentaria de pastoreo (fitoplancton-zooplancton-peces), ya que parte del C que fluye por dicho bucle termina ingresando en la cadena de pastoreo a través de la depredación del zooplancton sobre los protistas (Porter et al. 1979, Stoecker y Capuzzo 1990, DeBiase et al. 1990, Gifford 1991, Cruz-Pizarro et al. 1994) o directamente sobre las bacterias (Peterson et al. 1978, Pace et al. 1983, Pedrós-Alió y Brock 1983, Bern 1987).

Sin embargo, debido a la importancia de las pérdidas de C por respiración bacteriana, el bacterioplancton ha sido considerado más un sumidero de C de la red trófica planctónica que un vínculo con la cadena de pastoreo a través del bucle microbiano (Ducklow et al. 1986, del Giorgio et al. 1997). No obstante, con respecto a los nutrientes minerales, el bacterioplancton se considera más un vínculo con otros eslabones tróficos que un sumidero de estos nutrientes (Cottingham et al. 1997).

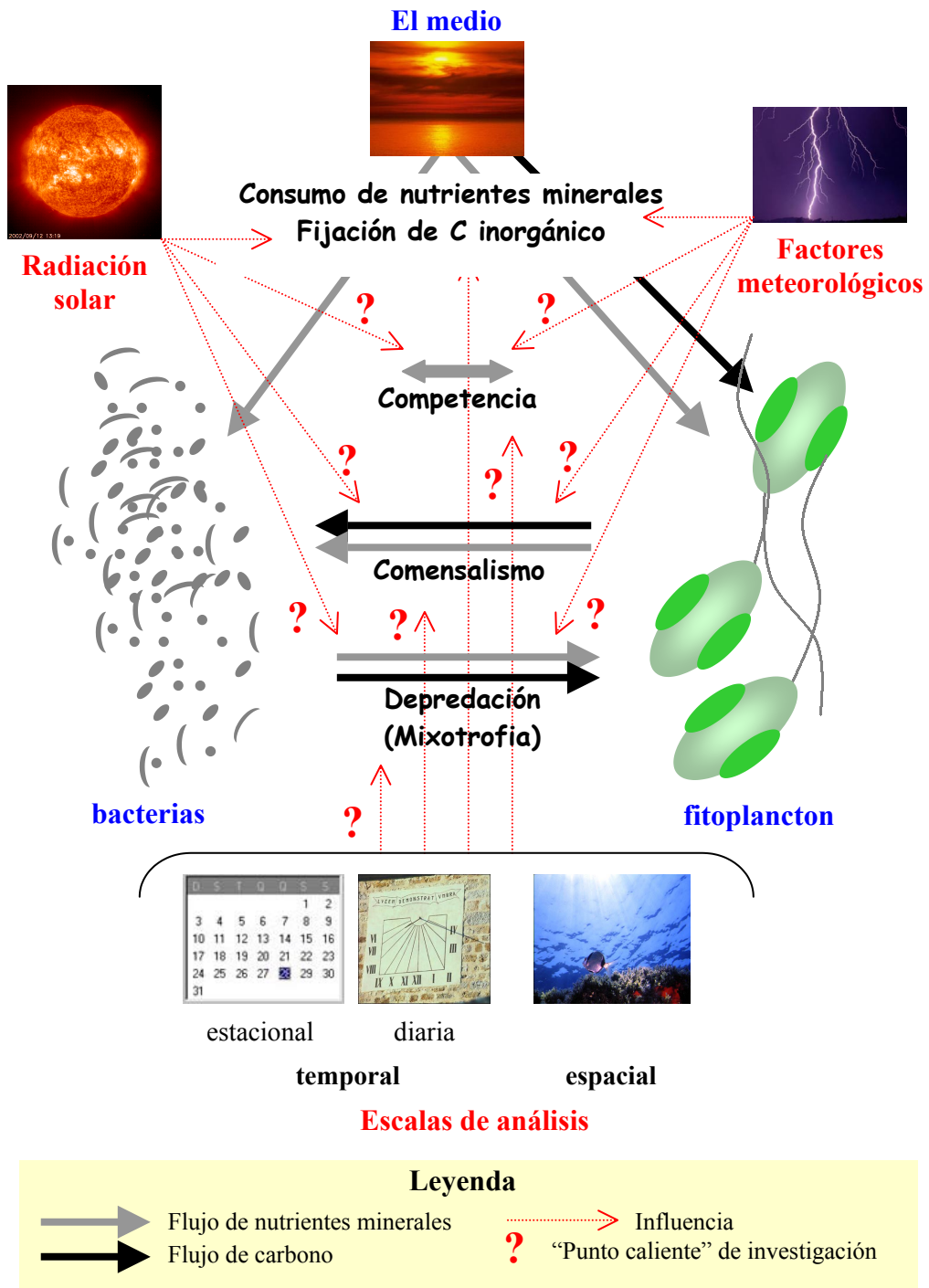
Esta perspectiva de las bacterias como sumideros de C ha sido sustentada por estudios realizados fundamentalmente en sistemas oligotróficos, donde la respiración bacteriana constituye una elevada proporción de la respiración de la comunidad completa, además de que las eficiencias de crecimiento bacteriano son menores (del Giorgio et al. 1997, del Giorgio y Cole 1998, Biddanda et al. 2001, Cotner y Biddanda 2002). Un crecimiento bacteriano limitado por los nutrientes implica una utilización menos eficiente del C orgánico, con un incremento de los costos de mantenimiento de su metabolismo (del Giorgio y Cole 1998). Curiosamente, en los sistemas oligotróficos, la razón biomasa bacteriana:biomasa algal tiende a ser mayor que en los sistemas eutróficos (Cotner y Biddanda 2002), por lo que su mantenimiento implica un flujo de gran cantidad de C orgánico a través del bucle microbiano, con el consiguiente menor desarrollo de los niveles tróficos superiores propios de la cadena de pastoreo (Cotner y Biddanda 2002). La

razón de esto último es el elevado número de transferencias tróficas (bacterias-flagelados-ciliados-metazooplancton), cada una de las cuales implica un 40-50% de remineralización de C orgánico hasta CO<sub>2</sub> (Jahnke y Craven 1995). Por ello, en la tercera transferencia, >90% del DOC inicialmente asimilado por las bacterias habrá sido liberado como CO<sub>2</sub>, y <5% se habrá transferido al metazooplancton (Rivkin y Anderson 1997).

Por otro lado, también está documentado en sistemas oligotróficos una acumulación de DOC, que no es consumido por la limitación de nutrientes minerales (Obernosterer y Herndl 1995, Rivkin y Anderson 1997, Olsen et al. 2002), o porque su biodisponibilidad para las bacterias se hace menor al estar sometido a la radiación solar, particularmente en sistemas con alta razón luz:nutrientes. En efecto, recientes estudios han aportado evidencias de que los sustratos orgánicos inicialmente biodisponibles (ej. C de reciente origen fotosintético) sufren una transformación fotoquímica por acción de la radiación solar que los hace más recalcitrantes y menos disponibles para el consumo bacteriano (Benner y Biddanda 1998, Obernosterer et al. 1999, Obernosterer et al. 2001). Por tanto, altas concentraciones de DOC no implican necesariamente que las bacterias no estén limitadas por C orgánico.

De lo expuesto anteriormente, surgen ciertas “contradicciones”: sistemas oligotróficos con alto consumo de C que sustentan un bucle microbiano desarrollado vs. sistemas oligotróficos donde existe una importante acumulación de C. ¿Es por tanto el concepto de oligotrofia *per se* un descriptor inequívoco que permita comprender los procesos que determinan el tipo de red trófica dominante en ecosistemas pobres en nutrientes minerales?

Indudablemente para un conjunto de ecosistemas autotróficos algunos posibles rasgos diferenciadores establecidos siguiendo el clásico esquema disyuntivo oligotrofia vs. eutrofia pueden estar originariamente determinados por el grado de desacople entre fotosíntesis y crecimiento del fitoplancton. Así, en ambientes oligotróficos, la prolongada escasez de nutrientes provoca un exceso de fotosintato que es excretado, constituyendo una fuente de C orgánico que atrae bacterias, y éstas concentran los nutrientes que son después puestos a disposición de las algas por acción de los protozoos bacterívoros (Azam et al. 1995). Por tanto se potencia el bucle microbiano controlado por el C fotosintético (Berman-Frank y Dubinsky 1999, Cotner y Biddanda 2002). ¿Será este esquema adecuado para los lagos oligotróficos de alta montaña? En ambientes eutróficos, el porcentaje de fotosintatos liberados es baja y los requerimientos de nutrientes



procedentes del reciclado por la red microbiana son pequeños debido a la existencia de fuentes alóctonas de nutrientes minerales. La mayor parte del C fijado se invierte en crecimiento fitoplanctónico y fluye hacia niveles tróficos superiores siguiendo la cadena de pastoreo, que se potencia con respecto al bucle microbiano. Por tanto, en estos sistemas la necesidad de un estrecho acople entre bacterias y fitoplancton a través del C fotosintético excretado será mucho menor (Berman-Frank y Dubinsky 1999, Cotner y Biddanda 2002).

En la Figura anterior se ha representado esquemáticamente los procesos que intervienen en la interacción alga-bacteria y los factores que potencialmente afectan, y que serán tratados en esta Memoria de Tesis.

### **Sistema estudiado y justificación**

La Caldera es un pequeño lago oligotrófico de alta montaña, localizado en la vertiente sur de Sierra Nevada, a 3050 m sobre el nivel del mar, muy próximo al nivel de cumbres. La laguna se sitúa en un circo glacial, sobre un sustrato rocoso de naturaleza silíceo (micasquitos, cuarcitas) propio del manto del Mulhacén, perteneciente al complejo Nevado-Filábride de la zona Bética (Cordilleras Béticas). Tiene una superficie de alrededor de 2 ha, una profundidad máxima muy variable (2.5-14 m) dependiendo del régimen anual de precipitaciones, y una profundidad media de 4.3 m. La cuenca de captación es muy pequeña (alrededor de 14.6 ha), carece de afluentes o efluentes visibles, así como de vegetación litoral y macrófitos, por lo que las entradas de carbono orgánico alóctono son muy reducidas.

Posee las características propias de los sistemas oligotróficos de alta montaña: aguas transparentes, alcanzando hasta la profundidad máxima de la laguna la visibilidad del disco de Secchi y cerca del 10% de la intensidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR) incidente; valores de clorofila inferiores a  $2 \mu\text{g l}^{-1}$ ; concentraciones de fósforo total  $< 10 \mu\text{g l}^{-1}$  y una baja concentración de carbono orgánico disuelto (DOC) ( $\sim 0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ), en su mayor parte de origen autóctono, como indica la razón de fluorescencia  $F_{450}: F_{500}$  de aproximadamente 1.9 (Donahue et al. 1998, Reche et al. 2001). Durante el período libre de hielo (habitualmente desde Julio hasta principios de Noviembre) la laguna no muestra una clara estratificación térmica y la temperatura oscila

entre 4 °C después del deshielo y ~ 10-15 °C a mediados del período estival. La comunidad planctónica es muy simple, con ausencia total de peces y macrófitos. (Martínez 1977, Cruz-Pizarro 1981 a, b, Carrillo 1989, Carrillo et al. 1990 a, 1991 a, b, 1995, 1996 a, Echevarría et al. 1990, Reche 1995, Reche et al. 1996).

Las características descritas hacen a este ecosistema ideal para el estudio de la interacción alga-bacteria. Así, la ausencia de solapamientos en el tamaño del bacterioplancton heterotrófico (0.2-1  $\mu\text{m}$ ), del componente autotrófico (1-10  $\mu\text{m}$ ) y del zooplancton (>40  $\mu\text{m}$ ) permite la fácil segregación de estos componentes mediante filtración diferencial. Esto facilita la cuantificación de los flujos de C y nutrientes en cada compartimiento, así como el aislamiento de cada componente, necesario para el análisis experimental de los factores que afectan a su actividad. Su oligotrofia y escaso contenido de DOC, mayoritariamente de origen autóctono, hace al sistema más sensible al efecto de los nutrientes y del C de origen fotosintético sobre los procesos de la comunidad planctónica. Por último, este ecosistema es ideal para el estudio del impacto de la radiación solar sobre la actividad de cada componente de la comunidad pelágica y sobre el flujo de C entre el fitoplancton y las bacterias, ya que por su localización (alta montaña) recibe una elevada intensidad de radiación ultravioleta (Caldwell et al. 1980, Blumthaler et al. 1992).

### **Conocimientos previos de la interacción alga-bacteria en La Caldera**

Estudios previos realizados en La Caldera concernientes a la interacción fitoplancton-bacterias mostraron la existencia de una relación positiva de los parámetros estructurales (biomasa y abundancia) entre algas y bacterias a lo largo de una escala estacional, que no se mantuvo para las producciones primaria y bacteriana. El hecho de que la producción autotrófica no fuera un buen predictor de la producción bacteriana, y que el suministro de C orgánico (tasa de exudación desde el fitoplancton) excediera los requerimientos bacterianos de C, no permitió confirmar la dependencia del bacterioplancton del C orgánico fotosintético, a pesar de que esto era lo esperado en un sistema como La Caldera, por las características descritas arriba (Reche et al. 1996).

Se propuso que el bacterioplancton podía estar controlado por otro factor que también influenciara en la comunidad autotrófica. Un conjunto de resultados

experimentales pusieron de manifiesto que el fósforo, fundamentalmente el procedente del reciclado del zooplancton, podía ser este factor, ya que era un macronutriente limitante en el sistema (Carrillo et al. 1996 a), condicionaba la sucesión estacional del fitoplancton (Carrillo et al. 1995, Villar-Argaiz et al. 2001) y satisfacía las demandas mínimas de algas y bacterias de este elemento (Reche et al. 1997). Villar-Argaiz et al. (2001) mostraron que las fuentes de P que cubrían las demandas mínimas de este nutriente del fitoplancton y del bacterioplancton (calculadas a partir de valores de producción y razón C:P) eran, en orden de importancia, las entradas atmosféricas, el reciclado de zooplancton y los procesos de deshielo.

Un conjunto de experimentos mostró un incremento de la producción autotrófica y bacteriana en tratamientos con zooplancton concentrado, como resultado del crecimiento compensatorio estimulado por el reciclado de nutrientes desde el zooplancton, indicando el papel del P reciclado como regulador del crecimiento algal y bacteriano (Reche et al. 1997). Otro resultado llamativo fue la disminución de la disponibilidad de C orgánico para el crecimiento del bacterioplancton en los tratamientos experimentales con zooplancton (Reche et al. 1997), así como tras un pulso de P (Villar-Argaiz et al. 2002 b), consistente con un mejor acople entre fotosíntesis y crecimiento algal (Berman-Frank y Dubinsky 1999). Esta respuesta del fitoplancton puede funcionar como una estrategia de control por parte de las algas que permita modular su interacción con las bacterias desde una competencia por el P a un comensalismo por C orgánico, al reducir el suministro de C orgánico (Reche et al. 1997, Villar-Argaiz et al. 2001).

Este conjunto de resultados indican la complejidad de la interacción entre algas y bacterias, al menos en sistemas como La Caldera, donde las fluctuaciones de las condiciones ambientales asociadas a procesos meteorológicos pueden condicionar la naturaleza e intensidad de la interacción alga-bacteria.



## OBJETIVOS

Puesto que las condiciones de oligotrofia imponen una serie de restricciones importantes al flujo de carbono en ecosistemas acuáticos, en esta Tesis nos proponemos analizar en profundidad los factores que regulan la interacción alga-bacteria como proceso bisagra que determina la importancia relativa del bucle microbiano y la cadena de pastoreo.

Dentro de este marco, desarrollamos como objetivos específicos:

1. Análisis estacional e interanual de la estructura y dinámica de la red trófica pelágica, en relación con los regímenes de precipitación atmosférica (Capítulo III).
2. Importancia de la escala de análisis en los procesos que rigen la interacción comensalista alga-bacteria: escala espacial y temporal (diaria, estacional e interanual) (Capítulo IV).
3. Evaluación experimental *in situ* de los efectos del espectro de radiación solar sobre la actividad fitoplanctónica, bacteriana e interacción alga-bacteria (Capítulo V).
4. Análisis de los efectos interactivos entre la calidad de la luz y la disponibilidad de nutrientes limitantes (P) sobre la producción primaria, bacteriana e interacción alga-bacteria en condiciones de alta intensidad de radiación solar (Capítulo VI).
5. Respuesta bacteriana al espectro de radiación: modulación por algas y nutrientes limitantes (Capítulo VII).
6. Cuantificación de la capacidad bacterívora (mixotrofia) del fitoplancton en condiciones de luz vs. oscuridad (Capítulo VIII).



## CAPÍTULO II

---

### **Materiales y métodos**

Lo que llevé a cabo movido por la ira,  
creció con ímpetu de la noche a la mañana,  
mas no perduró en la lucha con los elementos.

Lo que sembré movido por el amor,  
germinó con firmeza y maduró pausado,  
y gozó de la bendición del cielo.

Peter Rosegger (1843-1918)

Los materiales y métodos generales comunes a dos o más Capítulos de la presente Memoria de Tesis Doctoral se abordan de forma conjunta en este Capítulo. Todos los procedimientos y protocolos utilizados fueron básicamente los recomendados en el Proyecto Europeo *Mountain Lake Research* (MOLAR), descritos en Straskrabová et al. (1999 a).

## **PRECIPITACIONES ATMOSFÉRICAS**

Los valores de precipitación diaria a lo largo de los años de estudio se obtuvieron a partir de la media de 6 estaciones meteorológicas localizadas en una altitud comprendida entre 2500 y 3000 m. Las muestras de agua precipitada fueron recogidas diariamente en colectores de un tamaño de  $0.45 \times 0.45$  m, excepto durante el período invernal, cuando se utilizaron colectores especiales para nieve. Todos estos datos, junto con las precipitaciones medias de los últimos 40 años, fueron cedidos por Sierra Nevada S.A.

## **ANÁLISIS DEL PERFIL VERTICAL**

Durante el período estival de los años 1995, 1996, 1997, 1998 y 1999 se realizaron muestreos semanales (quincenales en 1998 y mensuales en 1999) en la zona de mayor profundidad de la laguna, en un ambiente de características esencialmente pelágicas. Los muestreos se iniciaron cuando la laguna permanecía entre el 75 y el 90% cubierta de hielo y nieve (desde finales de Mayo en 1995; principios de Julio en 1996-98) y se extendió durante todo el período estival, hasta la caída de las primeras precipitaciones en forma de nieve (principios de Noviembre). Los muestreos se realizaron entre las 11:00 y 13:00 h locales.

Las profundidades de muestreo fueron 3 en los años secos 1995 y 1999 (0.5, 1 y 2 m) y 4 en los años húmedos 1996-98, dependiendo de la profundidad de la laguna (0.5, 3, 5 y 10-12 m).

## VARIABLES ESTRUCTURALES

### *Variables físicas, químicas y biológicas: toma de muestras*

Para cada día de muestreo, se cuantificaron las siguientes variables: temperatura, pH, oxígeno ( $\text{mg l}^{-1}$ , % saturación) y conductividad. Las medidas se realizaron a intervalos de 30-50 cm utilizando una sonda multiparamétrica (YSI, Yellow Spring Instruments). Paralelamente, se midió el perfil de atenuación de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) con un contador esférico de fotones (LiCor LI 193SA).

Las muestras de agua para las determinaciones químicas (realizadas por triplicado) y biológicas se obtuvieron de las distintas profundidades utilizando una botella Van Dorn horizontal (6 l capacidad). De cada profundidad se extrajeron:

- a) Submuestras de 50 ml, recogidas en botellas de vidrio Pyrex<sup>®</sup>, para el análisis de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT).
- b) Submuestras de 50 ml, filtradas *in situ* a través de portafiltros desechables de  $0.45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Minisart<sup>™</sup>, Sartorius<sup>®</sup>) y recogidas en botellas Pyrex<sup>®</sup>, para el análisis de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), fósforo reactivo soluble (SRP; fijado con 1 ml de  $\text{S}_2\text{HO}_4$  0.09 N), nitrógeno disuelto total (NDT) y fósforo disuelto total (PDT).
- c) Un volumen de 3 l en botellas de PET para la determinación de la clorofila *a*. El agua se filtró sobre filtros Whatman<sup>®</sup> GF/F y el refiltrado se utilizó para llevar a cabo los análisis de la alcalinidad, nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ).
- d) Submuestras de 130 ml de agua fijada con Lugol acético (aprox. 1% v/v de concentración final) para la cuantificación del fitoplancton.
- e) Submuestras de 130 ml de agua fijada con solución formaldehído-tampón cacodilato para la cuantificación del picoplancton autótrofo.
- f) Submuestras de 130 ml y de 20 ml (en botes esterilizados, tipo penicilina), fijadas con formaldehído neutralizado y filtrado por  $0.2 \mu\text{m}$  (concentración final 2%) para la cuantificación de nanoflagelados heterotróficos (HNF) y bacterioplancton, respectivamente.

- g) Submuestras de 1 litro de agua fijada con Lugol acético (aprox. 1% v/v de concentración final) para la cuantificación de ciliados.
- h) Un volumen mínimo de 12 litros de agua para la cuantificación de zooplancton. Este volumen se filtró sobre una malla de nylon de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro que fue inmediatamente fijada con formaldehído (4% de concentración final).

Todo el material utilizado en la toma de muestras y en el procedimiento de laboratorio para la determinación de las variables químicas y de los procesos biológicos fue previamente lavado con ácido y enjuagado con agua bidestilada.

### ***Variables físicas, químicas y biológicas: determinaciones en laboratorio***

#### *Compuestos de Fósforo*

La determinación de fósforo reactivo soluble (SRP) se realizó según el método propuesto por Murphy y Riley (1962). El ión fosfato reacciona con molibdato amónico en medio ácido para dar ácido fosfomolibdico que se reduce a continuación con ácido ascórbico a azul de molibdeno, cuya intensidad de coloración azul se mide por espectrofotometría a 885 nm. En el método se incluyó la adición de tartrato de antimonio y potasio para evitar la interferencia potencial de otros aniones, especialmente los silicatos. Las muestras se midieron utilizando cubetas de 10 cm de cuarzo, lo que dota al método de mayor sensibilidad. El límite de detección del método es de 0.9  $\mu\text{g P l}^{-1}$ .

El fósforo total (PT) y el disuelto total (PDT) se determinaron espectrofotométricamente como ión fosfato en cubetas de 10 cm a 882 nm (APHA 1992). Previamente las muestras fueron oxidadas con 7 ml de mezcla oxidante (persulfato potásico, ácido bórico e hidróxido sódico) en autoclave durante 30 minutos a 120°C. El límite de detección del método es de 1  $\mu\text{g P l}^{-1}$ .

El fósforo particulado (PPa) se calculó como diferencia entre PT y PDT.

#### *Compuestos de Nitrógeno*

El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se determinó siguiendo el método de azul de indofenol (Rodier, 1981). En un medio alcalino y en presencia de nitroprusiato, los iones amonio reaccionan

con una solución de hipoclorito sódico y fenol dando lugar a un compuesto de color azul, de intensidad directamente proporcional a la cantidad de amonio en la muestra. Su determinación espectrofotométrica se realizó en cubetas de 4 cm a 640 nm. El límite de detección del método es de  $2 \mu\text{g N l}^{-1}$ .

Para llevar a cabo la determinación de los iones nitrito  $\text{NO}_2^-$  se utilizó el método propuesto por Shinn (1941). Según este método, los  $\text{NO}_2^-$ , al reaccionar con sulfanilamida, dan lugar en medio ácido a un compuesto diazo que reacciona con N-1-naftilendiamina dihidrocloruro. Como resultado se obtiene un compuesto de coloración rosácea que se mide espectrofotométricamente a 543 nm en cubetas de 4 cm de recorrido óptico.

Los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) se determinaron por cromatografía iónica (Dionex, DW 300), utilizando un bucle de 100  $\mu\text{l}$ . La sensibilidad mínima del aparato es de 10 ppb de  $\text{NO}_3^-$ . El nitrógeno disuelto inorgánico (DIN) se calculó como la suma de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ .

Las muestras para el análisis de nitrógeno total (NT) y disuelto total (NDT) fueron digeridas con una mezcla oxidante siguiendo el mismo procedimiento señalado para el fósforo total, de forma que los distintos compuestos de nitrógeno se oxidaron a nitratos. Posteriormente, la lectura de este ión se realiza por espectrofotometría a 220 nm (APHA, 1992). El límite inferior del método es de  $40 \mu\text{g N l}^{-1}$ .

El nitrógeno particulado (NPa) se calculó como diferencia entre NT y NDT.

### *Parámetros biológicos*

La determinación de la concentración de clorofila *a* se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Jeffrey y Humphrey (1975). Para ello, la clorofila retenida sobre los filtros GF/F fue extraída en acetona (90%) durante 24 h, a  $4^\circ\text{C}$  y en oscuridad. En un espectrofotómetro Perking-Elmer UV-VIS se midieron las absorbancias del extracto a 663, 647, y 630 nm, así como a 750 nm (como medida correctora de turbidez). Posteriormente el extracto fue acidificado (pH 2) con HCl 1N. La absorbancias del extracto acidificado a 663 nm y 750 nm se utilizaron para corregir la absorbancia a 663 nm debida a feopigmentos.

La concentración de clorofila se obtiene de la expresión:

$$\text{Chla } (\mu\text{g l}^{-1}) = [11.85 (\text{Abs}_{663} - \text{Abs}_{750}) - 1.54 (\text{Abs}_{647} - \text{Abs}_{750}) - 0.08 (\text{Abs}_{630} - \text{Abs}_{750})] \times V_{\text{ext}} V_{\text{f}}^{-1} \text{Lc}^{-1}$$

donde  $\text{Abs}_{\text{xxx}}$  son las absorbancias medidas para cada longitud de onda respectiva,  $V_{\text{ext}}$  es el volumen (ml) del extracto;  $V_{\text{f}}$ , el volumen (l) de agua del lago filtrada;  $\text{Lc}$ , la longitud (cm) de la cubeta del espectrofotómetro.

El cálculo de la abundancia de fitoplancton se realizó siguiendo el método propuesto por Uthermöl (1958). Tras la sedimentación de una alícuota de 50 ml de muestra en una cámara compuesta Uthermöl durante 48 h para asegurar la sedimentación de las células más pequeñas (Margalef 1969), se contaron los individuos de 100 campos elegidos al azar, o al menos 400 células de las especies más abundantes en un microscopio invertido (Leitz, Fluovert FS), como recomiendan Sandgren y Robinson (1984). El cálculo de la abundancia celular se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$N = (C \times S_1) \times (n^{\circ} \text{ campos} \times S_2 \times V)^{-1}$$

donde  $N$  es el n° de células  $\text{ml}^{-1}$ ,  $C$ , el n° células contadas;  $S_1$ , la superficie efectiva de la cámara de sedimentación ( $\text{mm}^2$ ),  $S_2$ , la superficie campo óptico ( $\text{mm}^2$ );  $V$ , el volumen corregido de la muestra sedimentada (ml).

El biovolumen celular se estimó a partir de medidas realizadas con un analizador de imágenes (Leica, Quantimet 500) sobre al menos 20 células por especie y muestra. El cálculo se realizó por aproximación de la forma celular de cada especie a su forma geométrica ideal (Willen 1976, Rott 1981, Butterwick et al. 1982) y siguiendo las propuestas para las especies de La Caldera por Carrillo (1989). Finalmente, el biovolumen celular fue convertido a carbono usando los factores de conversión propuestos por Rocha y Duncan (1985) para los grupos fitoplanctónicos principales.

La abundancia del picoplancton autótrofo se obtuvo por conteo directo de células  $< 1 \mu\text{m}$  dotadas de autofluorescencia utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leitz, Fluovert FS), equipado con un bloque de filtros Ernst Leitz (BP 420-490/DM 510/LP 515). Para ello, se concentraron 5-20 ml de cada muestra fijada (tampón formaldehído-cacodilato 1% c.f.) sobre filtros oscuros de policarbonato (Black Nuclepore<sup>®</sup>) de  $0.2 \mu\text{m}$  de diámetro de poro, se montaron en portaobjetos y se procedió al recuento de al menos 100 campos elegidos al azar. Las muestras, fijadas inmediatamente tras su toma, fueron contadas dentro de un plazo máximo de una semana, para evitar que



la degradación de la clorofila y su pérdida de autofluorescencia condujera a una subestima del picoplancton autótrofo (Straskrabová et al. 1999 a).

La abundancia del bacterioplancton (BAC) y de nanoflagelados heterotróficos (HNF) se obtuvo por conteo directo en microscopía de epifluorescencia (Leitz, Fluovert FS) equipado con un bloque de filtros Ernst Leitz (BP 340-380/DM 400/LP 425). La tinción de las muestras se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Porter y Feig (1980), que de forma básica consiste en:

1. Concentración de la muestra mediante filtración en colector múltiple Millipore<sup>®</sup> (presión inferior a 100 mm Hg) a través de un filtro oscuro de policarbonato (Black Nucleopore<sup>®</sup>) de 0.2  $\mu\text{m}$  (para BAC) ó 1  $\mu\text{m}$  (para HNF) de diámetro poro, hasta dejar 2 ml en cada colector.
2. Adición del fluorocromo 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a cada colector, hasta una concentración final mínima de 0.2% p/v. Incubación en oscuridad durante 10-15'.
3. Filtración completa (presión inferior a 100 mm Hg).
4. Montaje del filtro en un portaobjetos, utilizando aceite de inmersión para epifluorescencia (Reichert<sup>™</sup>).

Se contaron un mínimo de 400 células de bacterias y 100 campos para HNF por muestra, eligiendo los campos al azar. La abundancia de BAC se obtuvo a partir de la siguiente expresión (Jones 1979):

$$N = Y \times A \times (a \times V)^{-1}$$

donde N es el número de células  $\text{ml}^{-1}$ ; Y, el número medio de células por retícula; A, el área efectiva de filtración ( $\text{mm}^2$ ); a, el área de la retícula ( $\text{mm}^2$ ); V, el volumen corregido filtrado de la muestra (ml).

El biovolumen bacteriano se obtuvo a partir de células visualizadas en microscopio electrónico de transmisión (TEM). Previamente, muestras fijadas de bacterias tomadas en diferentes momentos del periodo estival fueron concentradas por filtración incompleta sobre filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  (Nucleopore<sup>®</sup>); el líquido restante se sometió a agitación sobre el mismo filtro con el objeto minimizar el número de bacterias adheridas al filtro, y posteriormente fue recogido en viales estériles, utilizando pipetas Pasteur estériles. A continuación, alícuotas de este concentrado de bacterias se

depositaron sobre rejillas de microscopía electrónica (rejilla 400Cu) recubiertas con una película de “colloidon”, y se tiñeron con uracil acetato al 1% c.f. Posteriormente, las bacterias se examinaron a 20,000 × y se fotografiaron junto con las rejillas estándar de calibración. Las imágenes fueron escaneadas y el biovolumen se calculó midiendo el diámetro celular (D) (formas cocoides), o el ancho (A) y longitud (L) (formas bacilares y filamentosas) de más de 30 células de cada tipo morfológico mediante el uso del software Corel™ Photo-Paint. El volumen ( $V$ ,  $\mu\text{m}^3 \text{cél}^{-1}$ ) de las formas cocoides se determinó aproximando su forma a una esfera:

$$V_{\text{coccos}} = \pi D^3/6$$

y el volumen de las formas bacilares y filamentosas se determinó aproximando su forma a una elipse:

$$V_{\text{b,f}} = \pi LA^2/6$$

La biomasa bacteriana ( $C$ ,  $\text{fg } C \text{cél}^{-1}$ ) se estimó a partir del volumen celular bacteriano ( $V$ ) según la expresión de Norland (1993):

$$C = 120 * V^{0.72}$$

La cuantificación de la abundancia de bacterias durante parte de los años 1997 y 1998 se realizó también mediante citometría de flujo siguiendo básicamente la metodología propuesta por Button y Robertson (1993), con modificaciones. El citómetro utilizado fue un Becton Dickinson FACS Vantage equipado con un láser dual Coherent (395 y 488 nm) y una potencia máxima de 150 mW. Tras ajustar la señal del aparato a una escala logarítmica (Schmid et al. 1988), y fijar los filtros de ancho de banda a  $530 \pm 30$  nm y al rango de tamaño de  $0.2\text{--}1.2 \mu\text{m}$ , un volumen de 2 ml de muestra previamente teñida con naranja de acridina (0.02% c.f., procedimiento similar al de DAPI) permitió contar tres réplicas por muestra.

Para calcular la abundancia de bacterias totales a partir de los valores obtenidos por citometría de flujo se construyó una curva de calibración entre las bacterias contadas mediante microscopia de epifluorescencia ( $y$ ) y mediante citometría de flujo ( $x$ ) que resultó en la siguiente expresión y parámetros estadísticos:

$$y = 73746 + 0.834 x$$

$$(r = 0.95, p < 0.001, n = 30)$$

La abundancia de HNF se obtuvo a partir de una expresión análoga a la utilizada para el fitoplancton (ver arriba), sólo que en este caso  $S_1$  se refiere a la superficie efectiva del filtro ( $\text{mm}^2$ ). La cuantificación de HNF se realizó dentro de un plazo máximo de 1 mes tras la toma de las muestras, para evitar que la degradación de la clorofila y la pérdida de autofluorescencia condujera a la obtención de falsos HNF. Como procedimiento paralelo, los HNF se identificaron siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para el fitoplancton y las recomendaciones de carácter citotaxonomico por Dr. Sánchez-Castillo (comunicación personal). El volumen celular de cada una de las especies identificadas se estimó por aproximación a su forma geométrica ideal, midiendo las dimensiones apropiadas de al menos 10-20 células por muestra con un analizador de imágenes Leica, Quantimet 500. El volumen celular fue convertido a biomasa usando un factor de conversión de  $220 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$  (Borsheim y Bratbak 1987).

Para determinar la abundancia de ciliados se procedió a la sedimentación de 1 l de muestra durante 72 h. A continuación se retiró la mayor parte del líquido sobrenadante desde su superficie con una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío a presión muy baja para evitar la resuspensión, hasta reducir la muestra a 100 ml. Finalmente, ésta se sedimentó en cámaras Uthermöl para el recuento y medida de los organismos. La abundancia de ciliados se calculó a partir de recuentos de la placa de sedimentación completa, tras corregir el volumen debido al fijador. El biovolumen celular se estimó a partir de medidas del diámetro celular (usando un analizador de imágenes Leica, Quantimet 500) y ajustando su forma a una esfera. El volumen celular fue corregido con un factor de 1.4 debido a la contracción de la fijación con Lugol (Möller y Geller 1993), y convertido a carbono usando un factor de conversión de  $140 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$  (Putt y Stoecker 1989).

El cálculo de la abundancia del zooplancton se realizó siguiendo el método propuesto por Uthermöl (1958). Tras la sedimentación en cámaras compuestas Uthermöl durante 24 horas, los organismos fueron identificados y contados utilizando un microscopio invertido (Olympus CK2). Al menos 20 individuos fueron medidos (con un analizador de imágenes Leica, Quantimet 500) para cada especie y para cada uno de los estadios de desarrollo del copépodo calanoide *Mixodiptomus laciniatus*. La biomasa zooplanctónica fue estimada a partir de las relaciones longitud-peso seco propuestas en la literatura (Botrell et al. 1976, Ruttner-Kolisko 1977), a excepción de la biomasa de *M. laciniatus* que se estimó a partir de las relaciones propuestas por Carrillo et al. (2001) y Villar-Argaiz et al. (2002 a).

## VARIABLES FUNCIONALES

### *Producción primaria, excreción algal de carbono orgánico y su reasimilación bacteriana*

La producción primaria se midió utilizando la técnica del  $^{14}\text{C}$  (Steemann–Nielsen, 1952). Para cada determinación, se añadió 10  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  de una ampolla de 20  $\mu\text{Ci ml}^{-1}$  (actividad específica = 8.4  $\text{mCi mmol}^{-1}$ , NEN Dupont) a cada una de las botellas experimentales (tres botellas claras y una oscura, de 130 ml). Éstas se incubaron *in situ* durante 4 horas, en posición horizontal. Después de la incubación, las muestras se mantuvieron en oscuridad y en frío hasta su posterior tratamiento en laboratorio, aproximadamente 2 horas más tarde. Un análisis comparativo previo entre muestras tratadas *in situ* y en el laboratorio no mostró diferencias significativas entre ellas (Reche 1995).

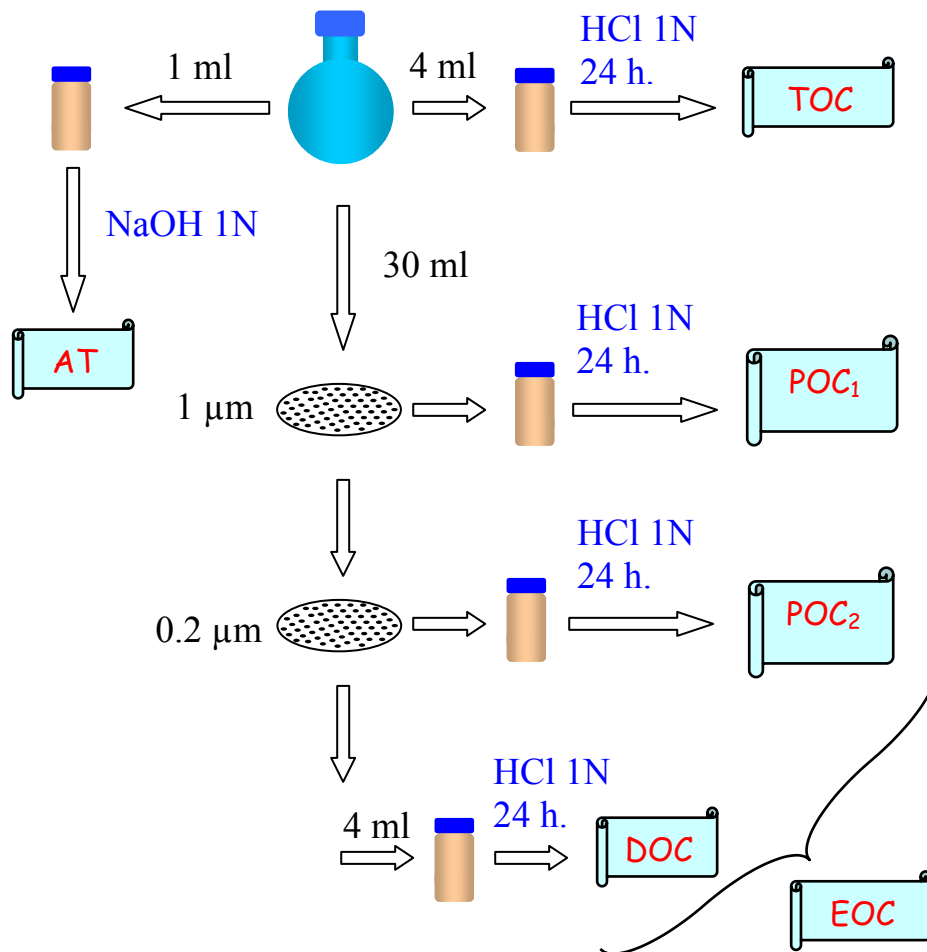
La actividad total (AT),  $^{14}\text{C}$  disponible, se midió tomando un testigo de 1 ml de la muestra a la que se le añadía 1 ml de  $\text{NaOH}$  1N para evitar la liberación de  $^{14}\text{C}$  inorgánico al añadir el líquido de centelleo (con un pH más ácido).

La producción primaria (PP) fue medida como carbono orgánico total producido (TOC) tras acidificar una submuestra de 4 ml en un vial de centelleo de 20 ml (100  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCl}$  1N,  $\text{pH} < 2$ ) que se dejaba abierto en una campana extractora durante 24 h (sin burbujear), para retirar los restos de  $^{14}\text{C}$  inorgánico, tal y como Lignell (1992) recomienda.

La producción primaria particulada se determinó filtrando una alícuota de 60 ml a través de un filtro Nuclepore<sup>®</sup> de 1.0  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (carbono orgánico particulado  $> 1 \mu\text{m}$ ,  $\text{POC}_1$ ) y el filtrado (filtración en serie) a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  (carbono orgánico particulado 0.2-1  $\mu\text{m}$ ,  $\text{POC}_2$ ). Para minimizar la ruptura de células, la filtración se realizó a baja presión ( $< 100 \text{ mm Hg}$ ). Los filtros se dispusieron en viales de centelleo y el  $^{14}\text{C}$  inorgánico se retiró añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCl}$  1N. Por último, para la determinación del carbono orgánico disuelto producido (DOC), se recogió una alícuota de 4 ml del filtrado resultante  $< 0.2 \mu\text{m}$  en un vial de centelleo y se trató de igual forma que el TOC. Posteriormente se añadió líquido de centelleo (Beckman Ready Safe) a todos los viales y tras 12 h se midieron con un contador de centelleo provisto de autocalibración (Beckman LS 6000TA).

# PRODUCCIÓN PRIMARIA

## Procedimiento analítico



El carbono orgánico producido se calculó siguiendo la expresión:

$$\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1} = \text{dpm} \times \text{CO}_2 \times 1.05 \times 1.06 \times k_1 \times k_2 \times k_3 \times \text{AT}^{-1}$$

donde dpm representa la diferencia entre los valores de dpm de las botellas claras – dpm de la botella oscura;  $\text{CO}_2$ , el  $^{12}\text{CO}_2$  total disponible expresado en  $\text{mg l}^{-1}$ ; 1.05 es un factor que corrige la velocidad de asimilación entre el isótopo 12 y 14 del C; 1.06 es un factor que corrige las pérdidas por respiración;  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  son tres factores que permiten ajustar el volumen filtrado a un litro, el tiempo de incubación a una hora y las unidades, respectivamente; AT, la actividad total ( $\text{dpm ml}^{-1}$ ,  $^{14}\text{C}$  disponible). El  $^{12}\text{CO}_2$  total del agua se estimó a partir de las medidas de alcalinidad y pH (APHA 1992).

El hecho de que no se encontrara picoplancton autótrofo  $< 1 \mu\text{m}$  (tanto en muestras filtradas por  $1 \mu\text{m}$ , como sin filtrar), y que la filtración a través de  $1 \mu\text{m}$  (máximo 100 ml por filtro) no supusiera una retención significativa de bacterias (*t*-test para muestras dependientes,  $p > 0.2 \mu\text{m}$ ,  $n=6$ ), implica que el  $^{14}\text{C}$  retenido sobre los filtros de  $0.2 \mu\text{m}$  se correspondió básicamente con los exudados de origen fotosintético incorporados por las bacterias heterotróficas.

La producción primaria (PP) se obtuvo de los valores de TOC ( $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), y la productividad primaria (PdP,  $\text{h}^{-1}$ ) se calculó a partir del cociente entre la PP ( $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y la biomasa fitoplanctónica ( $\mu\text{g C l}^{-1}$ ).

La excreción de C orgánico fotosintético (EOC) fue calculada, según Vadstein et al. (1989), como:

$$\text{EOC } (\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{POC}_2 + \text{DOC}$$

El porcentaje de exudados fotosintéticos excretados (%EOC) se calculó como:

$$\% \text{EOC} = \text{EOC} \times \text{PP}^{-1} \times 100$$

La eficiencia de asimilación bacteriana de exudados fotosintéticos (%PEA) se calculó como:

$$\% \text{PEA} = \text{POC}_2 \times \text{EOC}^{-1} \times 100$$

### ***Producción bacteriana y eficiencia de uso del C fotosintético***

La producción bacteriana (PB) se determinó utilizando la técnica de incorporación en el ADN bacteriano de timidina marcada (Fuhrman y Azam 1982, modificado según Servais et al. 1987). Para cada determinación, se añadió [metil- $^3\text{H}$ ] timidina (actividad específica = 76–82 Ci mmol $^{-1}$ , Amersham Pharmacia) a cada una de las botellas experimentales de 25 ml (6 réplicas + 4 blancos) hasta una concentración final de 10.9 nM. Las botellas experimentales se incubaron *in situ* durante 60 minutos. La concentración final de  $^3\text{H}$ -timidina fue saturante (para inhibir la síntesis de timidina *de novo* a partir de precursores no radiactivos) y el tiempo de incubación adecuado (la asimilación de  $^3\text{H}$ -timidina es lineal durante este período), según cinéticas previas realizadas para este mismo sistema (Reche 1995, Reche et al. 1996). Tras la incubación, el proceso de incorporación de timidina se detuvo con la adición de NaOH (concentración final de 0.25 N), produciéndose además la hidrólisis alcalina del ARN. Los blancos fueron fijados con NaOH (0.25 N, c.f.) previamente a la adición del radiotrazador. Posteriormente, en el laboratorio, se realizaron los siguientes tratamientos sobre las muestras:

1. Tratamiento con TCA frío. Permite cuantificar la cantidad de  $^3\text{H}$ -timidina incorporada en el total de macromoléculas bacterianas. A cada muestra se le añadió ácido tricloroacético (TCA) hasta una concentración final del 5% p/v (pH ~ 2) y se dejó actuar durante 20' en un lecho de hielo picado. El TCA provoca la precipitación de las proteínas y del ADN, precipitado que es recogido en un filtro Nucleopore<sup>®</sup> de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro mediante filtración de la muestra a baja presión (<100 mm Hg). Posteriormente, se enjuagaron los filtros 3 veces con 2 ml de TCA (5%) para retirar posibles restos de radioactividad no incorporada. Finalmente, la mitad de los filtros (3 muestras + 2 blancos) se recogieron en viales a los que se añadió líquido de centelleo (Beckman Ready Safe) para su posterior medida en un contador de centelleo provisto de autocalibración (Beckman LS 6000TA).
2. Tratamiento enzimático con ADNasa I (Robarts et al. 1986). Permite cuantificar la cantidad de  $^3\text{H}$ -timidina incorporada en macromoléculas bacterianas distintas del ADN. Sobre la otra mitad de los filtros (3 muestras + 2 blancos) se realizó una digestión enzimática con ADNasa I (Boehringer Mannheim). Para ello se neutralizaron los filtros con  $\text{KHCO}_3$  10 nM (2 veces con 2 ml) y a continuación se les añadió la solución enzimática de DNasa I (en tampón Tris-HCl, pH 7.5), que se dejó actuar durante 2 horas en agitación a 37 °C. Finalmente, los filtros se enjuagaron 2

veces con 2 ml de solución tampón Tris-HCl y se recogieron en viales de centelleo para su posterior medida en el contador de centelleo.

La tasa de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina (IT) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{IT (nmoles } ^3\text{H-timidina l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{dpm} \times k_1 \times k_2 \times (2.22 \times 10^6 \times \text{S.A.})^{-1}$$

donde dpm representa la diferencia entre los dpm de las muestras – dpm de los blancos;  $k_1$  es un factor que ajusta la medida de producción a una hora;  $k_2$  es un factor que corrige el volumen de la muestra a un litro; S.A., la actividad específica del material radioactivo ( $\mu\text{Ci nmol}^{-1}$ );  $2.22 \times 10^6$ , el factor que convierte los dpm en  $\mu\text{Ci}$ . La  $^3\text{H}$ -timidina incorporada en el ADN se determinó por diferencia entre los resultados obtenidos con los tratamientos TCA y ADNasa I (Servais et al. 1987, Torretón y Bouvy 1991).

El número de bacterias producidas por mol de  $^3\text{H}$ -timidina incorporado se estimó usando el factor de conversión de  $1.07 \times 10^{18}$  cél  $\text{mol}^{-1}$ , calculado para este sistema (ver más abajo). Finalmente, la cantidad de carbono bacteriano producido se estimó utilizando el factor de  $2 \times 10^{-14}$  g C cél $^{-1}$  (Lee y Fuhrman 1987). La productividad bacteriana (PdB) ( $\text{h}^{-1}$ ) se obtuvo del cociente entre la PB ( $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y la biomasa bacteriana ( $\mu\text{g C l}^{-1}$ ).

El carbono orgánico de origen fotosintético requerido por las bacterias heterotróficas (CARB) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{CARB } (\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{PB} \times (\text{POC}_2 \times \text{EOC}^{-1})^{-1}$$

donde PB es la producción bacteriana;  $\text{POC}_2$ , el C orgánico asimilado por la fracción bacteriana; EOC, el C orgánico excretado por las algas.

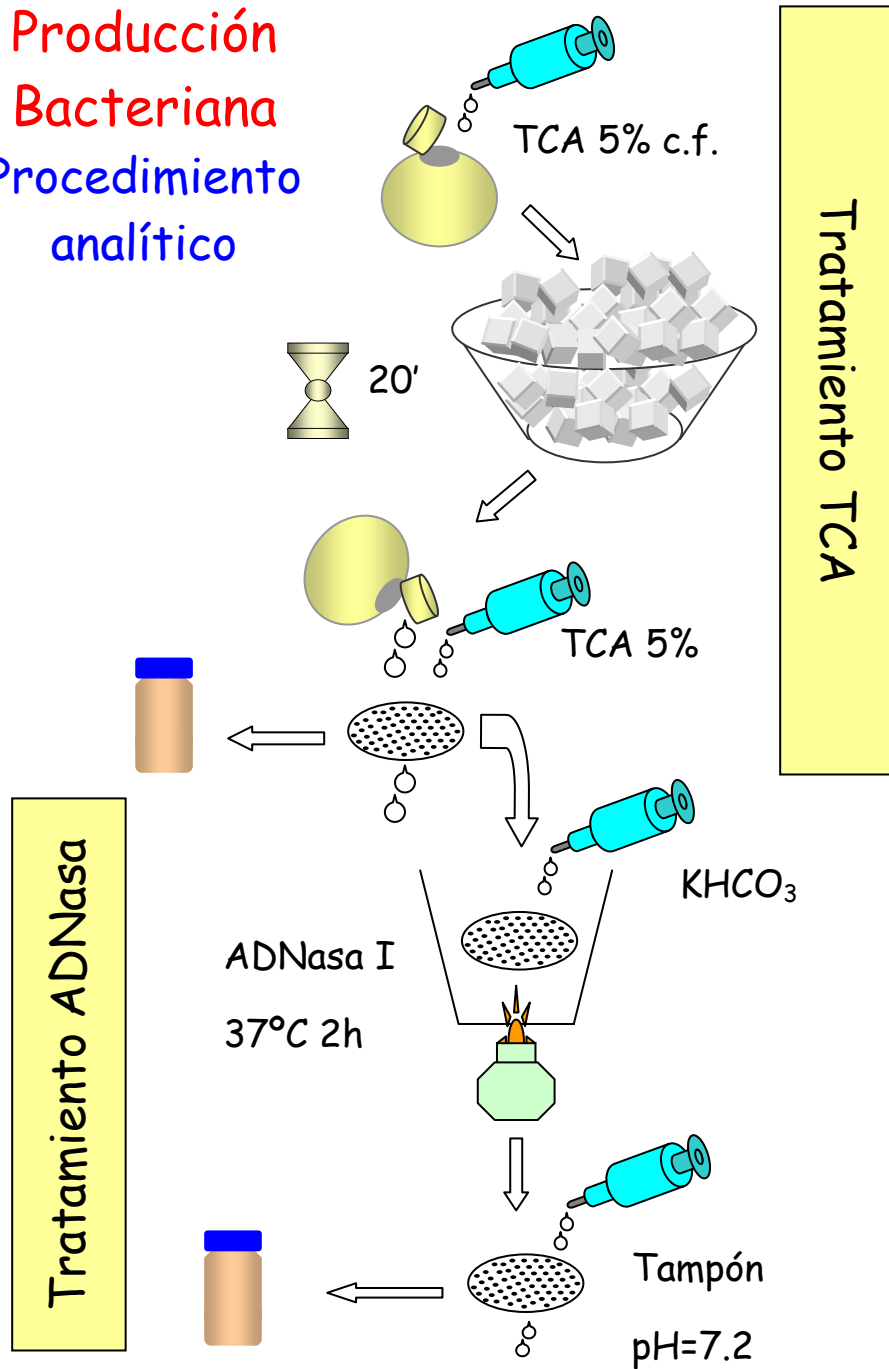
La eficiencia de uso de carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb) se calculó como:

$$\% \text{CUEb} = \text{PB} \times \text{EOC}^{-1}$$

Esta variable permite cuantificar la interacción alga-bacteria puesto que relaciona el C bacteriano producido (calculado usando un factor de conversión propio del sistema, ver abajo) con la disponibilidad de C orgánico de origen fotosintético, obtenidas ambas variables a partir de una misma comunidad planctónica y sometida a las mismas condiciones experimentales.



**Producción  
Bacteriana**  
Procedimiento  
analítico



## ***Determinación del factor de conversión bacteriana en La Caldera***

### *Introducción*

Diversos precursores bioquímicos marcados como  $^3\text{H}$ -timidina,  $^3\text{H}$ -leucina, etc., han sido ampliamente utilizados en Ecología Microbiana como trazadores para estimar la tasa de crecimiento de bacterias heterotróficas (revisión en Riemann y Bell 1990). El uso de estos trazadores presenta el problema de relacionar de una forma fiable las tasas de incorporación con las tasas de producción bacteriana, esto es, de células (o su equivalente en términos de C ó N) producidas por unidad de volumen o área y por unidad de tiempo (Kirchman y Ducklow 1993). Teóricamente es posible convertir las tasas de incorporación de estos trazadores en tasas de síntesis de las macromoléculas que los contienen, y de aquí en producción de biomasa, mediante el uso de los denominados ‘factores de conversión teóricos’. Sin embargo, para ello es necesario contar con una información precisa de los constituyentes celulares (ej. la cantidad de ADN y proteínas por célula, la razón timidina:ADN, etc.) que es difícil o imposible de obtener de forma rutinaria sobre comunidades naturales de bacterias.

Una aproximación alternativa consiste en estimar experimentalmente estos factores a través de la comparación directa entre la incorporación del trazador y el incremento de abundancia o biomasa bacteriana en el tiempo. El uso de estos ‘factores de conversión empíricos’ tiene la desventaja conceptual de que se ignora toda la información respecto a la fisiología y bioquímica de la síntesis macromolecular. Sin embargo, cuenta con diversas ventajas, como su obtención a partir de comunidades bacterianas naturales, propias de un ecosistema determinado, y el hecho de que su cálculo “corrige” los problemas metodológicos y conceptuales de los factores de conversión teóricos (Kirchman y Ducklow 1993).

Sin embargo, en condiciones naturales el crecimiento bacteriano está ligado a procesos compensatorios que suponen pérdida de biomasa (ej. depredación, agotamiento de recursos, etc.), determinando una relativa constancia de la abundancia bacteriana. Dado que para la determinación de un factor de conversión empírico es necesario obtener una medida absoluta de crecimiento bacteriano, es necesario reducir o eliminar los procesos que implican pérdidas de biomasa bacteriana. Esto se consigue mediante una serie de pretratamientos como (i) filtración para eliminar bacterívoros, (ii) dilución de la muestra original en agua filtrada de la muestra para reducir la densidad de bacterívoros y aliviar la competencia por los nutrientes, (iii) adición de nutrientes que puedan limitar

potencialmente el crecimiento bacteriano (Murray y Hodson 1985, Riemann et al. 1987, Coveney y Wetzel 1988, Kirchman y Ducklow 1993, Delille y Cahet 1997). Debido a estas manipulaciones, la tasa de crecimiento bacteriano puede variar con respecto a la existente en condiciones naturales, y aunque en la determinación del factor de conversión sería preferible que esto no ocurriera, lo que es realmente esencial es que no se altere la relación entre la incorporación del radiotrazador y la producción de biomasa bacteriana. Algunas investigaciones sólo han podido mostrar que algunas manipulaciones pueden (o no) afectar en diverso grado al valor del factor de conversión obtenido (Kirchman y Ducklow 1993).

### *Método*

El cálculo del factor de conversión (FC) se realizó siguiendo básicamente el protocolo descrito por Kirchman (1992), más detallado en Kirchman y Ducklow (1993). Para ello se construyó una muestra integrada de 24 l de agua del lago al mezclar en un recipiente opaco muestras tomadas con una botella Van Dorn horizontal de 6 l en cuatro profundidades (0.5 m bajo la superficie y sobre el fondo, y dos profundidades intermedias) y filtradas por una malla de nylon de 40  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Esta muestra integrada se trasladó al laboratorio en oscuridad y frío ( $\sim 5^\circ \text{C}$ ). Volúmenes de 2.5 l (por triplicado) fueron filtrados a través de filtros GF-F precombustionados a  $500^\circ \text{C}$  durante 12 h, con un tamaño nominal de poro de 0.8  $\mu\text{m}$ . Este procedimiento disminuyó la abundancia bacteriana en un 22 % aprox. y eliminó la práctica totalidad de los potenciales bacterívoros (incluso mixótrofos, Capítulo VIII). Dichos volúmenes fueron usados para llenar botellas oscuras de vidrio borosilicato (por triplicado), que constituyeron las botellas de incubación. A cada una de las botellas de incubación se les añadió inicialmente carbono orgánico (glucosa), nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y fósforo inorgánico ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ) hasta obtener unas razones molares iniciales C:N:P de 50:10:1, con una concentración de carbono orgánico disuelto (DOC) aprox. dos veces la del sistema (0.8  $\text{mg C l}^{-1}$ , Reche comunicación personal).

Las botellas de incubación se dispusieron en una cámara de cultivo en oscuridad a  $10 \pm 1^\circ \text{C}$ . Se tomaron muestras para medir la abundancia bacteriana (por triplicado) y para determinar las tasas de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina (TdR), siguiendo una cinética definida. El FC se calculó siguiendo el modelo de integración: el incremento de abundancia bacteriana ( $\Delta N$ , abundancia a tiempo final menos abundancia a tiempo

inicial), dividido entre las tasas de incorporación de TdR integradas en el tiempo del experimento, según la expresión:

$$\Delta N / \int \text{TdR dt}$$

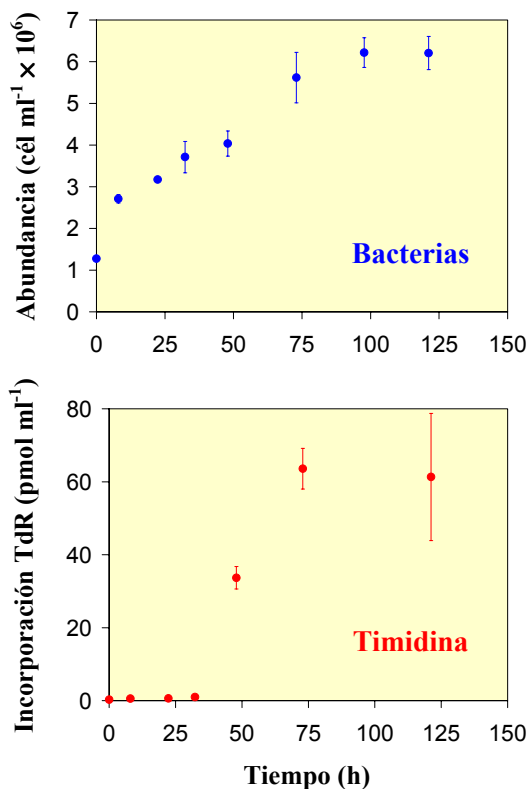
### *Resultado*

El valor obtenido de FC fue de  $1.07 \times 10^{18}$  cél mol<sup>-1</sup>. Las tasas de incorporación de TdR siguieron una cinética ajustada a un modelo logístico (Figura 2-1) y se correlacionaron bien con la abundancia bacteriana ( $r=0.89$ ,  $p=0.007$ ,  $n=7$ ).

### *Discusión*

El valor calculado se encuentra dentro del rango establecido en la literatura para sistemas oligotróficos y subpolares (Coveney y Wetzel 1988, Kirchman 1992, Delille y Cahet 1997). La adición de macronutrientes (C, N, P) se realizó con objeto de estimular el crecimiento bacteriano, paliando la severa limitación por P de este ecosistema (Capítulo III), y la ausencia de exudados frescos excretados por el fitoplancton (retirado con la filtración) y necesarios para el crecimiento bacteriano (Capítulo VII). Diversos estudios han mostrado que la adición de nutrientes orgánicos no afecta significativamente a los valores de factores de conversión obtenidos, tanto en aguas marinas subpolares (Kirchman 1992, Delille y Cahet 1997) como en lagos oligotróficos (Coveney y Wetzel 1988).

No obstante, Coveney y Wetzel (1988) encontraron que la adición de fosfato inorgánico (Pi) causaba la obtención de valores de FC más bajos, independientemente de la presencia de otros nutrientes orgánicos. Ello puede ser debido, en parte, a un proceso de sincronización del ciclo celular ocurrido tras el pulso de P, que puede sesgar el valor de FC si la incubación es finalizada inmediatamente después de una fase de replicación del ADN, resultando en una aparente baja producción de células en relación con la incorporación de TdR. No obstante, este efecto de sincronización puede ser descartado si existe una buena correlación entre la abundancia bacteriana y la tasa secuencial de incorporación de TdR, tal y como se obtuvo en nuestro estudio y en el de Coveney y Wetzel (1988). Asimismo, estos autores discuten sobre la importancia de la purificación del ADN durante el bioensayo, ya que, en otro caso, un incremento de la tasa de incorporación de TdR en macromoléculas diferentes del ADN puede conducir a la



**Figura 2-1.** Cinética experimental de la abundancia de bacterias y de la tasa de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina del bacterioplancton de La Caldera. Barras de error: medias  $\pm$  DE.

obtención de valores de FC anormalmente bajos (al no corresponderse la síntesis replicativa de ADN con la división celular). En nuestro estudio, la utilización de los tratamientos TCA (que precipita las proteínas y ácidos nucleicos) y ADNasa (que hidroliza específicamente el ADN), junto con la fijación previa con NaOH (que causa la hidrólisis básica del ARN) permite calcular por diferencia la tasa de incorporación de  $^3\text{H}$ -TdR exclusivamente en el ADN, evitando así un sesgo del FC hacia valores bajos.

Las condiciones de temperatura durante la incubación fueron similares a las de la laguna durante la época estival. No obstante, Delille y Cahet (1997) no encontraron variaciones significativas en los FC obtenidos bajo diferentes temperaturas de incubación ( $15\text{ }^\circ\text{C}$  vs.  $7\text{ }^\circ\text{C}$ ), ya que se estimularon proporcionalmente las tasas de incorporación de TdR y el crecimiento celular.

Por tanto, consideramos que nuestra aproximación experimental permitió obtener un valor de FC que representa la potencialidad de producción bacteriana a partir de las tasas de incorporación de TdR.



## CAPITULO III

---

### Estructura de la comunidad pelágica

...Y para que ninguna región careciera de sus formas propias de vida animada, las estrellas y las formas divinas ocuparon el suelo del cielo, el mar correspondió a los peces relucientes para que fuera su hogar, la tierra recibió a los animales y el aire móvil a los pájaros...

Ovidio (43AC - 17DC), *Metamorfosis*

## INTRODUCCIÓN

La comprensión de los factores que controlan las dinámicas del plancton han centrado tradicionalmente los estudios limnológicos. Se ha establecido que la sucesión estacional de las especies del fitoplancton es el resultado de complejas interacciones, donde factores internos físicos, químicos y biológicos juegan un papel clave (Reynolds 1989, 1990, Reynolds y Bellinger 1992). No obstante, existe un cierto grado de controversia sobre la importancia de los factores externos en la regulación de la estructura de la comunidad biológica. Así, mientras que unos trabajos evidencian que éstos ejercen un importante efecto (Elser et al. 1995 b, Morales et al. 1999, Straille 2000), otros lo encuentran minoritario (Sarnelle 1993, Berman et al. 1995). No obstante, la escala temporal de análisis puede ser determinante (Ruggiu et al. 1998). La influencia de los factores externos parecen ser más evidentes en lagos cerrados (Marsh y Lesack 1996), donde la renovación del agua es el resultado de procesos meteorológicos. Los modelos climáticos establecidos para Europa predicen una alta frecuencia e intensidad de episodios de sequía en las latitudes más bajas (Houghton et al. 1996), y puesto que en estas latitudes la dinámica estacional de especies fitoplanctónicas puede alejarse de los patrones establecidos para latitudes mayores (Pérez-Martínez y Sánchez-Castillo 2001, 2002), la investigación de los efectos ejercidos por las variaciones climáticas sobre la estructura y dinámica de la comunidad planctónica cobra una especial relevancia en el área Mediterránea.

Dentro de este marco de estudio, se ha avanzado en la cuantificación de las entradas de nutrientes minerales asociadas a eventos atmosféricos. En este sentido está documentado que los sistemas lacustres de Sierra Nevada, por su cercanía al continente africano y por su altitud, estarían muy influenciados por el polvo sahariano, especialmente rico en fósforo (Guerzoni et al 1997, Moulin et al. 1997 a, b, Morales-Baquero et al. 1999), por lo que constituye una importante fuente de nutrientes, particularmente para sistemas oligotróficos (Carrillo et al. 1990 b, Cole et al. 1990). El transporte de polvo sahariano ocurre de forma aleatoria y pulsada sobre La Caldera. Avila et al. (1997) evalúan que el material transportado oscila entre 2 y 25 g m<sup>-2</sup> en la zona del Mediterráneo occidental, alcanzando hasta 5.3 g m<sup>-2</sup> en el noreste de España, y cuyo contenido promedio en P es de un 0.35% (Guieu y Thomas 1996).

Asimismo, los patrones de circulación atmosférica provocan que la incidencia de las “lluvias rojas” (lluvias cargadas de material particulado de origen sahariano) sea mayor en primavera y verano, lo que refuerza el papel que éstas puedan desempeñar en



las dinámicas de las poblaciones fitoplanctónicas, particularmente en condiciones oligotróficas (Migon y Sandroni, 1999). De hecho, las incursiones de polvo sahariano son importantes a escala global desde Europa (Löye-Pilot et al. 1986, Alebicjuretic 1994, Yaalon 1997, Schwikowski et al. 1997, Psenner 1999) hasta la costa este del continente americano (Perry et al. 1997, Chiapello et al. 1997). No obstante, se ha puesto de manifiesto que las precipitaciones húmedas realizan un aporte inferior de polvo sahariano que las deposiciones secas, mucho más continuadas (Morales, comunicación personal). En este sentido, se ha calculado que las precipitaciones (deposiciones húmedas) contribuyen entre un 15% (noroeste del Mediterráneo) y un 33% (sudeste del Mediterráneo) al flujo total de P atmosférico, estando el resto asociado a deposiciones secas (Migon y Sandroni 1999). Por ello, se puede considerar que las precipitaciones húmedas en La Caldera suponen sólo una fracción de las entradas alóctonas totales de P.

Por otro lado, está actualmente establecido sobre un amplio rango de ecosistemas lacustres y marinos que la biomasa heterotrófica domina en los ecosistemas oligotróficos, donde existe un importante desarrollo del bucle microbiano en relación con la cadena de pastoreo, mientras que la biomasa autotrófica domina la estructura planctónica en los sistemas eutróficos (del Giorgio y Gasol 1995, Biddanda et al. 2001, Cotner y Biddanda 2002). Dentro del rango de oligotrofia, los lagos de alta montaña situados por encima de la línea de árboles se alejan de estos patrones generales (MOLAR Project), posiblemente debido a la escasa disponibilidad de carbono orgánico disuelto (generalmente  $<1 \text{ mg l}^{-1}$ ). Este tipo de lagos presentan comunidades planctónicas relativamente simples, por lo que su estructura puede ser una herramienta para evaluar la importancia de las fuerzas climáticas (régimen de precipitaciones, lluvias “rojas”) sobre los procesos biológicos. Por ello, los lagos de alta montaña se constituyen en ecosistemas idóneos “sensores” para el estudio de las relaciones que se establecen entre los componentes bióticos y abióticos (Neill 1988; MOLAR Project) mediados por factores externos.

En este capítulo proponemos como objetivos específicos:

1. Establecer el escenario de variabilidad estructural de la red trófica sobre una escala estacional e interanual en la laguna de La Caldera.
2. Analizar las relaciones entre los componentes bióticos y abióticos del ecosistema.
3. Analizar la influencia de las fluctuaciones del régimen de precipitaciones en los cambios interanuales de la comunidad planctónica.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

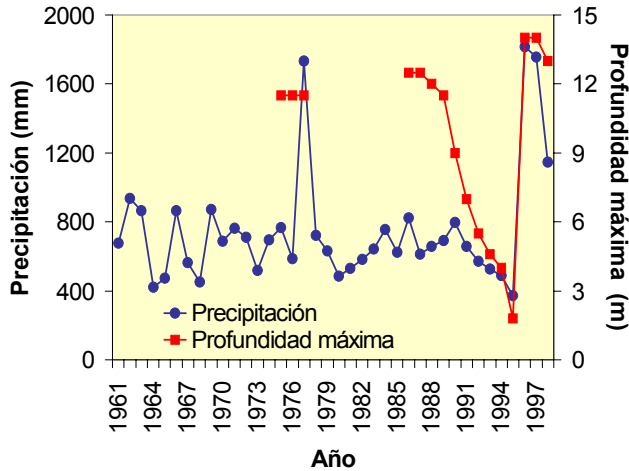
La toma de muestras y el procedimiento analítico ha sido detallado en el Capítulo II. En este Capítulo incluimos el análisis de los resultados correspondientes a los años 1995, 1996, 1997, en los que la toma de muestras se realizó con una resolución temporal más fina. Justificamos el análisis de cada año de forma independiente en las fuertes variaciones interanuales del régimen de precipitaciones y en las características físicas de la laguna que determinaron cambios acusados en la estructura planctónica.

La aproximación estadística seguida en este Capítulo ha consistido en análisis de regresión, con probabilidades ajustadas al test de Bonferroni, entre los factores físicos (temperatura), químicos (alcalinidad, nutrientes y razones DIN:PT, NT:PT) y biológicos que regulan cada nivel trófico, para cada uno de los años de estudio. Los grupos tróficos considerados fueron: productores primarios (FIT), bacterias heterotróficas (BAC), nanoflagelados heterotróficos (HNF), ciliados (CIL), metazooplancton (ZOO), microbacterívoros (MBV = HNF + CIL), bacterívoros (BV = HNF + CIL + ZOO), heterótrofos totales (HET = BAC + HNF + CIL + ZOO), comunidad planctónica total (BIO = FIT + HET).

## **RESULTADOS**

### **Caracterización abiótica**

Durante los años 1995, 1996 y 1997 la laguna de La Caldera experimentó drásticos cambios en su profundidad, como consecuencia de las variaciones registradas en el régimen pluviométrico (Figura 3-1). Desde 1991 se sucedieron una serie de años progresivamente más secos hasta 1995, cuando se registró un mínimo de precipitaciones anuales (375 mm), constituyendo el año más seco de las últimas 4 décadas. En el período estival de 1995 la profundidad máxima de la laguna alcanzó solamente 2 m. Además, el período libre de hielo fue mayor que el habitual, al abarcar desde mediados de Mayo hasta principios de Noviembre (más de 6 meses). El aumento de las precipitaciones durante 1996 y 1997, años excepcionalmente lluviosos, fue responsable de la recuperación de la profundidad máxima (14 m), que se mantuvo dentro de estrechos límites de variación durante ambos años. Además, el período libre de hielo abarcó 4 meses (Julio-Octubre).



**Figura 3-1.** Variación interanual del régimen de precipitaciones (1961-1998) en Sierra Nevada (Albergue Universitario, 2200 m) y de la profundidad máxima de La Caldera a comienzos del deshielo (1975-1998).

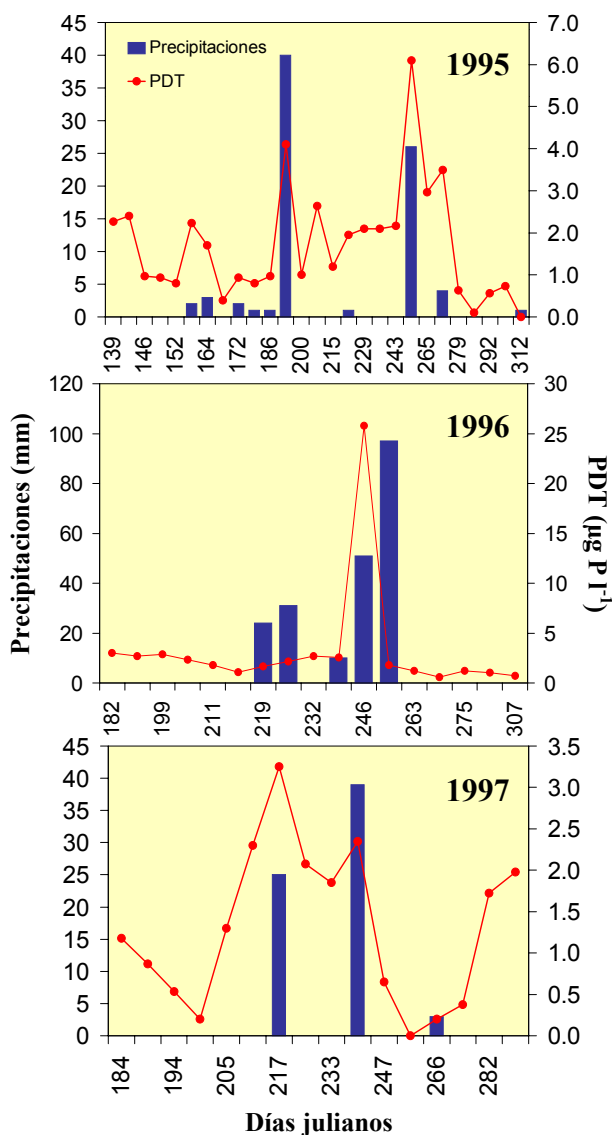
La estratificación térmica de la laguna fue débil durante el período libre de hielo y las diferencias en la temperatura del agua entre superficie y fondo no sobrepasaron los 2 °C, aunque puntualmente a mediados del período estival, se registraron diferencias de 3.5 °C en 1996 y 1997. En 1995 (año seco) la temperatura del agua experimentó un amplio rango de variación (4-18 °C), alcanzando los valores máximos descritos para La Caldera, consecuencia del

menor volumen del cuerpo de agua (y por tanto menor amortiguación térmica) y del incremento del período libre de hielo. En los años húmedos el rango de variación fue más estrecho (1996: 4-10°C; 1997: 4-12°C) y los valores máximos más bajos (Tabla 3-1).

Los valores de pH oscilaron entre 7.7 y 9.7 (media 8.5) durante 1995; entre 7.1 y 8.1 (media 7.7) durante 1996; y entre 7.5 y 8.9 (media 8.2) durante 1997, coincidiendo los valores máximos de pH con los porcentajes de saturación de oxígeno superiores al 100% (datos no mostrados). Los valores de alcalinidad durante 1996-1997 fueron bajos (0.25-0.42 meq l<sup>-1</sup>), muy constantes y similares a los obtenidos en estudios previos (Carrillo 1989, Sánchez-Castillo et al. 1989, Reche 1995), probablemente determinados por el asentamiento de la laguna sobre rocas de naturaleza básicamente silíceas.

La visibilidad del disco de Secchi (D<sub>s</sub>) alcanzó la profundidad máxima de la laguna durante todo el período estival de 1995 y durante el deshielo en 1996 y 1997. Se registraron descensos significativos de D<sub>s</sub> (~ 5 m) en 1996, inmediatamente tras eventos de precipitaciones atmosféricas (Septiembre).

Durante los años húmedos, las concentraciones de fósforo total (PT) variaron entre 1.4 y 7.3 µg P l<sup>-1</sup>. Sin embargo, se registró puntualmente un fuerte aumento (de casi 10 veces el promedio) de PT en Septiembre de 1996 (PT>32 µg P l<sup>-1</sup>; fósforo disuelto



**Figura 3-2.** Precipitaciones semanales y PDT en la laguna (promedio columna) en los tres años de estudio indicados.

total,  $\text{PDT} > 25 \mu\text{g P l}^{-1}$ ) como resultado de procesos de deposición de polvo sahariano, asociados a eventos atmosféricos. El fósforo particulado (PPa) constituyó la fracción dominante de P ( $>55\%$ ), excepto cuando las precipitaciones implicaron entradas importantes de fósforo atmosférico ( $\text{PP} < 20\%$ ,  $\text{PDT} > 80\%$ ). En promedio, la concentración de PT fue mayor en 1995 que en los años húmedos, variando entre 2.3 y  $16.3 \mu\text{g P l}^{-1}$ , siendo el PPa la fracción mayoritaria de P ( $>74\%$ ) para dicho año (Tabla 3-1).

En líneas generales, las precipitaciones atmosféricas supusieron una entrada alóctona de nutrientes (principalmente P), como indica la correspondencia de los máximos estacionales de PDT con los de precipitación (Figura 3-2), particularmente manifiesta en Septiembre de 1996.

El nitrógeno se encontró en su mayor parte como compuestos inorgánicos en 1996, y hasta mediados de Septiembre en 1997 (Tabla 3-1). De este modo, el nitrógeno inorgánico disuelto (DIN), representó el 50% o más del nitrógeno total (NT), excepto a finales del período estival de 1997 ( $\text{DIN} < 50\%$  del NT). Los valores de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN), y particularmente de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ),

presentaron una tendencia descendente a lo largo del verano de los años húmedos, que responde a un patrón más general ya establecido en el sistema (Carrillo et al. 1996 a), tendencia que no se observó en 1995 (Tabla 3-1). El nitrógeno particulado (NPa)

**Tabla 3-1.** Variaciones estacionales de temperatura y nutrientes en La Caldera. Valores medios mensuales para la columna de agua (rango entre paréntesis). Ver abreviaturas en texto.

Mes-año	T (° C)	NO <sub>3</sub> (µg N l <sup>-1</sup> )	DIN (µg N l <sup>-1</sup> )	NT (µg N l <sup>-1</sup> )	NPa (µg N l <sup>-1</sup> )	PT (µg P l <sup>-1</sup> )	PPa (µg P l <sup>-1</sup> )	DIN:PT	NT:PT
May-95	12.0 (10-14)	166.3 (105-253)	259.9 (122-535)	473.2 (324-571)	30.9 (0-74)	6.7 (5-10)	5.1 (3-7)	48.6 (33-73)	74.0 (56-102)
Jun-95	12.5 (10-13)	122.8 (110-139)	133.3 (113-146)	311.1 (253-386)	16.2 (0-63)	4.9 (4-6)	3.6 (3-5)	37.1 (25-48)	62.8 (55-70)
Jul-95	15.4 (13-18)	142.1 (134-161)	151.8 (141-179)	328.6 (269-380)	11.9 (0-32)	5.9 (5-8)	3.7 (1-5)	80.8 (28-224)	57.7 (45-71)
Ago-95	14.0 (13-16)	233.4 (198-271)	238.2 (204-274)	575.0 (387-842)	128.7 (0-319)	9.9 (7-13)	8.0 (6-11)	31.0 (23-38)	58.1 (42-73)
Sep-95	7.5 (7-8)	297.2 (280-320)	301.0 (287-321)	620.2 (589-682)	64.7 (0-160)	12.7 (10-16)	8.5 (7-10)	35.9 (31-40)	50.2 (42-59)
Oct-95	6.9 (5-9)	277.5 (270-285)	282.6 (273-289)	665.8 (563-943)	85.8 (49-107)	5.2 (3-7)	4.7 (2-6)	68.3 (49-114)	165.9 (85-377)
Nov-95	4.2	286.5	289.2	612.3	129.5	2.3	2.3	123.9	262.4
Jul-96	1.6 (1-3)	381.0 (310-490)	393.9 (333-501)	617.2 (479-865)	26.4 (0-84)	4.6 (4-5)	2.1 (1-3)	87.3 (66-122)	135.7 (106-180)
Ago-96	6.5 (4-10)	271.9 (216-313)	280.5 (231-317)	480.1 (442-525)	8.9 (2-18)	5.4 (5-6)	3.4 (3-4)	53.6 (37-71)	90.5 (77-113)
Sep-96	7.7 (6-10)	228.0 (219-252)	239.3 (224-262)	456.7 (436-505)	18.4 (2-38)	11.4 (4-32)	4.1 (3-6)	40.9 (8-61)	77.6 (16-112)
Oct-96	6.0 (5-7)	214.6 (212-217)	229.8 (225-234)	383.0 (375-391)	31.1 (0-62)	3.6 (3-4)	2.5 (2-3)	64.4 (58-71)	107.3 (96-119)
Jun-97	1.2 (1-2)	231.5 (207-256)	255.9 (223-289)	308.9 (265-353)	31.1 (30-32)	1.9 (1-2)	1.0 (0-2)	139.5 (117-162)	181.9 (107-257)
Jul-97	5.5 (3-9)	205.6 (163-254)	213.5 (169-266)	325.4 (251-477)	45.2 (19-60)	4.2 (3-5)	3.0 (2-4)	52.8 (36-78)	80.8 (53-140)
Ago-97	11.5 (11-12)	128.6 (82-158)	136.0 (84-169)	361.8 (281-464)	130.3 (71-227)	6.5 (5-7)	4.1 (3-5)	21.8 (11-29)	56.9 (39-78)
Sep-97	11.6 (11-12)	103.7 (76-137)	108.0 (77-143)	233.8 (198-294)	78.6 (47-138)	3.8 (3-5)	3.0 (3-3)	29.9 (17-44)	62.8 (47-81)
Oct-97	7.7 (8-8)	83.4 (79-89)	90.9 (89-93)	284.7 (175-393)	129.1 (37-244)	4.1 (3-5)	2.8 (3-3)	23.1 (19-31)	71.9 (38-95)

constituyó el 20-30% del NT en 1995 (desde finales de verano) y 1997 (casi todo el período libre de hielo), siendo <10% en la práctica totalidad de 1996.

De acuerdo con Morris y Lewis (1988), valores superiores a 12 en la razón DIN:PT (peso/peso) indican una intensa limitación por P. Ésta se extendió, por tanto, para la práctica totalidad del período libre de hielo de los tres años estudiados, excepto tras alguna entrada de P atmosférico (Tabla 3-1).

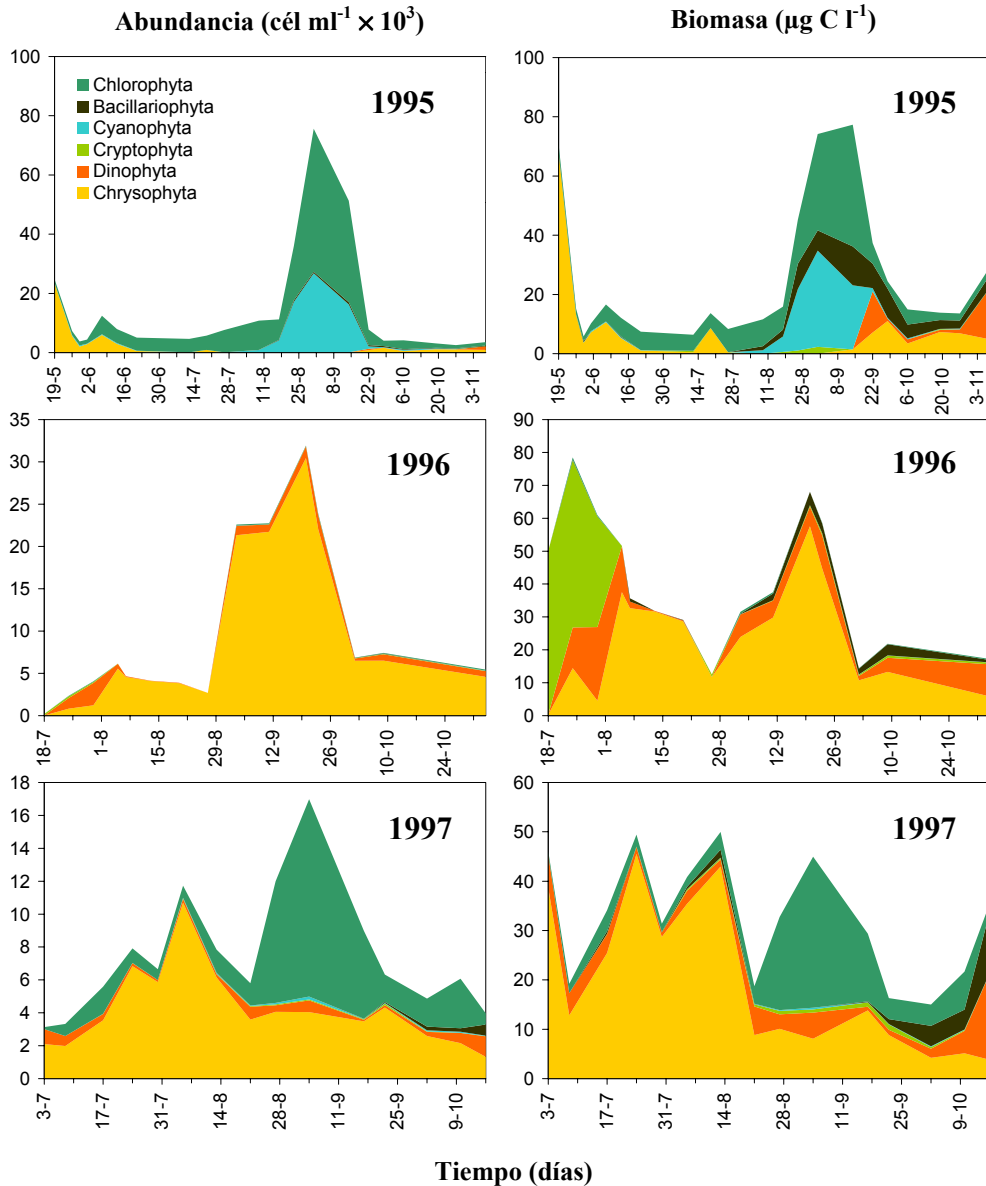
## Fitoplancton

El fitoplancton constituyó la mayor parte de la biomasa planctónica en 1996, con una menor representación en 1995 y 1997 (Figuras 3-3 y 3-4, Tabla 3.3). A lo largo del período de estudio, no se detectó la presencia de picoplancton autótrofo.

La sucesión estacional de la comunidad fitoplanctónica en 1995 muestra que, inmediatamente después del deshielo y hasta comienzos de Junio, las crisofíceas (principalmente *Chromulina nevadensis* y *Ochromomas* sp.) constituyeron el principal grupo que se desarrolló (>80% de la abundancia total). A partir de principios de Junio, las clorofíceas (*Chlorella* sp.) dominaron la comunidad fitoplanctónica. A mediados del verano la densidad del fitoplancton alcanzó sus valores máximos ( $>75 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup>), representando la cianofícea *Cyanarcus* sp. más del 40% de la abundancia total. Hacia finales del periodo libre de hielo, la abundancia del fitoplancton decreció ( $<4 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup>) y tanto *Chlorella* sp. como *Ochromonas* sp. dominaron la comunidad autotrófica (Figura 3-3). Otras especies, algunas de origen bentónico, también estuvieron representadas: *Amphidinium* sp. (dinofícea), *Navicula* sp. (diatomea), *Spirogyra* sp. (clorofícea).

En 1996, la comunidad fitoplanctónica estuvo dominada básicamente por *Chromulina nevadensis* durante la mayor parte del periodo libre de hielo, así como desde el deshielo hasta finales de Agosto en 1997, cuando fue sustituida por *Chlorella* sp., que llegó a ser la especie dominante. Las crisofíceas alcanzaron sus máximos de densidad ( $30.5 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup>) y biomasa ( $>55 \mu\text{g C l}^{-1}$ ) en Septiembre de 1996, inmediatamente después de una entrada de P atmosférico. Por el contrario, las densidades máximas de crisofíceas y clorofíceas descendieron en 1997 ( $10.7 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup> y  $12 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup>, respectivamente), representando entonces >80% y >60% de la biomasa total algal, respectivamente (Figura 3-3). Durante los años húmedos, otras especies menos representadas fueron *Amphidinium* sp. (dinofícea), *Rhodomonas minuta* (criptofícea), *Ochromonas* sp. (crisofícea) o *Cyanarcus* sp. (cianofícea).

La sucesión estacional del fitoplancton mostró el mismo patrón en todas las profundidades estudiadas en los años húmedos, con pequeñas diferencias en la distribución vertical de la abundancia y biomasa de los principales grupos tróficos. Entre éstas, señalar que las abundancias fitoplanctónicas más elevadas se alcanzaron en las capas superiores de la laguna después de una precipitación atmosférica durante los años húmedos. Por otro lado, destacamos un máximo de biomasa ( $257 \mu\text{g C l}^{-1}$ ) en 1996 en la



**Figura 3-3.** Variaciones estacionales en la abundancia y biomasa de los grupos fitoplanctónicos en los años de estudio. Valores promedio de la columna de agua.

capa más profunda de la laguna durante el deshielo, que se reflejó en el promedio de la columna de agua (Figura 3-3), debido al desarrollo de *Cryptomonas sp.* que, a pesar de su escasa abundancia (< 10%), posee un gran volumen celular ( $1730 \pm 300 \mu\text{m}^3 \text{cel}^{-1}$ ).

*C. nevadensis* presentó una morfología variable, con diferencias estacionales en su tamaño celular: células de mayor tamaño ( $30\text{-}40 \mu\text{m}^3 \text{cél}^{-1}$ ) con cloroplastos y pirenoides bien desarrollados durante el deshielo dieron paso de forma gradual a células de menor tamaño ( $5\text{-}8 \mu\text{m}^3 \text{cél}^{-1}$ ) que, en su mayoría (>70%), mostraron dendrículas que incrementaron su razón superficie:volumen.

### Bacterioplancton

La comunidad heterotrófica bacteriana de La Caldera estuvo constituida fundamentalmente por formas cocoides ( $0.01 \pm 0.004 \mu\text{m}^3 \text{cél}^{-1}$ ) y bacilares ( $0.05 \pm 0.02 \mu\text{m}^3 \text{cél}^{-1}$ ). Las bacterias filamentosas fueron escasas.

**Tabla 3-2.** Variaciones interanuales en la abundancia y biomasa bacteriana durante los tres años de estudio. Valores medios de la columna de agua.

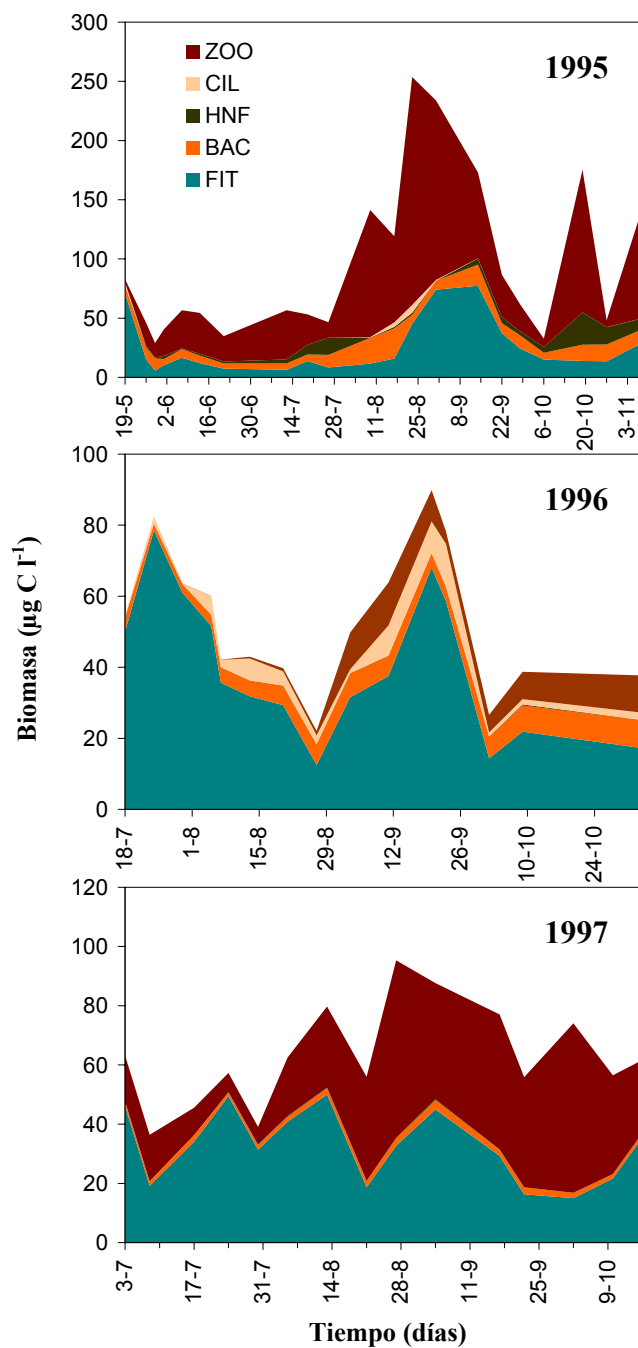
Año	Abundancia (cél ml <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )			Biomasa (μg C l <sup>-1</sup> )		
	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo
1995	10.75	26.57	4.46	10.33	25.53	4.28
1996	4.94	7.93	1.82	4.88	7.84	1.83
1997	1.93	3.30	1.22	1.87	3.20	1.19

La abundancia y biomasa bacteriana mostró una tendencia general descendente durante el periodo de estudio, tanto en valores medios como máximos y mínimos (Tabla 3.2). Las mayores biomásas anuales se registraron en Agosto de 1995, mientras que la biomasa bacteriana fue menos variable durante los años húmedos (Figura 3-4). La distribución en el perfil vertical fue muy homogénea (ver Figura 3-8 para 1997) y tan sólo en 1996 se registró un cierto incremento en la capa profunda.

### Nanoflagelados heterotróficos y ciliados

En 1995 se desarrollaron poblaciones de nanoflagelados heterotróficos (HNF) y ciliados, organismos muy escasamente representados en La Caldera con anterioridad a





**Figura 3-4.** Variaciones estacionales e interanuales en la biomasa de distintos grupos tróficos (ver texto). Valores medios para la columna de agua.

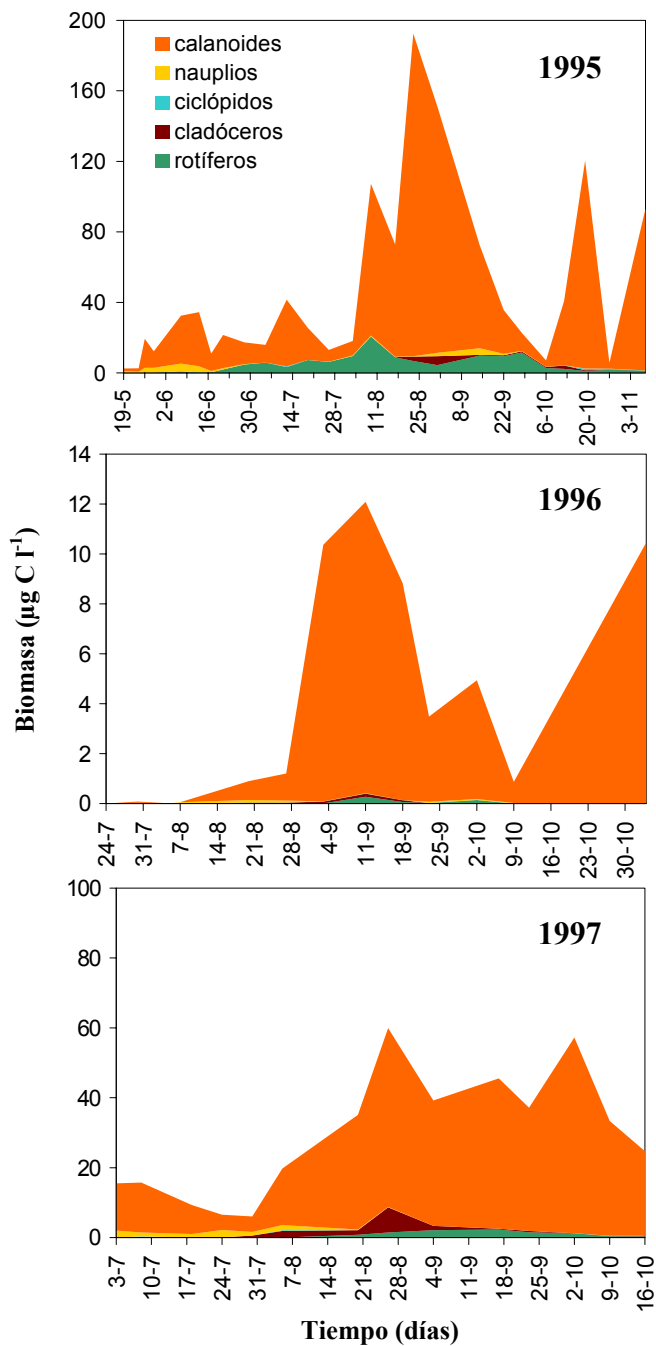
esta fecha. Se observaron dos picos de HNF: uno en Julio ( $5.38 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup>) y otro hacia finales de la estación libre de hielo ( $17.2 \times 10^3$  cél ml<sup>-1</sup>). Los ciliados (*Oligotrichidae*) alcanzaron sus densidades más altas inmediatamente después del deshielo (4.6 cél ml<sup>-1</sup>) y en Agosto (3.9 cél ml<sup>-1</sup>) de 1995. Durante 1996, los HNF fueron muy escasos (<20 cél ml<sup>-1</sup> de abundancia máxima), mientras que los ciliados experimentaron un considerable desarrollo, con máximos de abundancia a mediados de Septiembre de 1996 (53.7 cél ml<sup>-1</sup>). Finalmente, ambos grupos de organismos estuvieron escasamente representados en 1997 (Figura 3-4).

### Zooplankton

La composición específica de la comunidad zooplanctónica de la laguna de La Caldera es relativamente simple y constante. El copépodo calanoide *Mixodiaptomus laciniatus* constituyó la principal especie de zooplankton, mientras que rotíferos (*Hexarthra bulgarica*) y cladóceros (*Daphnia pulex*) aparecieron más escasamente representados. La abundancia de zooplankton, por el contrario, varió muy significativamente entre años, registrándose densidades muy bajas (<1 ind l<sup>-1</sup>) en 1996, en comparación con 1995 y 1997 (33 y 24 ind l<sup>-1</sup>, respectivamente).

Las variaciones estacionales de la biomasa zooplanctónica fueron acusadas en 1995, variando entre 2.5 y 192.5 µg C l<sup>-1</sup>, con un promedio anual de 52.7 µg C l<sup>-1</sup> (valores medios para la columna de agua). Aunque *H. bulgarica* constituyó un 10% en promedio de la biomasa de zooplankton, esta especie llegó a dominar la comunidad zooplanctónica (~50% de biomasa y >80% de abundancia) a principios de Agosto y a finales de Septiembre. Por su parte, *D. pulex* fue escasa, representando menos del 10% de la biomasa total de zooplankton al final del verano (<5 µg C l<sup>-1</sup>). *Mixodiaptomus laciniatus*, especie dominante del zooplankton, desarrolló sólo en 1995 un ciclo bivoltino con dos fases de eclosión bien definidas lo que determinó la aparición de dos picos naupliares en Mayo/Junio y Agosto/Septiembre (Figura 3-5).

Durante los años 1996 y 1997, la dominancia de *M. laciniatus* fue aún más manifiesta y constituyó más del 90% de la abundancia y biomasa total del zooplankton. Ésta varió entre 0.002 y 12 µg C l<sup>-1</sup> (promedio anual de 4 µg C l<sup>-1</sup>) en 1996, y entre 6 y 60 µg C l<sup>-1</sup> (promedio anual de 29 µg C l<sup>-1</sup>) en 1997. *D. pulex* y *H. bulgarica* fueron escasas y representaron <5% de la biomasa total del zooplankton (Figura 3-5). Durante estos años húmedos, los estadios naupliares constituyeron la mayor parte de la



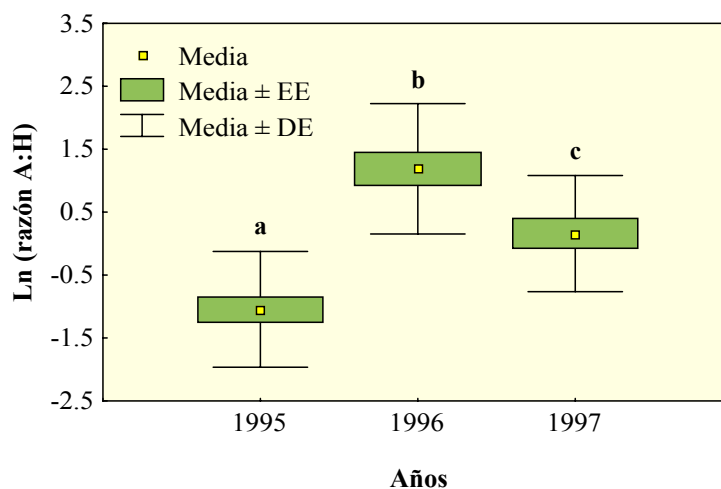
**Figura 3-5.** Biomasa de los principales grupos de zooplancton. Valores promedio de la columna de agua.

abundancia zooplanctónica desde el deshielo hasta principios de Agosto, momento en que los estadios copepodíticos adquieren el protagonismo. Otras especies de copépodos como *Dyaptomus cyaneus* o *Acanthocyclops vernalis*, fueron muy escasas en estos años.

La distribución vertical del zooplancton fue muy heterogénea, especialmente en los años húmedos. En conjunto, los organismos se concentraron en las profundidades inferiores de la laguna en las horas centrales del día (si era soleado) triplicándose los valores de biomasa con respecto a los registrados en las capas superiores (Figura 3-8).

### Relación entre los componentes abióticos y bióticos

La razón autótrofo:heterótrofo (A:H) fue significativamente diferente entre los años de estudio (Análisis de contrastes LSD,  $p < 0.005$ , Figura 3-6). Mientras que esta razón fue inferior a 1 en la práctica totalidad del período libre de hielo de 1995 (0.37 en



**Figura 3-6.** Variación interanual y estacional de la razón A:H. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Análisis de contrastes LSD,  $p < 0.005$ ) de la razón A:H entre los años considerados. EE: error estándar; DE: desviación estándar.

promedio), alcanzó los valores medios de 5.71 y 1.74 en 1996 y 1997, respectivamente. Concretamente, la razón A:H varió entre 0.84 y 23.1 en 1996, registrándose los valores más altos durante el deshielo. En 1997 la razón A:H varió entre 0.25 y 6.26, con los valores inferiores a 1 en la segunda mitad de la estación estival, coincidiendo con el

mayor desarrollo del zooplancton. Tanto en los años húmedos como en el seco, la razón A:H estuvo por encima de 1 inmediatamente después del deshielo.

En la Tabla 3-3 se resume la contribución de cada grupo trófico a la biomasa planctónica total. Las bacterias fueron una fracción minoritaria, especialmente en los años húmedos, y contribuyeron de forma decreciente a la biomasa total a lo largo de los 3 años de estudio. Por el contrario, el fitoplancton fue el principal grupo trófico en los años húmedos, y sólo en 1995 representó el 28% de la biomasa total, tal y como refleja la razón A:H<1. El zooplancton constituyó una fracción significativa en 1995 y 1997, representando casi la mitad de la biomasa total de la comunidad planctónica, mientras que en 1996 su contribución no llegó al 10%. La contribución de los HNF a la biomasa planctónica fue significativa sólo en 1995. Finalmente, los ciliados representaron una fracción significativa de la biomasa total en 1996, coincidiendo con la disminución en la abundancia de zooplancton.

**Tabla 3-3.** Contribución (%) de la biomasa de los principales grupos tróficos (ver texto) a la biomasa total.

Año	FIT	HNF	CIL	BAC	ZOO
1995	28.2	7.5	0.5	14.4	49.5
1996	71.1	0.1	7.6	11.9	9.2
1997	53.2	0.2	0.0	3.1	43.6

Teniendo en cuenta el papel de los componentes abióticos como factores potencialmente controladores de la comunidad planctónica, destacamos la significativa relación obtenida entre los nutrientes y la biomasa del fitoplancton (PT:  $r=0.76$ ,  $p<0.001$ ,  $n=20$ ; NT:  $r=0.75$ ,  $p<0.001$ ,  $n=21$ ) y del conjunto de la comunidad planctónica (BIO) (PT:  $r=0.58$ ,  $p=0.008$ ,  $n=20$ ; NT:  $r=0.69$ ,  $p<0.001$ ,  $n=21$ ) en 1995. Estas relaciones no fueron observadas en los años húmedos, aunque en 1997 la biomasa de fitoplancton y de los microbacterívoros se relacionó inversamente con la razón NT:PT ( $r=-0.87$ ,  $p<0.001$ ,  $n=14$ ). Por último, durante los años húmedos, la temperatura se relacionó positivamente con las abundancias de fitoplancton (1997:  $r=0.77$ ,  $p=0.001$ ,  $n=15$ ), zooplancton (1996:  $r=0.83$ ,  $p<0.001$ ,  $n=14$ ; 1997:  $r=0.68$ ,  $p=0.005$ ,  $n=15$ ) y de bacterias (1996:  $r=0.73$ ,  $p=0.003$ ,  $n=14$ ; 1997:  $r=0.67$ ,  $p=0.007$ ,  $n=15$ ).

El análisis de regresión entre los distintos componentes tróficos mostró relaciones significativas sólo en los años húmedos. Así, las bacterias se relacionaron negativamente con el fitoplancton (biomasa,  $r=-0.85$ ,  $p<0.001$ ), y positivamente con el zooplancton

(biomasas,  $r=0.71$ ,  $p=0.003$ ,  $n=14$ ) en 1996. El fitoplancton y los microbacterívoros (principalmente ciliados) estuvieron relacionados positivamente en ambos años (1996: abundancias,  $r=0.81$ ,  $p<0.001$ ,  $n=15$ ; 1997: biomasas,  $r=0.90$ ,  $p<0.001$ ,  $n=15$ ), y los ciliados se relacionaron negativamente con el zooplancton (biomasas,  $r=-0.96$ ,  $p<0.001$ ,  $n=15$ ) en 1997.

## DISCUSIÓN

### Componentes abióticos

Durante el período 1995-1997 se produjeron en Sierra Nevada fuertes variaciones en el régimen pluviométrico, que provocaron cambios en las características de la laguna de La Caldera: físicas (ej. volumen, Figuras 3-1 y 3-7), químicas (ej. concentración de P, Tabla 3-1) y biológicas (Figuras 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, Tabla 3-3).



**Figura 3-7.** Aspecto de La Caldera durante los veranos de 1995 y 1996.

Estudios previos en La Caldera destacan la importancia de la entrada de nutrientes (principalmente P y amonio) durante el deshielo para el establecimiento y desarrollo de la comunidad fitoplanctónica (Carrillo et al. 1990 a). Asimismo, nuestros resultados sobre la variación estacional de PDT, con máximos relativos que coinciden con los momentos de precipitación atmosférica (Figura 3-2), reflejan la influencia de las precipitaciones atmosféricas estivales de origen sahariano, que implican una entrada de P al sistema (Guerzoni et al 1997, Moulin et al. 1997 a, b, Morales et al. 1999).

Sin embargo, el hecho de que el PT no experimentara un incremento significativo en los momentos posteriores a la precipitación (ej. tras la masiva entrada de P en Septiembre de 1996), sugiere que buena parte de este fósforo atmosférico se perdería al sedimento, debido probablemente a su asociación a partículas minerales (Avila et al. 1997). Sin embargo, Villar et al. (2002 b), mediante un análisis del contenido en P realizado sobre

concentrados de las fracciones fitoplanctónica y bacteriana, encuentran un incremento de la biomasa fitoplanctónica (66-526%) y de la biomasa bacteriana (30-186%) en términos de P tras los eventos de precipitación atmosférica. Estos resultados muestran que parte de este P alóctono es incorporado por ambos grupos tróficos. La aparente contradicción de resultados expuestos podría explicarse por el diferente grado de sensibilidad de las dos aproximaciones metodológicas seguidas. Así, los valores de P obtenidos sobre concentrados de fracciones planctónicas ofrecen una mayor resolución en la cuantificación del P contenido en cada fracción, que apenas podría resolverse con el método tradicional de determinación de PT. En conjunto, los resultados sugieren que una fracción de P atmosférico ligado a material particulado precipita hacia el sedimento, mientras que otra fracción, probablemente en una forma química más biodisponible (ej. fosfato reactivo soluble) es incorporada por la comunidad biológica. Dado que el P constituye el principal nutriente limitante en el ecosistema (altos valores DIN:TP), estos aportes de P atmosférico permiten el mantenimiento y desarrollo de la comunidad fitoplanctónica a lo largo del período estival.

### **Fitoplancton**

La comunidad autotrófica fue relativamente simple y estuvo compuesta por especies nanoflageladas, tal y como es característico en los sistemas oligotróficos (Reynolds 1984, Rott 1984, Psenner y Zapf 1990, Reche et al. 1994, Carrillo et al. 1995). Hasta 1995, la sucesión estacional del fitoplancton, presentaba un patrón bastante definido: tras el deshielo, dominaban las algas flageladas (Crisofíceas: *Chromulina nevadensis*; Dinofíceas: *Amphidinium* sp.), que eran sustituidas a mediados de verano por una población importante de cianofíceas no coloniales (*Cyanarcus* sp.). En este momento (Agosto), se registraban los valores máximos de abundancia fitoplanctónica, que oscilaban entre 1700-5000 células ml<sup>-1</sup> en 1986 (Carrillo et al. 1995), y 8000-14000 células ml<sup>-1</sup> en 1992-93 (Carrillo et al. 1996 a), representando la población de *Cyanarcus* sp. entre el 60-90 % de la biomasa fitoplanctónica (Carrillo et al. 1995, 1996 a). Al final del periodo libre de hielo, las algas flageladas (*C. nevadensis*, *Amphidinium* sp.) se reinstauraban. Entre otras especies menos representadas, destacaban *Oocystis lacustris* (Clorofícea) y *Cyclotella* sp. (Bacillariofícea). La consistencia de este patrón está bien documentada para La Caldera durante 20 años (Martínez 1977, Carrillo 1989, Echevarría et al. 1990, Carrillo et al. 1991 a, 1995, 1996 a, Reche 1995, este estudio).

En 1995 la abundancia fitoplanctónica experimentó un acusado incremento (7.5 veces), con respecto a los años anteriores, destacando la alta representación de clorofíceas no flageladas (*Chlorella* sp.). Tal y como sugirió Currie (1990), la correlación positiva encontrada entre PT y la biomasa algal es indicativa del incremento en la disponibilidad de P para las algas, lo que pudo estar relacionado con la influencia de procesos de resuspensión desde el sedimento de la laguna (Cotner et al. 2000), dada la escasa profundidad de la misma.

Los mayores valores de PT registrados en 1995 (Tabla 3-1) pudieron favorecer el desarrollo competitivo de las clorofíceas sobre las crisofíceas, dado que las primeras prosperan en hábitats relativamente ricos en fósforo (Reynolds 1984, 1998), incluso independientemente de que exista una alta razón N/P, si se está por encima de un umbral mínimo en la concentración de P (Reynolds 1992, 1998). Además, el incremento de temperatura es otro factor que podría explicar el desarrollo de *Chlorella* sp., como se desprende de los resultados obtenidos en un análisis de regresión por pasos, donde PT y temperatura explicaron el 67% de la varianza de la abundancia de las Clorofíceas en 1995 (Tabla 3-4). La influencia de la temperatura sobre el desarrollo de clorofíceas también se hace patente en la relación positiva encontrada entre la temperatura y abundancia de las clorofíceas en 1997 ( $r=0.66$ ,  $p<0.01$ ,  $n=15$ ), responsable de la relación positiva entre el fitoplancton total y la temperatura (ver Resultados). En cualquier caso, encontramos el desarrollo de *Chlorella* sp. cuando la temperatura del agua excedió de 10 °C.

**Tabla 3-4.** Resultados de un análisis de regresión múltiple por pasos de las variables que afectaron a la abundancia de clorofíceas en 1995.

Variables	R <sup>2</sup> múltiple	R <sup>2</sup> cambio	F <sub>(2,15)</sub>	p
PT	0.503	0.503	16.18	0.0011
Temperatura	0.670	0.167	7.61	0.0146

La recuperación del volumen de la laguna en 1996 llevó a la dilución del ecosistema. La ausencia de una relación significativa entre N y P con cualquier componente biótico durante 1996 sugiere un escaso control aparente de los nutrientes minerales sobre la dinámica estacional planctónica, a diferencia de lo ocurrido en 1995. Es probable que la escasez de zooplancton en este año fuera un factor principal que favoreciera el crecimiento de flageladas (ej. crisofíceas, criptofíceas), especies que son ampliamente depredadas por el zooplancton (Carrillo et al. 1990 a, 1991 a, 1995, Elser y Goldman 1991, Reynolds 1998). Además, el desarrollo de la población de *Cryptomonas*



sp. en las capas inferiores de la laguna durante los primeros días tras el deshielo es consistente con su capacidad de crecer durante condiciones invernales (Reynolds 1984).

La relación negativa encontrada entre las biomásas algal y bacteriana en 1996 sugiere un control de las bacterias por bacterivoría (mixotrofia) de los principales grupos fitoplanctónicos (crisofíceas y criptofíceas). Esta idea estaría también apoyada por la relación positiva encontrada entre algas y microbacterívoros como covariación de ambas comunidades potencialmente bacterívoras con respecto a un factor común: el bacterioplancton. Dado que las bacterias son proporcionalmente ricas en fósforo (bajas razones N:P) (Andersen et al. 1986, Elser et al. 1995 a, Fagerbakke et al. 1996, Villar-Argaiz et al. 2002 b), podríamos especular que, en estas condiciones de fuerte limitación por P, parte de las demandas algales de este elemento podrían ser satisfechas con el fósforo bacteriano a través de una estrategia mixotrófica por parte de crisofíceas y criptofíceas (Porter 1988, Salonen y Jokinen 1988, Tranvik et al. 1989, Nygaard y Tobiesen 1993, Holen 1999, Roberts y Laybourn-Parry 1999, Urabe et al. 2000). El patrón morfológico celular mostrado por *C. nevadensis* (Carrillo et al. 1991 b, este estudio) podría ser el reflejo citológico de su capacidad fagotrófica potencial.

Durante 1997, la disminución de las densidades fitoplanctónicas máximas con respecto al año anterior es consistente con la recuperación de las poblaciones zooplanctónicas (principalmente copépodos calanoides), lo que implica un incremento de la presión de pastoreo sobre el fitoplancton (Carrillo et al. 1990 a, 1991 a, 1995). La relación negativa entre la razón NT:PT con la biomasa algal y de microbacterívoros sugiere que estas comunidades también estuvieron controladas directa o indirectamente por la disponibilidad de fósforo según una escala estacional. Debido a que las entradas de fósforo alóctono fueron más escasas en 1997 que en 1996 (Villar-Argaiz 1999, Villar-Argaiz et al. 2001), la mayor parte de la disponibilidad de P en la zona pelágica podría proceder de la excreción por parte del zooplancton, que en este sistema juega un papel relevante (Carrillo et al. 1995, Carrillo et al. 1996 a, b, Villar-Argaiz et al. 2001). Así, Reche et al. (1997) encontraron que el fósforo liberado por el zooplancton pudo satisfacer entre el 74 y el 316 % de las demandas mínimas sestónicas por P cuando las crisofíceas dominaban la comunidad fitoplanctónica de La Caldera, y Villar-Argaiz et al. (2001) encuentran que el zooplancton pudo satisfacer entre 278 y 542% de las demandas algales de P en 1997. Además, congruentemente con el desarrollo de zooplancton, a partir de mediados del período estival de 1997 la razón DIN:PT alcanzó valores similares a los registrados en 1995, lo que indicaría una disminución en la severidad de la limitación por P, favoreciendo el desarrollo de las clorofíceas.

Durante los años húmedos, se rompió el patrón de sucesión fitoplanctónica establecida a lo largo de 20 años de estudio, por la ausencia del desarrollo de *Cyanarcus* sp. (Martínez et al. 1977, Carrillo 1989, Echevarría et al. 1990, Carrillo et al. 1995, 1996 a). Es bien conocido que las cianofíceas prosperan en aguas relativamente cálidas (Smith 1985, Reynolds 1984, 1998). La temperatura del agua a mediados de verano de años anteriores a 1996 alcanzó valores por encima de 14 °C (Carrillo et al 1996 a), mientras que estuvo por debajo de 12 °C (en promedio) en el mismo período en 1996 y 1997. Por esta razón, interpretamos que los valores de temperatura relativamente bajos registrados durante estos años puede ayudar a explicar la ausencia de *Cyanarcus* sp., mientras que otros grupos taxonómicos más tolerantes de bajas temperaturas como crisofíceas, criptofíceas e incluso clorofíceas pudieron crecer con éxito.

### **Bacterioplancton**

Los valores estructurales (abundancia y biomasa) de la comunidad bacteriana estuvieron en el límite inferior del rango característico de lagos oligotróficos (Thomas et al. 1991 a, 1991 b, Ochs et al. 1995). Es de destacar, además, que el tamaño medio celular bacteriano registró valores ( $\sim 0.03 \mu\text{m}^3$ ) que estuvieron entre los más bajos observados en bacterioplancton (Ammerman et al. 1984, Lee y Fuhrman 1987, Ochs et al. 1995).

La temperatura fue el principal factor abiótico que ejerció un control sobre la abundancia del bacterioplancton. La falta de relación entre éste y los nutrientes minerales sugiere que, al menos sobre una escala estacional, éstos no fueron factores de primer orden que restringieran el desarrollo del bacterioplancton. Por el contrario, varios hechos evidencian la existencia de un control por depredación de las bacterias en los años húmedos: (i) la relación negativa observada entre fitoplancton (potencialmente mixotrófico) y bacterias según una escala estacional en 1996, que no obedece a una covariación con la temperatura, ya que el fitoplancton no se relacionó con ésta; (ii) la estructura de tamaños de las bacterias. El pequeño tamaño celular bacteriano, así como la escasa presencia de bacterias filamentosas grandes (<2% de la abundancia bacteriana total) podría ser el resultado de una intensa presión de depredación por protistas (Andersson et al. 1986, González et al. 1990, González 1996, Pernthaler et al. 1996) y por zooplancton (Güde 1988, Jürgens et al. 1994, Sommaruga y Psenner 1995); (iii) la relación inversa de abundancia bacteriana y zooplanctónica según una escala interanual

(1996-1997). Aproximaciones experimentales recientes demuestran la capacidad de *M. laciniatus* de ingerir y asimilar bacterias de La Caldera (en preparación). La relación positiva entre bacterioplancton y zooplancton encontrada en 1996 según una escala estacional estaría reflejando una covariación con la temperatura.

### **Nanoflagelados heterotróficos y ciliados**

El incremento de P en 1995 fue responsable de una mayor diversificación de la comunidad planctónica, con la aparición de HNF y ciliados, no encontrados en estudios realizados con anterioridad en este ecosistema. La relación negativa establecida entre los ciliados y el zooplancton en 1997 constituye una evidencia indirecta de un control por depredación ejercido por éste sobre los ciliados. En este contexto, diversos estudios han mostrado que los protozoos constituyen una fuente de alimento con alto valor nutricional que es explotado por el zooplancton (Porter et al. 1979, Stoecker y Capuzzo 1990, DeBiase et al. 1990, Gifford 1991, Cruz-Pizarro et al. 1994). De este modo, el significativo desarrollo de ciliados en 1996 pudo producirse como consecuencia de las densidades extremadamente bajas de zooplancton registradas este año.

### **Zooplancton**

La anteriormente señalada mayor diversificación de la comunidad planctónica ocurrida en 1995 también se reflejó en el metazooplancton con el desarrollo significativo *H. bulgarica* (Rotíferos), como respuesta a un incremento en la abundancia de bacterioplancton (sus presas potenciales) asociado a una mayor disponibilidad de P.

Las condiciones de oligotrofia de este ecosistema favorece a las especies de zooplancton con tamaños corporales grandes y bajas tasas metabólicas (Taylor 1984). La alta limitación de P de este sistema (alta razón NT:PT), incluso en relación con otros de Sierra Nevada (Morales-Baquero et al. 1999), puede ser la causa principal del dominio de copépodos calanoides frente a cladóceros (Villar-Argaiz et al. 2002 a), a pesar de que éstos últimos constituyen el grupo dominante en los ecosistemas sin peces (Gliwicz 1985, Cruz-Pizarro et al. 1994). Los copépodos calanoides presentan mayores valores en su razón N:P y requerimientos más bajos de P que los cladóceros (Andersen y Hessen 1991, Carrillo et al. 1996 a, 2001, Villar-Argaiz et al. 2000, 2002 a, c), por lo que están mejor

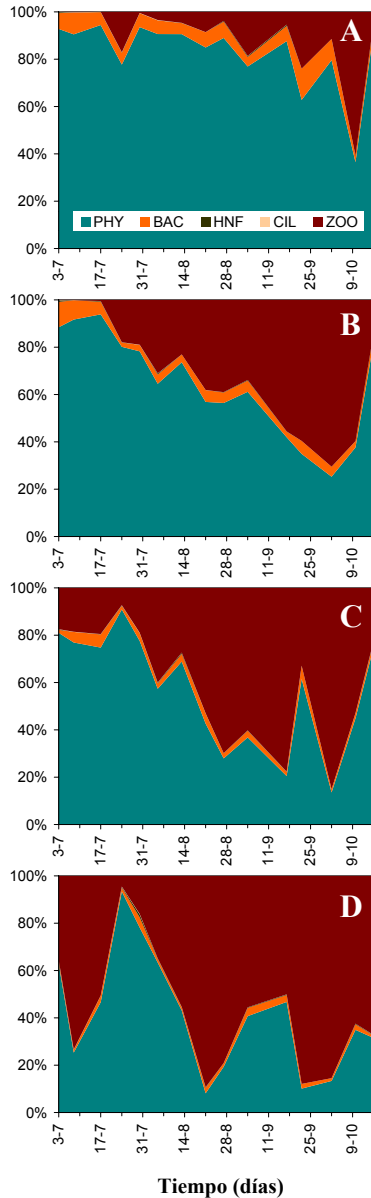
adaptados a ambientes limitados por P. Es probable que el incremento tanto de la disponibilidad de P como de la duración de la estación libre de hielo fuera el principal factor que condicionó el desarrollo de un ciclo bivoltino en *M. laciniatus*, pues los nauplios presentan mayores requerimientos de P que los copepoditos o los adultos (Villar-Argaiz et al. 2001, 2002 a, c).

Las bajas densidades de zooplancton observadas en 1996 serían el resultado de la dilución que experimentó el lago tras las abundantes precipitaciones y que supuso un incremento del espacio susceptible de ser recolonizado por el zooplancton. Las bajas tasas de crecimiento específico medidas en *M. laciniatus* (Cruz-Pizarro 1981 a, b.), relacionado con su relativamente alta razón N:P (Sterner 1995, Elser et al. 1996, Villar-Argaiz et al. 1999, Carrillo et al. 2001), retrasaron el proceso de recuperación del zooplancton hasta alcanzar una densidad “normal” en 1997. Además, ya que la temperatura y la abundancia de zooplancton covariaron positivamente, es posible que la baja temperatura del agua durante los años húmedos también contribuyera al retraso del proceso de recuperación. A finales de la estación estival, de 1997 el zooplancton se recuperó hasta unas densidades similares a las registradas antes de 1995 (Cruz-Pizarro 1981 b, Carrillo 1989, Reche 1995, Carrillo et al. 1995).

La heterogénea distribución vertical que presentó el zooplancton, con la mayor parte de la población localizada en las capas profundas del lago durante las horas centrales del día, especialmente si éste es soleado (Figura 3-8), concuerda con el patrón diario de comportamiento migratorio que es característico del zooplancton de La Caldera (Cruz-Pizarro 1978, Carrillo et al. 1991 a).

### **Razón Autótrofo:Heterótrofo**

Las variaciones interanuales de la razón A:H reflejan los cambios en la estructura de la comunidad pelágica, desde una mayor complejidad en 1995, cuando una biomasa autotrófica proporcionalmente baja y con alta tasa de renovación mantuvo a una comunidad heterotrófica más desarrollada (Reynolds 1984, Stegmann y Peinert 1984), hasta la menor complejidad en 1996, dominada por protistas tras un proceso de dilución de la laguna debido al incremento en el régimen de precipitaciones. Los valores de  $A:H < 1$  en la segunda mitad del período libre de hielo de 1997 reflejaron el retorno a densidades “normales” de zooplancton que implicaron una alta razón entre la biomasa de herbívoros vs. de autótrofos, propia de ecosistemas oligotróficos (Gasol et al. 1997). Por



**Figura 3-8.** Variación vertical y estacional de la biomasa de los grupos tróficos (ver texto) durante 1997. (A) 0.5 m, (B) 5 m, (C) 8 m, (D) 11 m.

tanto, la estructura de la comunidad planctónica reflejó las variaciones ocurridas en el régimen de precipitaciones. En este contexto, existen evidencias de que en sistemas sometidos a un fuerte estrés ambiental asociado a variaciones acusadas en las entradas de agua, son más aparentes los cambios interanuales en el desarrollo de una red trófica clásica vs. microbiana (Porter 1996). Asimismo, actualmente se reconoce la importancia de los procesos de resuspensión desde el sedimento en la variabilidad interanual del estado trófico de ecosistemas acuáticos y en el desacople entre procesos autotróficos y heterotróficos (Cotner et al. 2000).

El escaso desarrollo de la comunidad de bacterioplancton y de los componentes clásicos del bucle microbiano (flagelados heterotróficos y ciliados) en condiciones “normales” de desarrollo de la comunidad planctónica (ej. 1997) parecen estar en contraposición con la tendencia establecida de un alto desarrollo de la biomasa de la comunidad microheterotrófica en sistemas oligotróficos. Éstos suelen caracterizarse por una alta biomasa bacteriana en relación con la del fitoplancton y por un importante desarrollo del bucle microbiano con respecto a la cadena de pastoreo (Sterner et al. 1997, Biddanda et al. 2001, Cotner y Biddanda 2002). Varias causas podrían condicionar el escaso desarrollo del bucle microbiano heterotrófico en La Caldera: el impacto de altas dosis de radiación ultravioleta (sistema de alta montaña de aguas claras), que podría afectar negativamente al crecimiento bacteriano, o un

elevado control por depredación del bacterioplancton ejercido por el zooplancton y, en particular, por una comunidad algal con un potencial metabolismo mixotrófico. Estas cuestiones se abordarán a lo largo de esta Memoria de Tesis.

## CAPÍTULO IV

---

### El eslabón alga-bacteria: los procesos

Cuanto más de cerca miramos esas representaciones de la materia en los organismos vivos, más impresionante es el espectáculo.

Max Delbrück (1906-1981), *Reflexiones de un físico en torno a la biología*.

## INTRODUCCIÓN

El flujo de energía a través de los ecosistemas acuáticos se inicia con el proceso fotosintético que almacena la energía de los fotones en los enlaces químicos de compuestos reducidos de carbono. La energía fluye mediante el consumo de biomasa por distintos organismos que conforman la clásica red trófica denominada “cadena de pastoreo” de ecosistemas acuáticos: productores → zooplancton → peces. Más recientemente se ha establecido la existencia de una segunda vía, denominada “bucle microbiano”, que comienza con el consumo de carbono orgánico disuelto por las bacterias heterotróficas, y continúa hacia niveles tróficos superiores a través de flagelados heterotróficos, ciliados y metazooplancton (Peterson et al. 1978, Porter et al. 1979, Azam et al. 1983, Pace et al. 1983, Pedrós-Alió y Brock 1983, Bern 1987, DeBiase et al. 1990, Stoecker y Capuzzo 1990, Gifford 1991, Cruz-Pizarro et al. 1994, Azam 1998). No obstante, algunos estudios han cuestionado la importancia cuantitativa de esta segunda vía al mostrar experimentalmente que las bacterias pueden actuar como sumideros de C (Ducklow et al. 1986, del Giorgio et al. 1997).

El carbono orgánico es un factor clave para el desarrollo del bucle microbiano. En los ecosistemas acuáticos tiene dos orígenes básicos: uno alóctono, procedente de detritus de ecosistemas terrestres (fuentes de ácidos húmicos, fúlvicos, etc.) (ver Williamson et al. 1999 y sus referencias), y otro autóctono, procedente de los productores primarios, bien a partir de células “sanas” por procesos de “excreción” o “exudación” (Hellebust 1965, 1974, Mague et al. 1980, Lancelot 1984, Sundh 1989, 1992, Lignell 1990 a, b, Malinsky-Rushansky y Legrand 1996, Maurin et al. 1997), bien debido a la ruptura de células algales por procesos como lisis viral o depredación por protistas y metazoos, así como su reciclado (“sloppy feeding”, desintegración de partículas fecales, excreción por zooplancton, etc.) (Lampert 1978, Güde 1988, Jumars et al. 1989, Bratback et al. 1994, Markager et al. 1994, Hygum et al. 1997, Rothhaupt 1997).

La naturaleza del C orgánico liberado por las algas determina que éste sea ampliamente consumido por las bacterias (Chrost y Faust 1983, Sundh 1989, 1992, Kirchman et al. 1991, Sundh y Bell 1992, Reche et al. 1996, 1997, Maurin et al. 1997, Pausz y Herndl 1999, Petit et al. 1999). Por otro lado, en sistemas como La Caldera, por sus características geográficas (ver Capítulo I), el DOC presente en la columna de agua tiene una alta fotoreactividad (Reche et al. 2001). Por ello, es esperable que el C orgánico “fresco” procedente de la exudación algal pueda ejercer un papel regulador clave de la actividad bacteriana. Sin embargo, resultados de estudios previos realizados en este



sistema pusieron de manifiesto una ausencia de relación entre los valores de producción de ambos eslabones tróficos según una escala estacional (Reche 1995, Reche et al. 1996), que estos autores atribuyeron al papel regulador ejercido por el P procedente de la excreción del zooplancton sobre la interacción alga-bacteria (Reche et al. 1997).

En este Capítulo se analiza la relación que se establece entre las comunidades fitoplanctónica y bacteriana mediante el flujo de C entre ambos niveles tróficos según una escala intra e interanual. El objetivo es determinar la naturaleza de dicha relación asociada a cambios en el volumen de La Caldera, en relación con estudios precedentes. Como se ha indicado en el Capítulo anterior, las abundantes precipitaciones ocurridas durante los años hidrológicos 1996 y 1997 supusieron un rápido incremento en la profundidad de la laguna (hasta 14 m) durante los períodos libres de hielo de estos años. Este análisis se realiza además según una escala temporal diaria, para determinar si existen variaciones asociadas a ritmos circadianos o al ciclo diario de irradiación solar. La segregación de la estructura y los procesos de la comunidad pelágica de La Caldera en Capítulos diferentes de esta Memoria de Tesis se justifica porque los parámetros estructurales y los funcionales pueden estar regulados de forma independiente por diferentes factores, tal y como concluye Ducklow (1999). Es por tanto objetivo genérico de este Capítulo dilucidar los factores que controlan los procesos de las comunidades fitoplanctónica y bacteriana, y su interacción.

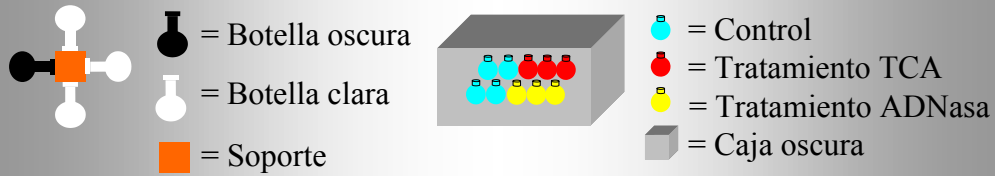
## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño experimental**

La determinación de los procesos según una escala estacional se llevó a cabo durante los períodos estivales de 1996 y 1997, mediante la cuantificación *in situ* de la producción primaria, excreción algal de C fotosintético, su reasimilación bacteriana y la producción bacteriana en cinco fases de la sucesión estacional, en 2-4 profundidades, realizándose un total de 12 experimentos en cada año estudiado. La metodología utilizada está descrita en el Capítulo II (Materiales y Métodos).

La determinación de los procesos según una escala diaria se llevó a cabo a mediados del período libre de hielo de 1997 (12 de Agosto), mediante la cuantificación de las mismas variables descritas anteriormente en cuatro períodos discretos distribuidos regularmente a lo largo del ciclo diario: amanecer (07:00-11:00), mañana (11:00-15:00),

## CICLO DIARIO: DISEÑO EXPERIMENTAL



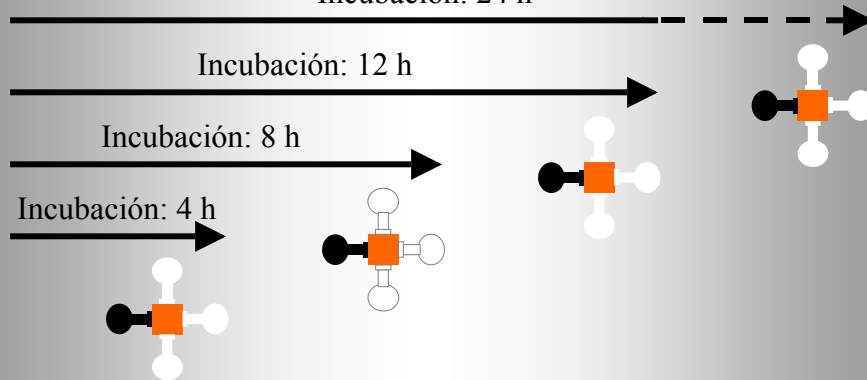
Producción primaria

Producción bacteriana

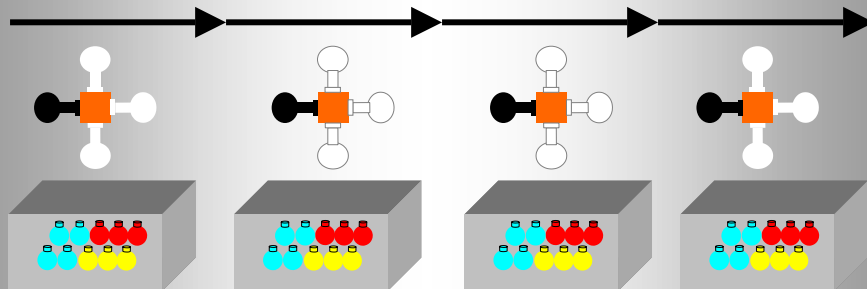


INCUBACIONES "EN CONTINUO"

Incubación: 24 h



INCUBACIONES "DISCRETAS"



tarde (15:00-19:00) y anochecer (19:00-20:40); en el caso de la producción bacteriana, las incubaciones se iniciaron al comienzo de cada período diario indicado y además durante un período nocturno (inicio 00:00 h), siendo los tiempos de incubación inferiores a 1 hora. Todas estas incubaciones, denominadas “discretas”, se realizaron para determinar posibles variaciones de actividad algal y bacteriana asociadas al ciclo diario de radiación solar. Paralelamente, se cuantificó los valores acumulados de producción primaria, excreción de C y su reasimilación por bacterias obtenidos en tiempos de incubación crecientes a lo largo del día: 4, 8, 12, y 24 horas, comenzando desde el amanecer. De esta forma, los procesos asociados al ciclo fotosintético diario son evaluados de una forma global. Por otro lado, estas incubaciones “en continuo”, junto con el procedimiento de filtración diferencial, ofrecen la oportunidad de cuantificar la respiración de las algas *in situ*. Ésta se calculó sustrayendo la excreción nocturna de C fotosintético a las pérdidas nocturnas de C particulado, según la expresión:

$$\text{ABS (POC}_{124} - \text{POC}_{12}) - \text{ABS (EOC}_{24} - \text{EOC}_{12})$$

donde ABS es valor absoluto; POC<sub>124</sub> es el C orgánico particulado acumulado durante el ciclo diario completo; POC<sub>12</sub> el C orgánico particulado acumulado durante las horas diurnas; EOC<sub>24</sub>, la excreción acumulada de C orgánico durante el ciclo diario completo; EOC<sub>12</sub>, la excreción acumulada de C orgánico durante las horas diurnas. Este procedimiento ha sido aplicado en ambientes marinos (Eppley y Sharp 1975, Smith 1977), de agua dulce (Berman y Kaplan 1984) y en cultivos algales (Beardall et al. 1997).

Todas las incubaciones (discretas y acumuladas) se llevaron a cabo en la profundidad de 5 m (45% de PAR incidente). Las botellas de incubación se llenaron a partir de una muestra compuesta de agua del lago obtenida al mezclar volúmenes iguales de muestras tomadas de cuatro profundidades homogéneamente repartidas en la columna de agua. Paralelamente a las incubaciones, se obtuvieron medidas *in situ* de la irradiancia de PAR a lo largo del perfil vertical que permitieron construir curvas producción-irradiancia, y se determinaron los parámetros físicos, químicos y biológicos como se describe en el Capítulo II para cada uno de los períodos del ciclo diario arriba descritos.

### **Análisis estadísticos**

La variación espacial e interanual de las variables de actividad algal y bacteriana se evaluó mediante *t*-test, o mediante test U de Mann-Whitney cuando no se cumplían las

condiciones de los tests paramétricos. La variación diaria (incubaciones discretas) o acumulada (incubaciones en continuo) de dichas variables en el ciclo diario se evaluó mediante análisis de contrastes LSD. La influencia de factores potenciales controladores de la producción primaria (biomasa algal, PAR, TP, TN, temperatura) y de la producción bacteriana (biomasa bacteriana, EOC, TP, TN, temperatura) fue evaluada en cada año mediante análisis de regresión múltiple por pasos. La linealidad y multi-ortogonalidad entre las variables independientes se verificó mediante análisis previos de correlación, y la distribución normal de los residuos se verificó mediante el test W de Shapiro-Wilks. Las variaciones interanuales de la pendiente de las líneas de regresión se evaluaron por tests de paralelismo (interacción con covariables).

Se verificó la distribución normal de los datos mediante el test W de Shapiro-Wilks, y la homocedasticidad mediante los tests F y de Levene. Los datos se transformaron logarítmicamente cuando no se cumplían estas condiciones. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistica® 5.1 para Windows (StatSoft, Inc. 1997).

## **RESULTADOS**

### **Los procesos según una escala estacional e interanual**

#### ***Producción y productividad primaria, y excreción de C por las algas***

Los valores de producción primaria (PP), medidos como TOC, comprendieron entre 0.26 y 1.91  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$  en 1996, y entre 0.12 y 1.76  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$  en 1997 (Tabla 4-1), y la productividad primaria (PdP) varió entre 0.003 y 0.045  $\text{h}^{-1}$  en 1996, y entre 0.005 y 0.05  $\text{h}^{-1}$  en 1997 (Figura 4-1), sin que se registrara una significativa variación interanual (PP:  $t=0.59$ ,  $df=22$ ,  $p=0.56$ ). Aunque los valores promedio para la columna de agua presentaron una tendencia decreciente a lo largo del período libre de hielo, los resultados más destacables fueron las acentuadas diferencias de PP a lo largo del perfil vertical observadas en ambos años, registrándose valores significativamente mayores en las capas más profundas que en las superficiales (1996,  $t=4.06$ ,  $df=6$ ,  $p=0.0066$ ; 1997,  $t=5.34$ ,  $df=6$ ,  $p=0.0018$ , ver también Figura 4-2), patrón que también mostró la PdP (1996,  $t=3.01$ ,  $df=6$ ,  $p=0.0238$ ; 1997,  $t=3.79$ ,  $df=6$ ,  $p=0.0091$ ). Los análisis de regresión por pasos realizados para determinar qué factores abióticos y bióticos controlaron la PP y la PdP mostraron que el gradiente de intensidad de PAR explicó el 61% y el 48% de las

varianzas de PP y PdP, respectivamente, en 1996, y el 69% y el 56% de las varianzas de PP y PdP, respectivamente, en 1997. De hecho, PAR presentó una relación inversa con PP y PdP en ambos años, mientras que la distribución vertical y estacional de otras variables abióticas y bióticas no contribuyeron de forma significativa a mejorar la explicación de la varianza de PP ni de PdP (Tabla 4-2, Figura 4-1).

**Tabla 4-1.** Variaciones estacionales e interanuales de diferentes variables de actividad fitoplanctónica y bacteriana (ver texto). Los valores son medias y rango para la columna de agua en cada fase del período libre de hielo (deshielo, verano, final) de 1996 y 1997.

	1996			1997		
	Deshielo (Jul)	Verano (Ago-Sep)	Final (Sep-Oct)	Deshielo (Jul)	Verano (Ago-Sep)	Final (Sep-Oct)
PP ( $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.96 (0.46-1.91)	0.93 (0.62-1.21)	0.73 (0.26-1.22)	0.97 (0.64-1.34)	0.89 (0.35-1.76)	0.27 (0.12-0.42)
POC <sub>1</sub> ( $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.38 (0.18-0.90)	0.52 (0.29-0.72)	0.25 (0.08-0.59)	0.46 (0.25-0.65)	0.58 (0.21-1.10)	0.11 (0.05-0.17)
POC <sub>2</sub> ( $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.07 (0.05-0.10)	0.06 (0.03-0.08)	0.05 (0.01-0.09)	0.03 (0.02-0.03)	0.03 (0.02-0.05)	0.01 (0.00-0.01)
EOC ( $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.32 (0.21-0.48)	0.28 (0.23-0.33)	0.28 (0.17-0.38)	0.18 (0.14-0.23)	0.17 (0.08-0.33)	0.08 (0.06-0.11)
%EOC	35.4 (25.0-46.1)	31.5 (27.5-37.3)	45.0 (30.9-64.6)	19.9 (16.4-24.9)	20.7 (16.2-35.3)	36.7 (25.5-48.0)
%PEA	21.3 (18.5-22.1)	19.9 (14.3-24.1)	16.8 (9.0-23.6)	15.1 (12.5-19.0)	18.7 (12.8-24.0)	10.5 (8.5-12.4)
%CUEb	1.02 (0.92-1.08)	0.99 (0.68-1.15)	1.01 (0.82-1.09)	3.79 (2.85-4.56)	4.07 (3.20-5.75)	5.94 (2.73-9.14)
BP ( $\text{ng C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	3.25 (1.96-4.58)	2.91 (1.57-3.83)	2.84 (1.79-3.98)	7.18 (4.75-9.94)	6.40 (4.11-11.5)	4.01 (2.96-5.06)

Los valores de la tasa de excreción de carbono orgánico por las algas (EOC) comprendieron entre 0.17 y 0.48  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en 1996, y entre 0.06 y 0.33  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en 1997, siendo en conjunto los valores significativamente mayores en 1996 que en 1997 ( $t=4.29$ ,  $df=22$ ,  $p=0.0003$ ). La distribución espacio-temporal de EOC fue similar a la de la PP, única variable que explicó la varianza de EOC (en un 96% en 1996, y en un 91% en

1997), mientras que otras variables como el biovolumen-densidad de algas, temperatura o PT no contribuyeron a la explicación de varianza de EOC (Figura 4-2).

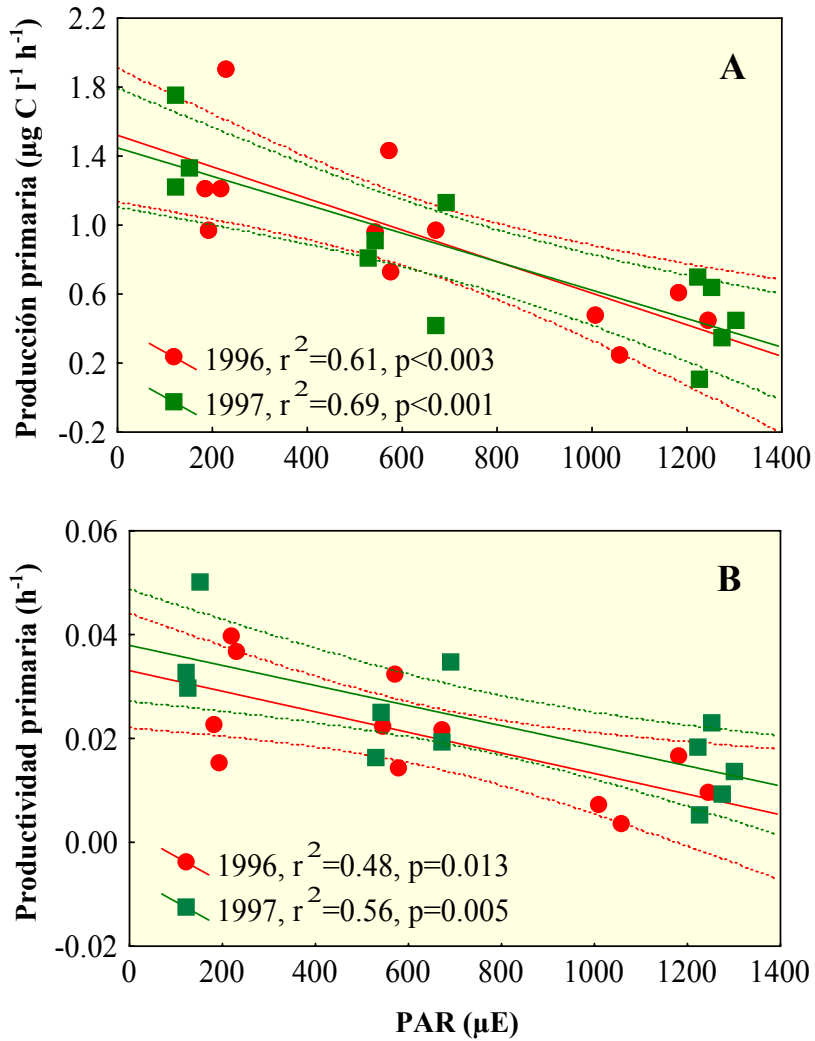
**Tabla 4-2.** Resultados de análisis de regresión múltiple por pasos para producciones y productividades primarias y bacterianas medidas en el lago durante 1996 y 1997.  $R^2$  es el coeficiente múltiple de determinación; g1 y g2 son los grados de libertad;  $F_{(g1,g2)}$  y p son los resultados del *F*-test de la relación entre la variable dependiente y el conjunto de variables independientes.

Año	Variable dependiente	Var. independientes incluidas	Múltiple R	Múltiple $R^2$	g1	g2	$F_{(g1,g2)}$	p
1996	PP	PAR	0.78	0.61	1	10	15.6	0.0027
	PdP	PAR	0.69	0.48	1	10	9.1	0.0131
	PB	EOC	0.94	0.88	1	9	66.5	0.0000
	PdB	EOC	0.92	0.85	1	9	49.6	0.0001
1997	PP	PAR	0.83	0.69	1	10	22.8	0.0008
	PdP	PAR	0.75	0.56	1	10	12.8	0.0050
	PB	EOC	0.87	0.76	1	9	28.8	0.0005
	PdB	EOC	0.81	0.66	1	9	17.6	0.0023

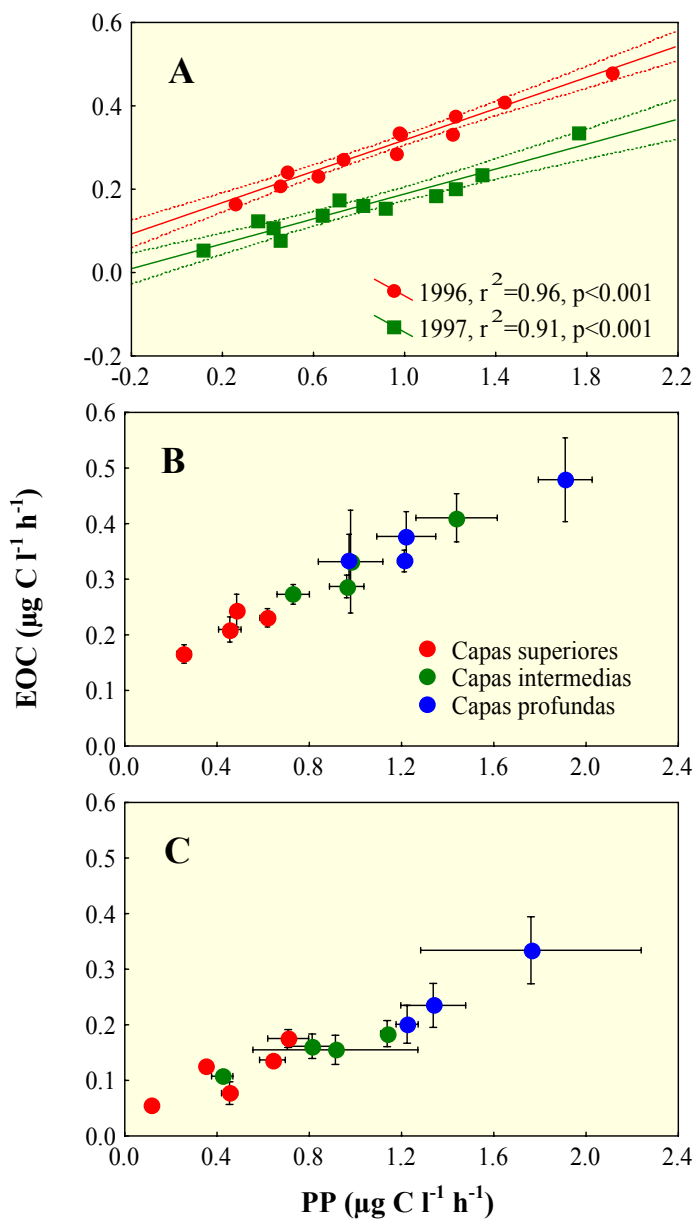
El porcentaje de C orgánico liberado por las algas respecto del producido (%EOC) osciló entre 25 y 65% en 1996, y entre 16 y 48% en 1997, y de modo similar a EOC, los valores fueron significativamente mayores en 1996 que en 1997 ( $U=18$ ,  $p=0.0018$ ). El %EOC presentó valores significativamente mayores en las capas superiores que en el resto de la columna de agua (1996,  $t=4.52$ ,  $df=10$ ,  $p=0.0011$ ; 1997,  $U=2$ ,  $p=0.023$ ) y se relacionó inversa y no linealmente con la PP.

### ***Producción y productividad bacteriana***

Los valores de incorporación bacteriana de TdR (IT) comprendieron entre 0.106 y 0.214  $\text{pmol l}^{-1} \text{h}^{-1}$  en 1996, y entre 0.159 y 0.619  $\text{pmol l}^{-1} \text{h}^{-1}$  en 1997, que se traducen en un rango de variación de producción bacteriana (PB) comprendido entre 0.002 y 0.005  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$  en 1996, y entre 0.003 y 0.013  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$  en 1997 (Tabla 4-1). La productividad bacteriana (PdB) varió entre 0.001 y 0.002  $\text{h}^{-1}$  en 1996, y entre 0.002 y 0.009  $\text{h}^{-1}$  en 1997. La producción bacteriana (PB) presentó valores significativamente mayores en 1997 que



**Figura 4-1.** Relación de la producción primaria (A) y de la productividad primaria (B) con la intensidad de PAR durante 1996 y 1997. Las líneas punteadas indican intervalos del 95% de confianza alrededor de las líneas de regresión (líneas continuas)



**Figura 4-2.** Relación entre excreción de C orgánico (EOC) y producción primaria (PP) para la columna de agua (A) y discriminando entre profundidades en 1996 (B) y 1997 (C). Líneas de regresión e intervalos de confianza como en Figura 4-1. Las barras de error indican media  $\pm$  DE de la variable correspondiente. Algunas barras de error son demasiado pequeñas para ser visibles.

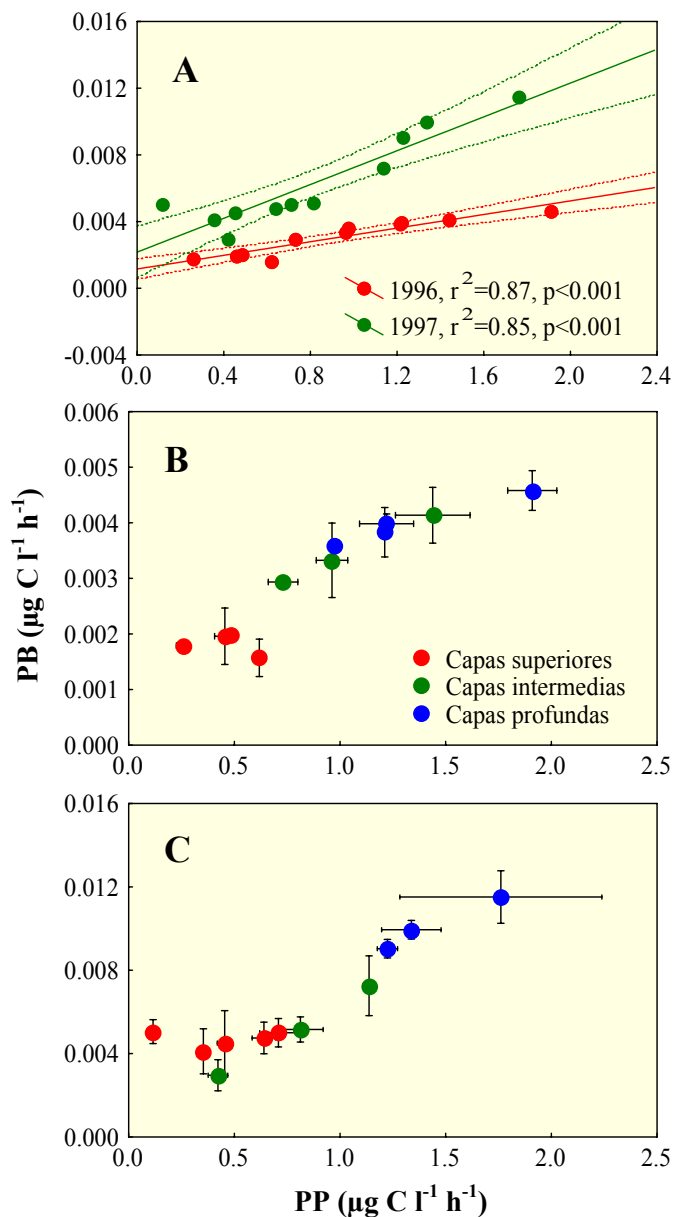


en 1996 ( $t=4.12$ ,  $df=20$ ,  $p=0.0005$ ) y compartió con la PP tanto la tendencia decreciente de sus valores promedio para la columna de agua a lo largo del período libre de hielo, como el patrón de variación a lo largo del perfil vertical, por lo que ambas variables mostraron una significativa relación directa (Figura 4-3), siendo la pendiente significativamente mayor en 1997 que en 1996 (test de paralelismo PB-PP,  $F_{1,18}$ ,  $p=0.0010$ ). Es destacable que, en ambos años, ésta relación positiva PB-PP no se verificó en las capas más superficiales del lago, mientras que sí fue significativa en las capas intermedias y profundas (Figura 4-3 B, C).

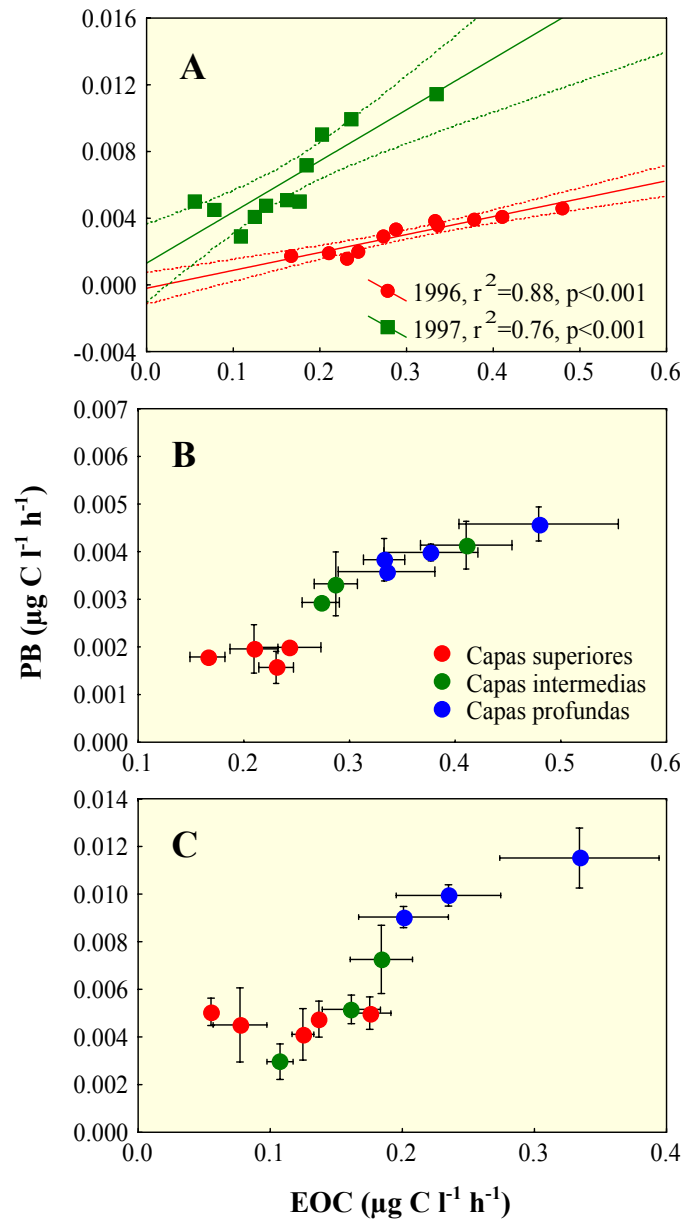
### ***Relación fitoplancton-bacterias***

Los resultados de los análisis de regresión por pasos, realizados para determinar qué factores controlaron la PB, indican que la tasa de EOC fue el único factor predictor tanto de la PB como de la PdB, explicando hasta el 88% y 85% de sus respectivas varianzas en 1996, y el 76% y 66% en 1997. La distribución estacional y vertical de las otras variables estudiadas no fueron incluidas por el modelo ya que no mejoraron de forma significativa la explicación de la varianza (Tabla 4-2). Además, la pendiente de la línea de regresión PB-EOC fue significativamente mayor en 1997 que en 1996 (test de paralelismo PB-EOC  $F_{1,18}$ ,  $p=0.0018$ , Figura 4-4). La positiva relación PB-EOC no se mantuvo en las capas superficiales en ambos años (Figura 4-4 B, C).

Los valores de asimilación bacteriana del C fotosintético liberado por las algas ( $POC_2$ ) estuvieron comprendidos entre 0.015 y 0.103  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$  en 1996, y entre 0.005 y 0.053  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$  en 1997 (Tabla 4-1), siendo significativamente mayores en 1996 que en 1997 ( $t=3.78$ ,  $df=22$ ,  $p=0.0010$ ). No obstante, cuando la asimilación bacteriana se normaliza con respecto a los exudados disponibles, el %PEA no presentó diferencias significativas entre los dos años ( $t=1.93$ ,  $df=22$ ,  $p=0.0668$ ). Las tasas de asimilación bacteriana de C fotosintético mostraron un patrón de distribución vertical similar al de PB, así que ambas variables también se correlacionaron positiva y significativa según una escala espacial y estacional (datos no mostrados). La eficiencia bacteriana de uso de C fotosintético (%CUEb), que no mostró un patrón claro según una escala espacio-temporal, presentó valores significativamente mayores en 1997 que en 1996 ( $U=0$ ,  $p<0.0001$ ). Los valores de CARB fueron significativamente inferiores a los de las tasas de suministro de C orgánico (EOC) tanto en 1996 ( $t=10.50$ ,  $df=10$ ,  $p<0.0001$ ) como en 1997 ( $t=5.94$ ,  $df=10$ ,  $p<0.0002$ ).



**Figura 4-3.** Relación entre producción bacteriana (PB) y producción primaria (PP) para la columna de agua (A) y discriminando entre profundidades en 1996 (B) y 1997 (C). Intervalos de confianza y barras de error como en Figura 4-2.



**Figura 4-4.** Relación entre producción bacteriana (PB) y excreción de C orgánico (EOC) para la columna de agua (A) y discriminando entre profundidades en 1996 (B) y 1997 (C). Intervalos de confianza y barras de error como en Figura 4-2.

## **Los procesos según una escala diaria.**

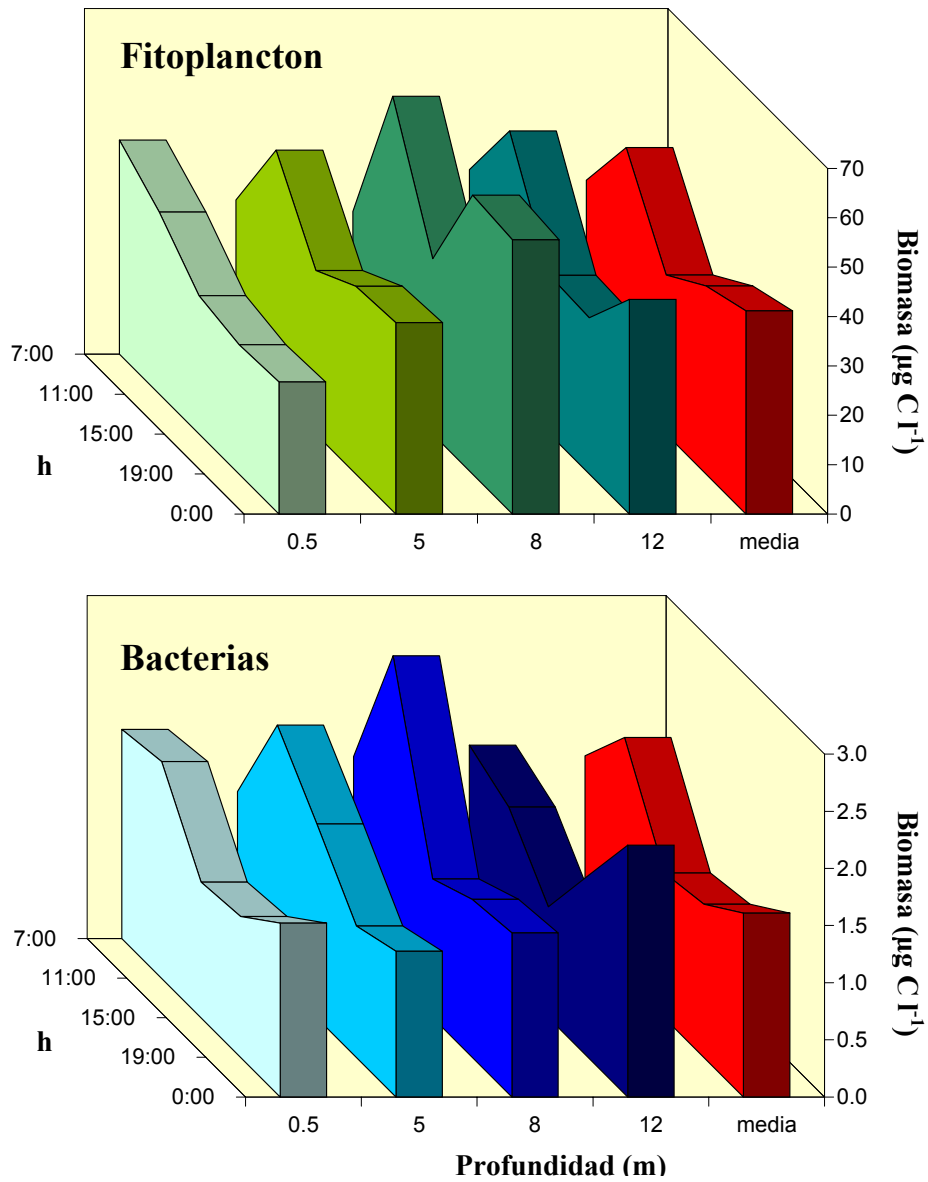
### ***Abundancias y biomasa fitoplanctónica y bacteriana***

La abundancia y biomasa de las algas mostró un patrón temporal diario caracterizado por un fuerte incremento (>40%) de sus valores promedio para la columna de agua desde el amanecer hasta las 11:00. Posteriormente (15:00) tuvo lugar una acusada (>35%) disminución de los valores, para volver a incrementarse de forma paulatina hasta el anochecer (Figura 4-5). La distribución vertical del fitoplancton varió a lo largo del período diario, ya que durante el amanecer los máximos valores de abundancia y biomasa se encontraron en las capas superiores y los mínimos a 8 m, mientras que se encontró una distribución vertical opuesta durante el resto del período diario (Figura 4-5).

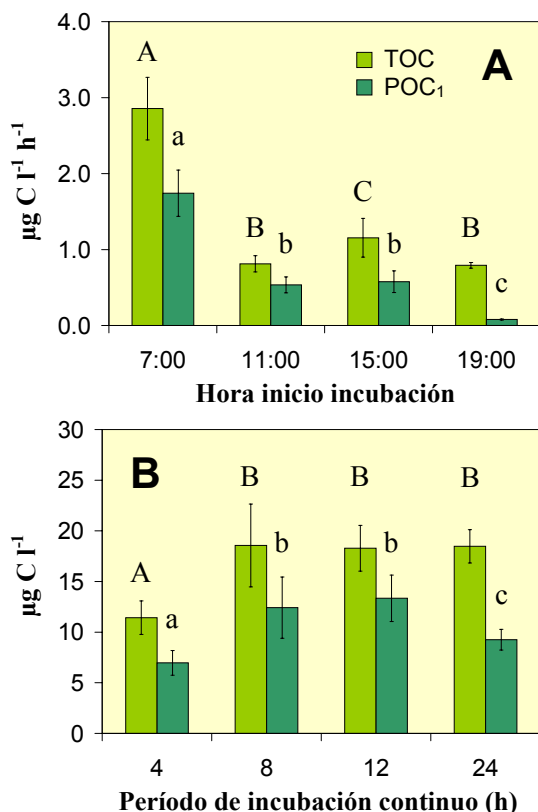
La abundancia y biomasa bacteriana presentó un patrón temporal diario de sus valores promedio para la columna de agua muy similar al de las algas (Figura 4-5). Sin embargo, las variaciones diarias de su distribución vertical no fueron paralelas a las mostradas por el fitoplancton. Así, durante las horas centrales del día (11:00 y 15:00 h) los máximos valores se alcanzaban en las capas intermedias (5 y 8 m, respectivamente) y los mínimos en el fondo, mientras que durante el atardecer (19:00) y noche (00:00) los máximos valores se encontraron en el fondo y los mínimos a 5 m. Durante el amanecer los máximos valores se localizaron en las capas superiores y los mínimos a 5 m (Figura 4-5).

### ***Producción y productividad primaria, y excreción de C por las algas***

El experimento del ciclo diario se llevó a cabo cuando la comunidad fitoplanctónica estaba dominada por las crisofíceas. Los resultados de los períodos discretos de incubación muestran que los valores de producción primaria (PP), medidos como TOC, variaron entre 0.81 y 2.86  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , y los de productividad primaria entre 0.016 y 0.081  $\text{h}^{-1}$ , presentando ambas variables un patrón de variación diario similar. En éste los valores máximos se registraron durante el amanecer, siendo consistentemente más bajos en los restantes momentos del período diurno, aunque con un pequeño incremento de PP y PdP durante la tarde (15:00). Los valores de  $\text{POC}_1$  presentaron un patrón diario paralelo al de PP, excepto al anochecer (19:00), cuando los valores obtenidos fueron los mínimos del período con luz solar (Tabla 4-3, Figura 4-6 A).



**Figura 4-5.** Distribución espacial y temporal de la biomasa de fitoplancton y de bacterias durante un ciclo diario.



**Figura 4-6.** Carbono orgánico total (TOC) y particulado (POC<sub>1</sub>) producido durante períodos discretos (A) y continuos (B) a lo largo de un ciclo diario. Barras de error: medias  $\pm$  DE. Letras diferentes indican períodos en los que la variable respuesta (mayúsculas para TOC, minúsculas para POC<sub>1</sub>) varió significativamente ( $p < 0.05$ ).

Las tasas de excreción de carbono orgánico por las algas (EOC) variaron entre 0.16 y 0.57  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$ , con los valores mínimos durante las horas centrales del día (11:00), significativamente mayores durante la tarde (15:00) y máximos tanto al amanecer como al anochecer. Cuando los valores de EOC se normalizan con respecto a la PP, el porcentaje de C orgánico liberado mostró un patrón inverso al de PP (=TOC), con valores de %EOC mínimos (~16%) al amanecer y máximos (72%) al anochecer (Tabla 4-3, Figura 4-7).

Los resultados de los períodos continuos de incubación muestran que la PP acumulada alcanzó los máximos valores tras un período de incubación de 8 horas de luz diurna, y no hubo diferencias significativas después de períodos de incubación superiores. Los valores de POC<sub>1</sub> acumulados tras 24 h de incubación fueron significativamente inferiores que los

obtenidos tras 12 h, indicando una pérdida de C orgánico producido por las algas, debido tanto a procesos de excreción como de respiración durante las horas nocturnas (Tabla 4-3, Figura 4-6 B). Las pérdidas nocturnas de C orgánico ascendieron a  $4.08 \pm 1.27 \mu\text{g C l}^{-1}$ . La excreción acumulada de C orgánico por las algas (EOC) fue máxima tras el período diario completo (24 h), con valores significativamente superiores a los acumulados tras 12 h desde el amanecer (Figura 4-7, Tabla 4-3). El %EOC acumulado mostró un patrón similar. La excreción acumulada durante el período nocturno fue de  $2.4 \pm 0.2 \mu\text{g C l}^{-1}$ . Los valores de respiración algal fueron  $1.69 \pm 1.04 \mu\text{g C l}^{-1}$ , lo que supone un 10% de la

PP bruta acumulada, calculado como  $R/(PP+R) \times 100$ , donde R es la respiración acumulada nocturna y PP la producción primaria neta acumulada durante el período diurno (12 h).

**Tabla 4-3.** Valores promedio de las variables de actividad algal (ver texto) en períodos discretos y continuos de incubación de un ciclo diario.

Período incubación		PP	POC <sub>1</sub>	PdP	EOC	%EOC
		$\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$\text{h}^{-1}$	$\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	%
Discreto (h inicio)	07:00	2.86	1.74	0.081	0.46	15.88
	11:00	0.81	0.54	0.016	0.16	19.90
	15:00	1.16	0.58	0.036	0.30	26.23
	19:00	0.79	0.08	0.021	0.57	72.07
		$\mu\text{g C l}^{-1}$	$\mu\text{g C l}^{-1}$	período <sup>-1</sup>	$\mu\text{g C l}^{-1}$	%
Continuo (h)	4	11.42	6.97	0.324	1.82	15.88
	8	18.56	12.42	0.436	4.51	24.61
	12	18.28	13.34	0.467	3.81	20.88
	24	18.48	9.26	0.470	6.21	33.73

### ***Producción y productividad bacteriana***

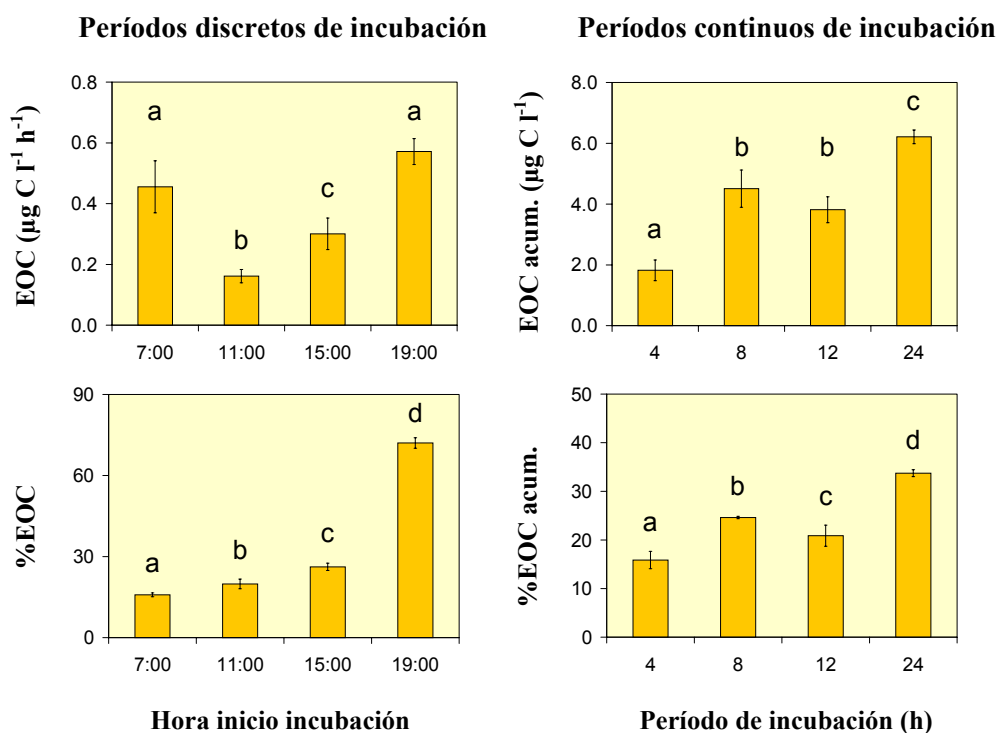
Las tasas promedio de incorporación bacteriana de <sup>3</sup>H-timidina variaron entre 0.24 y 0.77 pmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; su conversión a unidades de C se traduce en un intervalo de variación comprendido entre  $5 \times 10^{-3}$  y  $16 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y una productividad bacteriana de entre  $2 \times 10^{-3}$  y  $12 \times 10^{-3}$  h<sup>-1</sup> (Tabla 4-4).

Tanto la PB como la PdB mostraron un patrón diario con los valores más altos durante el amanecer, tarde y noche (sin diferencias significativas entre ellos), y valores más bajos durante la mañana y el anochecer (sin diferencias significativas entre ellos) (Figura 4-8).

### ***Relación fitoplancton-bacterias***

El C orgánico liberado por las algas que es asimilado por las bacterias (POC<sub>2</sub>) presentó valores comprendidos entre 0.031 y 0.17  $\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  que supusieron entre un 11

y un 37 % del EOC disponible (%PEA, Tabla 4-4). El patrón diario de  $\text{POC}_2$  fue similar al mostrado por PP, con valores máximos al amanecer (07:00), y cuando se normaliza respecto al C orgánico disponible, el porcentaje de carbono fotosintético que es asimilado por las bacterias (%PEA) mostró un patrón casi idéntico al de  $\text{POC}_1$ , con valores máximos durante el amanecer (37%), intermedios en las horas centrales del día (17.7-19.3%) y mínimos al anochecer (11%) (Figura 4-9, Tabla 4.4).



**Figura 4-7.** Excreción de carbono orgánico por las algas: tasas absolutas (EOC), acumuladas (EOC acum.), porcentuales (%EOC) y porcentuales acumuladas (%EOC acum.) durante periodos discretos y continuos sobre un ciclo diario. Barras de error: medias  $\pm$  DE. Letras diferentes indican periodos en los que la variable respuesta varió significativamente ( $p < 0.05$ ).

La eficiencia de uso del C fotosintético por las bacterias (%CUEb) presentó valores significativamente inferiores al anochecer (Figura 4-9, Tabla 4-4). Si se comparan los valores de EOC con los de CARB, éstos últimos fueron significativamente inferiores a los de las tasas de suministro de C orgánico (EOC) a lo largo del ciclo diario ( $t=6.98$ ,  $df=3$ ,  $p=0.0060$ ).

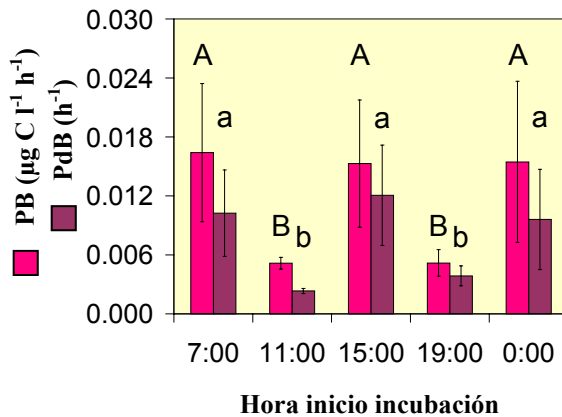


Los resultados de los períodos continuos de incubación muestran una variación del POC<sub>2</sub> acumulado que comprende entre 0.7 y 2  $\mu\text{g C l}^{-1}$ , con los máximos valores tras un período de incubación de 24 horas, significativamente superiores a los valores acumulados tras períodos de incubación inferiores a un ciclo diario completo. Un patrón similar mostró el %PEA acumulado, excepto por los altos valores obtenidos tras el período matinal de 4 horas.

## DISCUSIÓN

### Producción y productividad primaria, y excreción de C por las algas

Los valores de producción y productividad primaria mostraron un patrón de variación más acentuado según una escala espacial que según una escala estacional, en ambos años estudiados. La similitud entre ambas variables reside en el relativamente



**Figura 4-8.** Variación diaria de producción (PB) y productividad (PdB) bacterianas. Barras de error: medias  $\pm$  DE. Letras diferentes indican períodos en los que la variable respuesta (mayúsculas para PB, minúsculas para PdB) varió significativamente ( $p < 0.05$ ).

estrecho intervalo de variación vertical y estacional de los valores de biomasa fitoplanctónica ( $\sim 30$ - $60 \mu\text{g C l}^{-1}$  en 1996, y  $\sim 20$ - $50 \mu\text{g C l}^{-1}$  en 1997), por lo que, en proporción, el proceso tuvo más peso que la biomasa en la distribución de los valores de productividad. En conjunto, los valores de producción y productividad primaria obtenidos se incluyen dentro del rango característico de sistemas oligotróficos de alta montaña y antárticos (Sickman y Melack 1992, Arístegui et al. 1996, Straskrabová et al. 1999b). De entre los potenciales factores que pueden controlar tanto la distribución

estacional como espacial de la PP, el gradiente vertical de irradiancia (PAR) fue el factor que explicó la mayor parte de la varianza de PP, mientras que otros factores potencialmente controladores de la PP como biomasa, temperatura o nutrientes limitantes

(Pace y Cole 1994a, Coveney y Wetzel 1995, Massana et al. 1996, Bouvy et al. 1998, Pedrós-Alió et al. 1999, y referencias citadas) no contribuyeron de forma significativa en el control de la PP (Tabla 4-2).

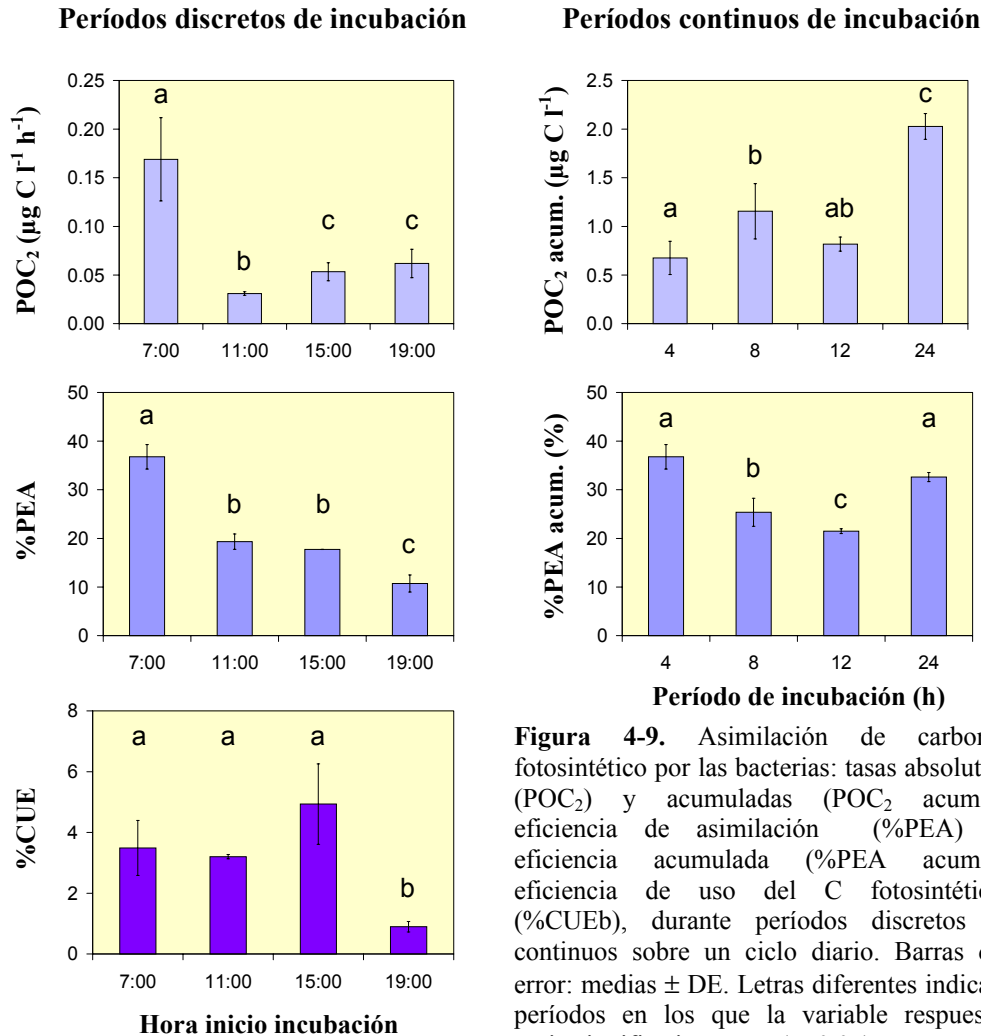
**Tabla 4-4.** Valores promedio de las variables de actividad bacteriana (ver texto) en períodos discretos y continuos de incubación de un ciclo diario.

Período incubación		POC <sub>2</sub>	%PEA	%CUEb	CARB	PB	PdB
		$\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$	%	%	$\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{h}^{-1}$
Discreto (h inicio)	07:00	0.169	36.78	3.49	0.044	0.016	0.010
	11:00	0.031	19.33	3.20	0.027	0.005	0.002
	15:00	0.053	17.74	4.93	0.086	0.015	0.012
	19:00	0.062	10.74	0.90	0.048	0.005	0.004
	00:00	-	-	-	-	0.015	0.010
Acumulado (h)		$\mu\text{g C l}^{-1}$	%				
	4	0.676	36.78				
	8	1.155	25.37				
	12	0.818	21.48				
	24	2.028	32.62				

Aunque la radiación fotosintéticamente activa (PAR) constituye la fuente de energía que restringe la fijación de C inorgánico por los productores primarios (Margalef 1995), la relación inversa encontrada entre PP y PAR en ambos años en La Caldera (Figura 4-1) sugiere un efecto inhibitor de la luz, probablemente debido a la alta intensidad de radiación incidente. De hecho, está bien documentado el efecto fotoinhibidor que puede ejercer una alta irradiancia de PAR sobre los fotosistemas de algas y plantas superiores, al reducir la tasa fotosintética por debajo de los valores de saturación (Neale y Richerson 1987, Cullen y Lewis 1988, Barber y Andersson 1992, Neale et al. 1993, Aguirre-von-Wobeser et al. 2001). No obstante, además de PAR, y relacionado también con la localización del lago, existe una elevada irradiancia incidente del espectro de radiación ultravioleta. Las bajas concentraciones de clorofila y DOC en la columna de agua ( $< 1 \text{ mg l}^{-1}$ ) permiten que dicha radiación pueda penetrar en profundidad (Scully y Lean 1994, Morris et al. 1995, Williamson et al. 1996, Sommaruga y Psenner 1997, Laurion et al. 2000) y ejercer efectos inhibitorios sobre la producción primaria (Moeller 1994, Carrillo et al. 2002), aspectos que serán analizados en el Capítulo V.

El efecto fotoinhibidor ejercido por la radiación solar sobre la PP concuerda con la disminución de las tasas de PP y PdP a partir de las 11:00 h sobre un ciclo diario (Figura 4-6 A). Así, la obtención de los mayores valores de estas variables al amanecer es

el resultado de una menor irradiancia incidente, así como de la actuación de potenciales procesos de recuperación nocturnos de los fotosistemas dañados por UV (Renger et al. 1989, Schofield et al. 1995, Jiménez et al. 1998, Flores-Moya et al. 1998, Cockell y Rothschild 1999).



**Figura 4-9.** Asimilación de carbono fotosintético por las bacterias: tasas absolutas (POC<sub>2</sub>) y acumuladas (POC<sub>2</sub> acum.); eficiencia de asimilación (%PEA) y eficiencia acumulada (%PEA acum.); eficiencia de uso del C fotosintético (%CUEb), durante períodos discretos y continuos sobre un ciclo diario. Barras de error: medias  $\pm$  DE. Letras diferentes indican períodos en los que la variable respuesta varió significativamente ( $p < 0.05$ ).

No obstante, los resultados obtenidos en las incubaciones en continuo, que constituyeron una evaluación *in situ* de una cinética de saturación de la PP, revelaron una aparente ausencia de un efecto inhibitor dependiente de la dosis acumulada de radiación solar sobre PP, por lo menos tras 8 h de incubación (Figura 4-6 B). Estos resultados son

similares a los obtenidos sobre poblaciones de diatomeas antárticas del hielo y sugieren la existencia de una capacidad de reparación celular de los componentes enzimáticos implicados en la fotosíntesis (ej. RuBisCo, FII) potencialmente dañados o funcionalmente inhibidos por la radiación solar (Lesser et al. 1994, Schofield et al. 1995, Figueroa y Gómez 2001). Así, esta capacidad reparadora, que actuaría de modo simultáneo al daño, constituiría una adaptación de organismos que viven en ambientes expuestos a elevadas dosis de radiación solar, tales como la superficie de las capas de hielo o los ecosistemas de aguas claras, aunque la baja temperatura del medio ( $\leq 12$  ° C de máxima estival en 1997) puede determinar una menor eficiencia de estos procesos de reparación (Markager et al. 1999, Gómez et al. 2001, Neale et al. 2001).

La incubación en una profundidad fija durante el ciclo diario impidió la migración vertical de las algas (Carrillo et al. 1991 a) y por tanto la posibilidad de encontrar potenciales refugios de UV, como sugiere la distribución vertical del fitoplancton a lo largo del ciclo diario, con una marcada disminución de la biomasa fitoplactónica en las capas superiores a medida que avanza el día (Figura 4-5, Carrillo et al. 1991 a). Sin embargo, dicho procedimiento nos permitió valorar experimentalmente el efecto de las variaciones de intensidad (y calidad) de la radiación solar sobre la comunidad planctónica, ya que la luz varió en un mayor rango que otras parámetros físico-químicos estudiados como temperatura, conductividad, pH, o nutrientes a lo largo del ciclo diario (datos no mostrados). Las variaciones diarias de abundancia y biomasa fitoplanctónica (promedio de la columna de agua) reflejaron los cambios en la PP para cada una de las fases diarias estudiadas, existiendo una covariación con un desfase temporal de 4 h (Figuras 4-5 y 4-6).

El patrón de PP acumulada a lo largo del ciclo diario muestra que un tiempo de exposición a la radiación mayor de 8 h no se tradujo en un incremento de esta variable, lo que podría deberse a un mayor valor de la razón respiración:producción durante la tarde (desde las 15:00). En cualquier caso, el valor obtenido de la proporción de respiración algal con respecto a la PP bruta (10%) está dentro del intervalo mostrado para especies de cianofíceas y diatomeas obtenidas en cultivo (Beardall et al. 1997), y para especies de microalgas en general, que es del orden del 10% de la PP bruta (Beardall y Raven 1990); no obstante, Arístegui et al. (1996) obtuvieron valores porcentuales de respiración algo más elevados (10-50%) en aguas costeras antárticas, a pesar de que en el citado estudio los valores de PP obtenidos fueron del orden de los obtenidos en La Caldera. Razones metodológicas (técnica Winkler) así como el hecho de que estos autores evaluaron la

respiración de la comunidad microplancónica completa pueden estar en la base de las diferencias obtenidas en relación con la respiración algal.

Sobre una escala estacional e interanual encontramos, como en otros ecosistemas, una relación positiva entre PP y EOC, y de ahí una relación inversa, no lineal, entre %EOC y PP (Sondergaard y Schierup 1982, Sell y Overbeck 1992, Maurin et al. 1997). Estos resultados, junto con la ausencia de relación significativa entre EOC y el biovolumen-densidad del fitoplancton, apoyan la interpretación de Lignell (1990 a) de que la tasa de liberación de C fotosintético es un proceso activo dependiente de la tasa de producción primaria, más que un proceso pasivo proporcional a los parámetros estructurales (Bjørnsen 1988). Este hecho se corrobora particularmente durante 1996, cuando la composición taxonómica fue relativamente constante, con una dominancia de las crisofíceas.

De acuerdo con Feuillade et al. (1986) y Maurin et al. (1997), el %EOC presentó valores mayores en las capas superiores del lago en ambos años, lo que podría ser consecuencia de un daño en la membrana de las células algales provocado por el estrés de radiación solar, que incrementaría su permeabilidad a los sustratos orgánicos (Hellebust 1974). En cualquier caso, estos encuentros apoyan la consideración de %EOC como un indicador de estrés fisiológico, que puede ocurrir cuando existe un desacople entre fotosíntesis y crecimiento determinado por una alta intensidad de radiación solar en un ambiente con escasez de nutrientes (Berman-Frank y Dubinsky 1999). No obstante, también se ha descrito altos valores de %EOC en condiciones de baja intensidad de luz, indicando asimismo una situación de estrés fisiológico (Maurin et al. 1997).

Sobre una escala diaria estos procesos de liberación activa presentan un máximo durante las horas crepusculares (%EOC = 72%). Previos estudios mostraron la capacidad de ciertos conjuntos algales para continuar liberando C fotosintético durante cortos períodos de oscuridad ocurridos tras la exposición a la luz (Mague et al. 1980). Esta respuesta puede ser interpretada como un proceso de excreción del exceso de fotosintato producido durante las horas de diurnas en condiciones de deficiencia celular de P. En este sentido, Plaxton y Carswell (1999) señalan que la excreción de ciertos compuestos orgánicos es una etapa final del catabolismo de fotosintatos cuando siguen rutas alternativas que permiten conservar la concentración intracelular de Pi. Así, la excreción de fotosintatos constituye un proceso funcionalmente equivalente a la más documentada respuesta EPIR (enhanced post-illumination respiration) que supone un incremento de la tasa respiratoria tras la exposición de las algas a un elevado flujo de fotones, proceso que

está descrito tanto para plantas superiores (Heichel 1970), como para especies de microalgas (Falkowski et al. 1985, Beardall et al. 1994). En cualquier caso, de acuerdo con Wood y Van Valen (1990) la liberación de C orgánico parece ejercer una función protectora sobre las algas al evitar la generación excesiva de poder reductor (coenzimas reductores) durante una incrementada tasa respiratoria, y que no podría ser utilizado en crecimiento debido a la limitación de nutrientes (Berman-Frank y Dubinsky 1999).

### **Producción y productividad bacteriana**

Los valores de producción bacteriana estuvieron en el límite inferior del rango característico de sistemas de alta montaña, oligotróficos y antárticos (Thomas et al. 1991 a, b, Reche et al. 1996, Straskrabová et al. 1999b, Davidson y van der Heijden 2000). Los valores de PB constituyeron entre 0.24-4.4% de los de producción primaria, muy alejados por tanto de la proporción media del 20% de PP descrita tanto en el trabajo clásico realizado por Cole et al. (1988) sobre un amplio conjunto de ecosistemas (marinos y de agua dulce), como en estudios realizados dentro de sistemas eutroficados particulares (Kisand et al. 1998). La pendiente de la relación PB-PP fue un orden de magnitud inferior a la establecida por estos autores, indicando una baja eficiencia de uso del C fotosintético por las bacterias en La Caldera.

Es posible que la elevada intensidad de radiación ultravioleta que penetra en los ecosistemas lacustres de alta montaña (Sommaruga y Psenner 1997) pueda afectar negativamente al metabolismo bacteriano (Sommaruga et al. 1997), explicando así los bajos valores de actividad bacteriana encontrados en La Caldera. Sin embargo, el hecho de que existieran significativos cambios interanuales tanto en las pendientes de las líneas de regresión PB-PP y PB-EOC, como en los valores de eficiencia de uso bacteriano del C fotosintético (%CUEb), indica que otros factores, además de la radiación ultravioleta, pueden explicar estos bajos valores de actividad bacteriana. El incremento de producción bacteriana, de %CUEb, y de la pendiente de las líneas de regresión PB-PP y PB-EOC en 1997 con respecto a 1996 puede estar relacionado con las mayores temperaturas del agua en 1997, dada la influencia que ésta variable tiene en la actividad bacteriana en muy diversos ambientes (White et al. 1991, Hoch y Kirchner 1993, Shiah y Ducklow 1994a, b, Coveney y Wetzel 1995; Felip et al. 1996, Tibbles 1997, Simon y Wünsch 1998, *per o* Rivkin et al. 1996). Además, en 1997 tiene lugar la mejora en las condiciones tróficas del sistema debido al “normal” desarrollo de la comunidad zooplanctónica, con el

consiguiente incremento en la disponibilidad de P procedente de la excreción del zooplancton (Carrillo et al. 1996 a, b, Villar-Argaiz et al. 2001, 2002 c). Esto implica una “relajación” de las condiciones de extrema oligotrofia propia del sistema, tal y como indica la razón DIN:TP significativamente más baja en 1997 que en 1996. De modo análogo, Shiah et al. (2001) encontraron un incremento en la pendiente de las líneas de regresión PB-PP en condiciones más mesotróficas.

### **Interacción alga-bacteria: escalas temporales**

La interacción alga-bacteria en La Caldera es fundamentalmente comensalista (ver también Capítulo VII), lo que se manifiesta en las diferentes escalas temporales analizadas. Según una escala estacional, el carbono de origen fotosintético fue el principal factor regulador de la producción bacteriana como muestra la relación directa PB-EOC (Tabla 4-2, Figura 4-4), lo que es verificado por los valores positivos de  $POC_2$  que cuantifica el consumo bacteriano de C fotosintético.

Según una escala diaria esta interacción comensalista se infiere de la similitud de los patrones de la PP y de las variables de actividad bacteriana, como la tasa absoluta ( $POC_2$ ) o la eficiencia (%PEA) de asimilación de C fotosintético. Otros estudios también documentan un estrecho acople diario entre la actividad bacteriana y la fotosintética del fitoplancton (Fuhrman et al. 1985, Coffin et al. 1993, Petit et al. 1999). No obstante, la PB presentó un patrón de variación acoplado al de EOC sólo durante la fase diurna del ciclo, ya que el incremento de EOC ocurrido durante el crepúsculo produjo una respuesta retardada (00:00 h) de la producción bacteriana. Desfases en la asimilación bacteriana de C fotosintético han sido documentados en ecosistemas de diferentes niveles tróficos (Petit et al. 1999, Shiah 1999). Sin embargo, no conocemos el mecanismo subyacente que explique la existencia de este retardo, aunque el papel ejercido por la radiación UV y la capacidad de reparación del ADN bacteriano, tanto dependiente de la luz (fotoreparación) como en oscuridad (reparación ‘oscura’), puede ser tenido en consideración para explicar el patrón diurno de PB y su desfase nocturno. En línea con esta consideración, es llamativo el patrón diario mostrado por PB y %CUEb, que indica que la eficiencia para canalizar hacia biomasa bacteriana el C fotosintético disponible no decae durante las fases del ciclo diario con presencia de una mayor intensidad de radiación UVB. Este patrón podría reflejar la actuación de mecanismos de fotoreparación durante las horas diurnas (ver también Capítulo V). Por otro lado, los mecanismos de reparación oscuros

podrían actuar reparando más lentamente el ADN dañado y ser responsables del pico de actividad nocturna (Booth et al. 2001). No obstante, Shiah (1999), que encuentra un patrón diario con actividad bacteriana máxima durante las horas nocturnas que es independiente de la radiación UV (excluida en su diseño experimental), discute que estas respuestas pueden estar relacionadas con ritmos circadianos de actividad bacteriana, debido a ajustes metabólicos asociados al ritmo de radiación solar.

Aunque las bacterias dependen del C orgánico liberado por las algas, sólo una parte del mismo fue reasimilado por las bacterias (hasta un 36% del valor %PEA), sugiriendo, en principio, que el C fotosintético no parece ser un nutriente limitante para las bacterias. Esta idea está reforzada por el hecho de que los requerimientos bacterianos de C algal (CARB) fueron significativamente inferiores que la disponibilidad de este C (EOC). No obstante, es posible que la capacidad de la radiación solar para transformar sustratos orgánicos lábiles en compuestos menos biodisponibles para el consumo bacteriano conduzca a una limitación potencial de C (Benner y Biddanda 1998, Obernosterer et al. 1999, Obernosterer et al. 2001).

### **Interacción alga-bacteria: escala espacial**

La atenuación vertical que experimenta la radiación solar en la columna de agua determina un gradiente vertical no sólo de intensidad de radiación, sino también de calidad de radiación, dado que el valor de la constante de atenuación vertical varía en función de la longitud de onda (Scully y Lean 1994, Morris et al. 1995, Williamson et al. 1996, Sommaruga y Psenner 1997, Laurion et al. 2000, ver Figura 5-2). Este gradiente vertical de calidad de radiación pudo determinar el patrón vertical mostrado por PB, con los mayores valores en las capas más profundas. De hecho, numerosos trabajos han puesto de manifiesto el efecto inhibitorio directo de UV sobre el crecimiento bacteriano (Aas et al. 1996), consecuencia de los daños al ADN y otras macromoléculas. En línea con estas evidencias, nuestros resultados mostraron que el acople entre PB y PP no se verificó en las capas superiores del lago, donde además, la PB y la tasa de EOC no estuvieron relacionadas. Esta ausencia de relación concuerda con estudios previos realizados en La Caldera (1992-93) cuando la profundidad de la columna de agua comprendió entre 3 y 5 m (Reche et al. 1996), y no se puede descartar que un potencial daño en las bacterias provocado por una alta intensidad de radiación ultravioleta en las



capas superiores fuese la causa de la falta de respuesta de la actividad bacteriana al C liberado por las algas.

El gradiente vertical de calidad de radiación pudo constituir un factor común de covariación que explicara la relación acoplada de PB y PP. Por tanto, para comprender la naturaleza de la interacción algas-bacterias, se hace necesario dilucidar si el gradiente de calidad de radiación actúa directamente sobre la actividad bacteriana causando una relación acoplada PB-PP como covariación a este gradiente, o si actúa de forma indirecta condicionando la excreción de C orgánico y determinando el patrón vertical de actividad bacteriana al depender de aquel carbono. Estos aspectos se tratarán en el Capítulo V.

### **Relación entre estructura y procesos**

Nos parece interesante destacar que no hayamos encontrado una relación entre biomasa y producción bacteriana sobre una escala estacional en ambos años (Tabla 4-2). Siguiendo la aproximación propuesta por Billen et al. (1990), y contrastada por diversos autores (Ducklow 1992, Pace y Cole 1994b, Dufour y Torrétón 1996, Bouvy et al. 1998, Kisand et al. 1998), esta falta de relación es indicativa de un control de las bacterias por depredación, ya que una mayor producción (que actuaría como un índice de un mayor uso de los sustratos *sensu* Billen et al. 1990) no se traduce en un incremento de biomasa debido al consumo por los predadores. No obstante, diferentes autores apuntaron algunas objeciones a esta aproximación:

- Dufour y Torrétón (1996) discuten que la producción bacteriana y el uso de los sustratos no tienen por qué ser proporcionales, al menos sobre un amplio rango de situaciones tróficas intersistémicas.
- Pace y Cole (1994 b) argumentan que la relación entre biomasa bacteriana (BB) y PB puede debilitarse cuando se reduce la escala de estudio (p. ej. ver Ducklow 1992) al tener proporcionalmente una mayor influencia el origen múltiple de los recursos bacterianos (ej. reciclado de otros componentes de la red trófica, entradas alóctonas de recursos).
- Desde otra perspectiva, Pace y Cole (1994 b) discuten que una complicación no considerada por Billen et al. (1990) es el hecho de que la depredación sobre bacterias constituye un mecanismo regenerador de recursos, cuyo resultado sería desacoplar más la biomasa bacteriana del incremento de producción bacteriana.

Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos consideramos que la aproximación de Billen et al. (1990) puede ser aplicada a nuestro estudio. Así, encontramos una proporcionalidad entre la PB y los sustratos de control (EOC), lo que validaría la asunción implícita en el modelo de Billen et al. (1990); aunque nuestra escala de estudio es reducida, el principal recurso controlador de la actividad bacteriana, la exudación de C fotosintético (EOC), tiene un origen homogéneo (autóctono); por último, la regeneración de recursos por depredación *sensu* Pace y Cole (1994 b) no invalida la deducción de un control por depredación a partir del modelo de Billen et al. (1990). En cualquier caso, el control de las bacterias por depredación en La Caldera parece ser suficiente como para verse reflejado en la aproximación de Billen et al. (1990).

Nuestros resultados implican un alejamiento de las tendencias establecidas entre oligotrofia vs. eutrofia que proponen que las bacterias estarían proporcionalmente controladas por depredación en los sistemas eutróficos (principalmente por flagelados, *pero ver* Gasol y Vaqué 1993, Pace y Cole 1994 b) y por los recursos en los oligotróficos (Sanders et al. 1992, Cotner y Biddanda 2002). En La Caldera, dado el escaso desarrollo del bucle microbiano (Capítulo III), el control por depredación de la biomasa bacteriana podría ser llevado a cabo por las propias algas (como además sugiere las relaciones negativas entre ambas comunidades, ver Capítulo III) si están dotadas de un potencial metabolismo mixotrófico (ver Capítulos III y VIII). De hecho, si consideramos una escala diaria, se observa que el incremento relativo de PB ocurrido a partir de las 15:00 h no se reflejó en un incremento significativo de los valores de biomasa bacteriana. Variaciones de la BB asociadas a un control por depredación según una escala diaria se han documentado en estudios previos (ej. Psenner y Sommaruga 1992). Por tanto es sugerente especular con la posibilidad de una alta tasa de bacterivoría por parte de algas mixótrofas durante las horas de máxima irradiación solar, lo que les permitiría acceder a una fuente alternativa de C y nutrientes minerales en una fase crítica del día (ver Capítulo VIII).

Es interesante destacar que, extendiendo el modelo de Billen et al. (1990) a la comunidad fitoplanctónica tampoco se obtenga una relación significativa entre la PP y biomasa algal, particularmente en 1996, cuando los herbívoros fueron muy escasos (Capítulo III). Esto implica que la biomasa algal no está regulada por el metabolismo autotrófico (medido como PP) y apunta a que la biomasa algal puede estar sustentada por otros recursos orgánicos: las bacterias. De todo lo anteriormente señalado se deduce la necesidad de probar experimentalmente la existencia de esta capacidad bacterívora y la posible influencia de la luz en este proceso, lo que se tratará en el Capítulo VIII.

## **CAPÍTULO V**

---

### **Efectos del espectro de radiación solar**

Lo que hace mover la vida es... una pequeña corriente eléctrica, mantenida por la luz solar.

Albert Szent-Györgyi (1893-1986)

## INTRODUCCIÓN

El espectro de radiación solar, que comprende tanto la radiación ultravioleta (UVR) como la radiación visible o fotosintéticamente activa (PAR), es responsable de diversos procesos fotoquímicos y fotobiológicos que afectan a los ciclos biogeoquímicos globales (Zepp et al. 1995). La degradación de la capa de ozono estratosférico, una de las principales causas del cambio climático global, ha causado un incremento del flujo de radiación ultravioleta B (UVB) sobre la superficie de la Tierra (Blumthaler y Ambach 1990, Crutzen 1992) y los ecosistemas acuáticos (Karentz et al. 1994, Weiler y Penhale 1994, Häder 1997). Puesto que la comunidad planctónica funciona a través de una red de intercambio de energía y nutrientes, mediada por un diverso conjunto de productores y consumidores que, en última instancia, dependen de la energía aportada por el sol, cualquier alteración en la composición espectral de la radiación solar puede modificar la estructura (Vinebrooke y Leavitt 1996, 1999) y el funcionamiento de la red trófica pelágica. Para comprender el ciclo del C en los ecosistemas acuáticos es necesario evaluar los efectos que ejercen las diferentes regiones espectrales de la radiación solar sobre la producción primaria, excreción de C orgánico por el fitoplancton, asimilación de este C por las bacterias, y el flujo de C desde el bucle microbiano hasta los niveles tróficos superiores. Este conocimiento implicaría un progreso en nuestra comprensión del ciclo global de C y su impacto en el calentamiento climático.

En los últimos años se ha prestado una considerable atención al efecto que UVR ejerce sobre los productores primarios en los ecosistemas acuáticos. De este modo, está documentado que la radiación UVB (280-320 nm) inhibe la producción primaria probablemente debido a:

- daños directos inducidos en el ADN (dímeros de pirimidina, 6-4 fotoproductos) de especies pico- y fitoplanctónicas (Karentz et al. 1991, Buma et al. 1995, Buma et al. 1997, Boelen et al. 2000, 2001, Helbling et al. 2001).
- inhibición de la incorporación de C inorgánico (Vincent y Roy 1993, Cullen y Neale 1994, y sus referencias).
- inhibición la actividad del fotosistema II (Friso et al. 1994, Schofield et al. 1995) y de la RuBisCo (Neale et al. 1993, Wilson et al. 1995).
- inhibición de la incorporación de nutrientes minerales:  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  (Döhler 1988, 1992, 1994, 1997, 1998, Behrenfeld et al. 1995), y P (Hessen et al. 1995, 1997).

Otros autores han mostrado que es la radiación UVA la causa principal de la inhibición de la producción primaria (Bühlman et al. 1987, Smith et al. 1992, Kim y Watanabe 1993, Helbling et al. 2001, Callieri et al. 2001) y por tanto, independiente de la concentración de ozono estratosférico (Arrigo 1994). No obstante, la radiación UVA puede también ejercer un efecto directo positivo al activar mecanismos de fotoreparación dependientes de fotoliasas (Kim y Sancar 1993, Friedberg et al. 1995), contrarrestando así el efecto inhibitorio directo de UVB (Quesada et al. 1995, Quesada y Vincent 1997).

En relación con cambios estructurales y poblacionales de las comunidades fitoplanctónicas, algunos estudios han mostrado que la exposición a la radiación UVB puede provocar cambios en la composición química celular (Goes et al. 1996, Skerratt et al. 1998, Smith et al. 1998), en su contenido pigmentario (Figuerola et al. 1997 a, Altamirano et al. 2000), en su movilidad (Nielsen et al. 1995) o en la capacidad de germinación de sus propágulos (Wiencke et al. 2000), favoreciendo a las especies más tolerantes a dicha radiación y propiciando variaciones en la composición taxonómica (Davidson et al. 1996, Laurion et al. 1998, *pero ver* Halac et al. 1997). Más aún, la menor vulnerabilidad de las células fitoplanctónicas grandes, relacionada con su mayor concentración de pigmentos fotoprotectores (Karentz et al. 1991, García-Pichel 1994, Quesada et al. 1999, Sommaruga y García-Pichel 1999, *pero ver* Laurion y Vincent 1998), puede determinar un incremento de la biomasa de los productores primarios tras exposiciones prolongadas a la radiación UVB, aunque también las fuerzas hidrodinámicas afectan a la estructura de tamaños del fitoplancton (Rodríguez et al. 1998, 2001). Estos cambios en la composición y biomasa de los organismos en la base de la red trófica podrían alterar la dinámica y estructura de la red trófica en ecosistemas acuáticos (Häder y Worrest 1991, 1997).

En contraste con nuestro conocimiento de los efectos de UVR sobre los productores primarios, no disponemos de información acerca del impacto del espectro de radiación solar sobre la liberación de C orgánico por las algas en condiciones naturales. No obstante, está documentado que el fitoplancton libera una alta proporción del C fijado fotosintéticamente en condiciones de alto estrés de radiación, tales como las capas superiores de lagos oligotróficos, particularmente durante la época estival (Berman y Holm-Hansen 1974, Wood y Van Valen 1990, Maurin et al. 1997), debido a un desacople entre fotosíntesis y crecimiento algal (Berman-Frank y Dubinsky 1999). Sin embargo, Pausz y Herndl (1999) no encontraron un incremento significativo en el porcentaje de exudación de C fotosintético de diatomeas cultivadas en condiciones de laboratorio cuando eran expuestas a UVR.

Recientes estudios han puesto de manifiesto que la radiación UVB inhibe las tasas de producción bacteriana (Herndl et al. 1993, Müller-Niklas et al. 1995, Aas et al. 1996), a través de la formación de dímeros de ciclobutil pirimidina en bacterioplancton (Jeffrey et al. 1996 a, b, Visser et al. 1999), así como del fotoproducto pirimidina (6-4) pirimidona (Rosenstein y Mitchell 1987, Mitchell y Nairn 1989), que a su vez es susceptible de sufrir una ulterior conversión dependiente de UVB a su fotoisómero de valencia, la pirimidona Deward (Taylor et al. 1990). Asimismo, se ha documentado un efecto inhibitorio, incluso más acentuado, de la radiación UVA sobre la actividad bacteriana (Sieracki y Sieburth 1986, Helbling et al. 1995, Aas et al. 1996, Sommaruga et al. 1997, Visser et al. 1999).

Como consecuencia de este impacto negativo de UVR sobre la actividad bacteriana, se puede establecer un probable escenario consistente en una disminución del consumo bacteriano del carbono orgánico liberado por las algas, restringiéndose de este modo la disponibilidad de C para los niveles tróficos superiores a través del bucle microbiano. Estos procesos pueden conducir a una acumulación de materia orgánica disuelta (DOM) fotoalterada (Benner y Biddanda 1998, Obernosterer et al. 1999, Obernosterer et al. 2001), o su liberación a la atmósfera como CO<sub>2</sub> tras su fotólisis (Karentz et al. 1994).

No obstante, el ADN dañado por la radiación UVB puede ser fotoreparado por UVA y PAR a través de enzimas fotoliasas (Kim y Sancar 1993, Friedberg et al. 1995), contribuyendo algunas de estas enzimas a la eliminación de los (6-4) fotoproductos (Todo et al. 1993). El ADN también puede ser reparado por otros mecanismos independientes de la luz, tales como la excisión de nucleótidos o la reparación post-replicativa (Sancar y Sancar 1988, Friedberg et al. 1995, Miller 2000, Booth et al. 2001), que requieren la formación de nuevos oligonucleótidos, la acción simultánea de varias enzimas, y el consumo de ATP (Miller y Kojohn 1990). Esto hace, en esencia, que la fotoreparación sea un mecanismo menos costoso energéticamente que la reparación “oscura”.

Por otro lado, UVR puede estimular de forma indirecta el crecimiento bacteriano a través de la foto-oxidación de la materia orgánica disuelta (DOM) hasta compuestos de peso molecular más bajo, más asimilables por las bacterias (Lindell et al. 1995, Wetzel et al. 1995, Kaiser y Herndl 1997, Moran y Zepp 1997, Chróst y Faust 1999), dependiendo del origen y calidad de DOM (Herndl 1997, Benner y Biddanda 1998, Tranvik y Kokalj 1998, Obernosterer y Herndl 2000, Obernosterer et al. 1999, 2001). Este efecto estimulador indirecto de UVR también puede estar relacionado con un incremento en la disponibilidad de nutrientes inorgánicos tras la fotodegradación de DOM (Wängberg et

al. 1999). Sin embargo, un efecto indirecto negativo causado por la interacción de UVR y DOM es la formación de peróxidos de hidrógeno y radicales de oxígeno (Mopper y Zhou 1990, Scully et al. 1995, 1996, Abele-Oeschger et al. 1997), que dañan biomoléculas clave de los organismos (Karentz et al. 1994) e inhiben la producción bacteriana (Xenopoulos y Bird 1997). Aunque las tasas de formación de estos radicales son bajas en lagos con escaso contenido en DOM, la alta penetración de UVR ejerce un efecto compensatorio que puede conducir a un alto contenido de estos compuestos (Scully et al. 1995, 1996).

La controversia existente acerca del impacto del espectro de radiación solar sobre algas y bacterias, y la ausencia de información acerca de su efecto sobre la interacción alga-bacteria, no permite realizar predicciones fiables. En este sentido, sería importante plantear algunas cuestiones:

- ¿En qué medida la magnitud de la acción negativa de las radiaciones UVB y UVA sobre los organismos es contrarrestada por los efectos beneficiosos de las radiaciones UVA y PAR (Smith et al. 1992, Quesada et al. 1995, Quesada y Vincent 1997).
- ¿Pueden los resultados experimentales ser extrapolados a las condiciones naturales?

En el Capítulo anterior se mostró que la relación directa entre la producción primaria y la producción bacteriana mediada por la excreción de C fotosintético (EOC) no se verificó en las capas superiores del lago. Discutíamos que esta falta de relación podría estribar en la inhibición del crecimiento bacteriano por una alta intensidad de radiación ultravioleta en las capas superiores.

Nosotros hipotetizamos que el estrés debido a UVR inhibe la producción primaria fitoplanctónica e incrementa la liberación de productos extracelulares fotosintéticos en ecosistemas oligotróficos de aguas claras. Como consecuencia, la producción bacteriana debería aumentar a corto plazo, estableciéndose una relación acoplada entre ambas comunidades. Este escenario sería posible solamente si los efectos perjudiciales de UVB y UVA sobre las bacterias son contrarrestados por los efectos beneficiosos de UVA y PAR (Kim y Sancar 1993, Kaiser y Herndl 1997, Davidson y van der Heijden 2000), permitiendo el estímulo de la producción bacteriana como respuesta a una mayor disponibilidad de C orgánico.

Evaluamos esta hipótesis mediante la cuantificación experimental *in situ* de los efectos de la composición espectral de la radiación solar sobre la producción primaria, liberación de C orgánico por las algas, producción bacteriana y su interacción comensalista.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño experimental

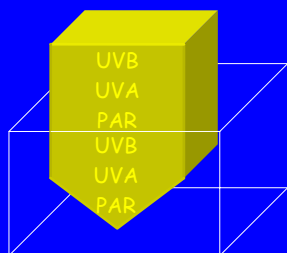
Los experimentos se realizaron durante días despejados de mediados (Agosto) y finales (Octubre) del período libre de hielo de 1997, dos fases críticas de la sucesión estacional de la comunidad pelágica en La Caldera (Carrillo et al. 1996a, Medina-Sánchez et al. 1999, Villar-Argaiz et al. 2001). Para cada experimento se construyó una muestra compuesta de agua del lago al mezclar en un contenedor volúmenes iguales de muestras tomadas con una botella Van Dorn horizontal de 6 l en tres profundidades homogéneamente espaciadas dentro de la capa afectada por >1 % de la radiación UVB (0-5 m). Las muestras se filtraron a través de una malla de Nyltal de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro para eliminar el zooplancton.

Cada tratamiento de luz consistió en un conjunto de botellas experimentales (3 claras y 1 oscura) de cuarzo de 70 ml de capacidad nominal para producción primaria, y 8 (6 + 2 blancos) de 25 ml de capacidad nominal para producción bacteriana, situadas horizontalmente sobre una plataforma, y cubiertas por los adecuados filtros según el tratamiento: (i) luz completa, con sólo las botellas experimentales de cuarzo; (ii) exclusión de UVB, cubriendo las botellas experimentales con láminas de Mylar<sup>®</sup>-D (Dupont de Nemours); (iii) exclusión de UVB y UVA, cubriendo las botellas experimentales con Plexiglass<sup>®</sup> UF3; (iv) oscuridad, cubriendo las botellas experimentales con un material opaco. Las propiedades ópticas del material de cuarzo de las botellas experimentales, así como de los filtros usados en los tratamientos de luz se comprobaron previamente con un espectrofotómetro de doble haz UV-visible (Perkin-Elmer Lambda 40), y los filtros se cambiaron para cada experimento.

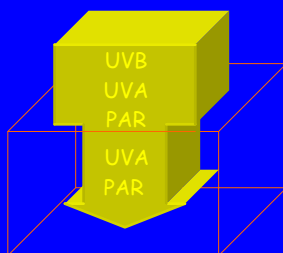
Inmediatamente antes de la incubación, las botellas experimentales correspondientes a cada tratamiento de luz se llenaron a partir de la muestra compuesta (arriba descrita), se les añadió el respectivo radiotrazador ( $\text{H}^{14}\text{CO}_3$  para PP, y [ $^3\text{H}$ ]metil timidina (TdR) a 10.9 nM c.f. para PB, y seguidamente se incubaron *in situ* a 0.5 y 5 m,



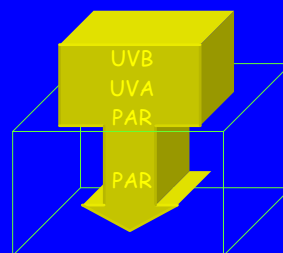
## Diseño experimental



Cuarzo ⇒ UVB+UVA+PAR



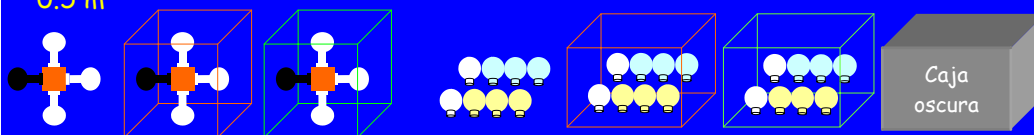
Mylar-D ⇒ UVA+PAR



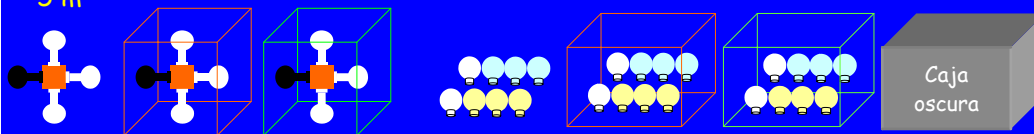
UF-3 ⇒ PAR



0.5 m






5 m



PP, trazador:  $H^{14}CO_3$

PB, trazador: ( $^3H$ -metil)timidina

-  = Botella oscura
-  = Botella de cuarzo
-  = Plataforma

-  = Botella de cuarzo (blanco)
-  = Botella de cuarzo (tratamiento TCA)
-  = Botella de cuarzo (tratamiento ADNasa)

profundidades que correspondieron al 64% y 1.1 % de la intensidad de radiación UVB<sub>305</sub> incidente, respectivamente. Los tiempos de incubación abarcaron 4 h para la producción primaria y 1 h para la bacteriana, ambos tiempos simétricamente distribuidos alrededor del mediodía solar. Dado que las muestras fueron tomadas al mediodía, los organismos ya habían estado sometidos a la radiación solar durante al menos 5 horas. Transcurridos los tiempos de incubación, el procedimiento analítico seguido fue el que se describe en el Capítulo II.

### **Medidas de radiación solar**

La radiación ultravioleta incidente (en el medio aéreo) se midió con un dosímetro Eldonet en una estación próxima situada a 2850 m de altitud (datos cedidos por Dr. F. L. Figueroa). Asimismo, se obtuvieron perfiles de irradiancia-profundidad a 305, 320, 340 y 380 nm (la amplitud de banda a la mitad del máximo es 8-10 nm), y PAR (400-700 nm) con un radiómetro sumergible Biospherical PUV-500B en Septiembre de 1998, en días soleados y dentro de un intervalo máximo de 3 h alrededor del mediodía solar, realizados en colaboración con Dr. R. Sommaruga. Los coeficientes de atenuación difusa de irradiancia ( $K_{d,\lambda}$ ) se determinaron a partir de la pendiente de regresión lineal del logaritmo natural de la irradiancia,  $E_{d,\lambda}(z)$ , vs. profundidad ( $z$ ). Se utilizó un gran tamaño de muestra (pares de valores de  $E_{d,\lambda}(z)$  y  $z$ ,  $n > 350$ ) y se obtuvo un buen ajuste ( $r^2 > 0.98$ ) para todas las regresiones.

Paralelamente a los experimentos se obtuvieron perfiles de irradiancia-profundidad de PAR (400-700 nm) mediante un contador esférico de fotones (LiCor LI 193SA). Debido a la falta de medidas directas de la radiación UV en 1997, y a la estabilidad de la concentración de DOC en La Caldera durante el período 1997-1998 ( $\sim 0.5 \text{ mg l}^{-1}$ , Reche y Sommaruga, comunicación personal) se estimó el porcentaje de la irradiancia incidente de UV que alcanzaba las profundidades experimentales siguiendo una modificación del modelo de Morris et al. (1995) para concentraciones de DOC inferiores a  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . Este modelo fue el que mejor se ajustó al perfil de irradiancia de UV medida, de entre cuatro modelos empíricos (Tabla 5-1) que relacionan la radiación UV con la concentración de DOC, como principal factor que explica la atenuación de la radiación UV en lagos. El ajuste se cuantificó mediante un test de paralelismo y ANCOVA entre el perfil de irradiancia-profundidad medido y el derivado del modelo para cada longitud de onda de UVR, con la profundidad como covariable.

### Análisis estadísticos

Como consecuencia de los efectos opuestos que las diferentes regiones del espectro de radiación solar pueden ejercer sobre los organismos, hemos considerado en el análisis de los datos dichas regiones individualmente (UVB, UVA, PAR) o agrupadas (UVR, UVA+PAR, UVB+UVA+PAR) como factores que potencialmente afectan a las distintas variables respuesta: PP, EOC, %EOC, %PEA, %CUEb y PB. El efecto que una determinada región del espectro de radiación solar ejerció sobre cada variable respuesta

**Tabla 5-1.** Ajuste de diversos modelos empíricos que relacionan el coeficiente de atenuación ( $K_{d\lambda}$ ) del espectro de radiación UV con la concentración de DOC, al perfil de irradiancia-profundidad medido en el sistema para cada longitud de onda ( $\lambda$ ) según test de paralelismo y ANCOVA.

Modelo	Ecuaciones	Test	ANCOVA	Ref.
		paralelismo	p	
1	$K_d\text{UVB}=0.415[\text{DOC}]^{1.86}$ $K_d\text{UVA}=0.299[\text{DOC}]^{1.53}$	<0.0050	<0.0205	(1)
		<0.0005	<0.0105	
2	$K_{d305}=2.76[\text{DOC}]^{1.23}$ $K_{d320}=2.09[\text{DOC}]^{1.12}$ $K_{d340}=1.64[\text{DOC}]^{1.13}$ $K_{d380}=0.83[\text{DOC}]^{1.16}$	<0.0060	<0.0260	(2)
		<0.0040	<0.0260	
		<0.0090	<0.0310	
		>0.6950	>0.3010	
3	$K_{d\lambda}=\exp(-0.01347\lambda+5.36[\text{DOC}]^{0.157})$	<0.0001	<0.0060	(3)
4	$K_{d305}=7.62[\text{DOC}]^{3.07}$ $K_{d320}=5.62[\text{DOC}]^{2.89}$ $K_{d340}=4.52[\text{DOC}]^{2.96}$ $K_{d380}=2.68[\text{DOC}]^{2.97}$	>0.2040	>0.3440	(4)
		>0.1715	>0.3260	
		>0.2735	>0.4715	
		>0.8400	>0.6490	

(1) Scully y Lean (1994)

(2) Morris et al. (1995); Modelo para  $\lambda$  única

(3) Morris et al. (1995); Modelo para  $\lambda$  múltiple

(4) Carrillo et al. (2002); Modelo a partir de (2) para  $[\text{DOC}] < 1 \text{ mg l}^{-1}$

(Factor luz, Tabla 5-2) fue analizado mediante ANOVA de 1 vía comparando los dos tratamientos de luz que se diferenciaron exclusivamente en esta región espectral (*Tratamientos de luz vs. Tratamientos control*, Tabla 5-2).

Para comprobar que se verificaban las asunciones requeridas por el ANOVA, se examinó la normalidad de la distribución de los datos (mediante el test W de Shapiro-

Wilks), la homocedasticidad (mediante los tests de Cochran y Levene), y la correlación entre las medias y las desviaciones estándar. Los datos se transformaron logarítmicamente cuando estas condiciones no se cumplían. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistica<sup>®</sup> 5.1 para Windows<sup>®</sup> (StatSoft 1997).

**Tabla 5-2.** Esquema de los *Tratamientos de luz* y *Tratamientos control* que son comparados mediante ANOVA para determinar el efecto de una determinada región espectral de la radiación solar (*Factor luz*) sobre las variables respuesta (ver texto). Para cada tratamiento, se indica el material utilizado y la composición espectral de la radiación solar que penetra e incide en la muestra.

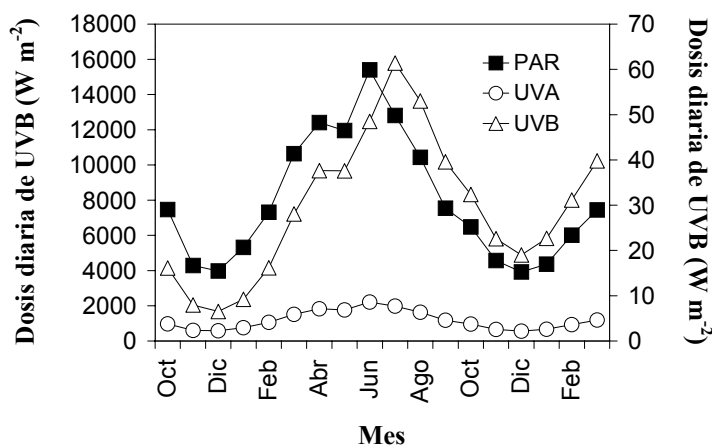
<i>Factor luz</i>	<i>Tratamientos de luz</i>		<i>Tratamientos control</i>	
	Material	Comp. espectral	Material	Comp. espectral
UVB	Cuarzo	UVB+UVA+PAR	Mylar <sup>®</sup> -D	UVA+PAR
UVA	Mylar <sup>®</sup> -D	UVA+PAR	Plexiglass <sup>®</sup> UF3	PAR
PAR	Plexiglass <sup>®</sup> UF3	PAR	Oscuro	–
UVR	Cuarzo	UVB+UVA+PAR	Plexiglass <sup>®</sup> UF3	PAR
UVA+PAR	Mylar <sup>®</sup> -D	UVA+PAR	Oscuro	–
Luz solar	Cuarzo	UVB+UVA+PAR	Oscuro	–

## RESULTADOS

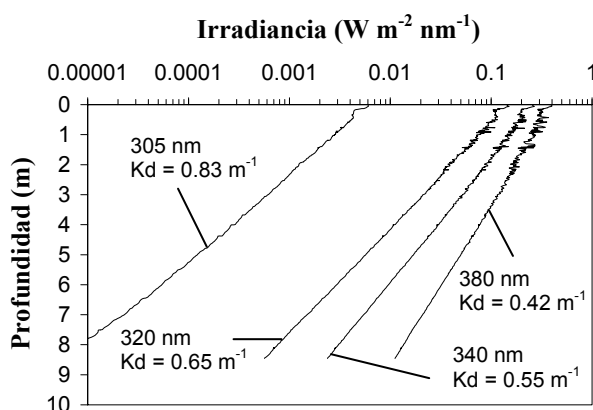
### Medidas de radiación solar

La variación mensual de la dosis promedio diaria incidente (en el medio aéreo) de UVB, UVA y PAR (Figura 5-1) reflejó estrechamente la variación estacional del ángulo solar. Los perfiles verticales obtenidos en La Caldera para la radiación UV a 305, 320, 340, y 380 nm en 1998 (Figura 5-2) muestran la alta penetración de UVR en este ecosistema de aguas claras. De acuerdo con los perfiles de irradiancia-profundidad de PAR y las ecuaciones de la Tabla 5-1 para el modelo modificado de Morris et al. (1995),

las profundidades experimentales recibieron los porcentajes de intensidad de radiación incidente correspondientes a PAR y a las longitudes de onda de UVR que se detallan en la Tabla 5-3. Alrededor del 10 % (en promedio) de la intensidad de PAR alcanzó la profundidad de 11 m durante 1997, y el lago fue ligeramente más transparente a PAR a



**Figura 5-1.** Dosis diaria de PAR, UVA y UVB registrada desde Octubre de 1997 hasta Marzo de 1999 con un dosímetro Eldonet por Dr. F. L. Figueroa en una estación cercana a La Caldera a 2850 m de altitud.



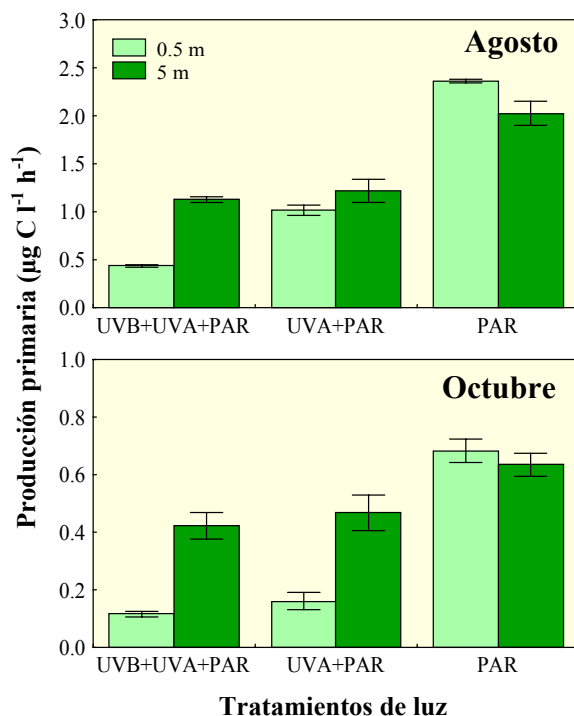
**Figura 5-2.** Gráfico semi-logarítmico de la irradiancia a 305, 320, 340 y 380 nm vs. profundidad en La Caldera, medida el 26/09/98 con un radiómetro multicanal sumergible PUV-500B por Dr. R. Sommaruga. Se muestran los coeficientes de atenuación difusa ( $K_d$ ).

finales del período libre de hielo (Octubre,  $K_d$  medio =  $0.18 \text{ m}^{-1}$ ) que a mediados de verano (Agosto,  $K_d$  medio =  $0.19 \text{ m}^{-1}$ ) en 1997.

**Tabla 5-3.** Porcentajes de intensidad de radiación incidente de UVB<sub>305</sub>, UVB<sub>320</sub>, UVA<sub>340</sub>, UVA<sub>380</sub>, y PAR que alcanzan las profundidades experimentales en la columna de agua de La Caldera.

Profundidad (m)	% Irradiancia incidente				
	UVB <sub>305</sub>	UVB <sub>320</sub>	UVA <sub>340</sub>	UVA <sub>380</sub>	PAR
0.5	63.6	68.4	74.7	84.2	92.0
5	1.1	2.2	5.4	18.0	40.6

### Efectos del espectro de radiación solar sobre la producción primaria y la liberación de C orgánico por las algas

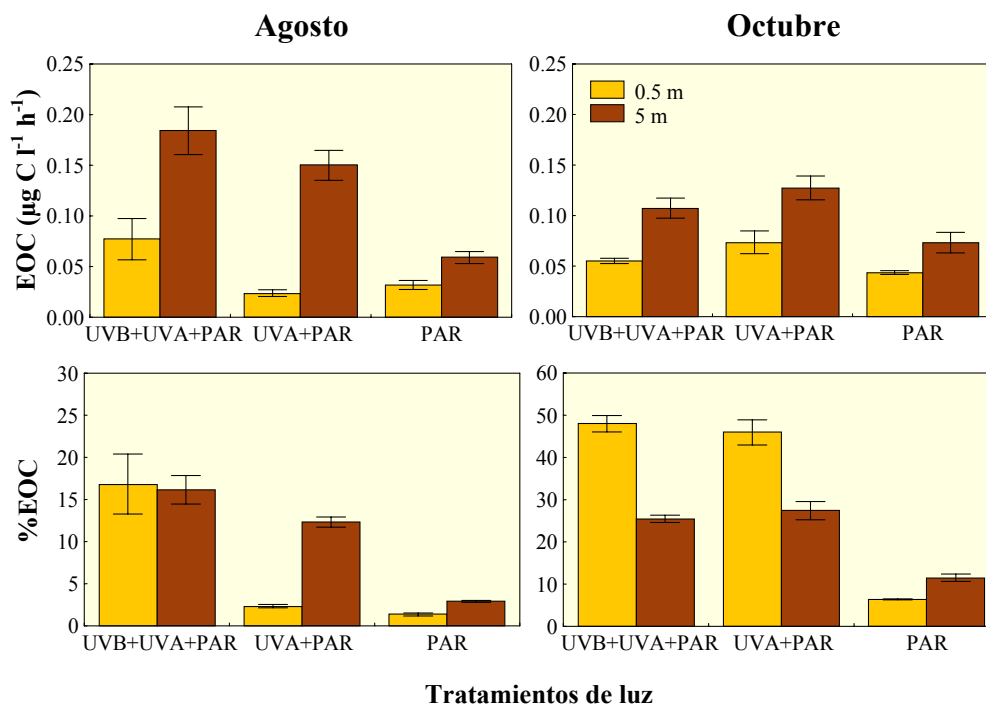


**Figura 5-3.** Producción primaria medida *in situ* en distintas condiciones de luz. Las barras de error indican medias  $\pm$  DE.

La tasa de incorporación de  $^{14}\text{C}$  inorgánico por el fitoplancton fue inhibida significativamente por UVR en ambas profundidades. En conjunto, UVR inhibió a la producción primaria (PP) en un 81-83% en las capas superiores y en un 33-44% en las capas intermedias (Tabla 5-4). Los valores de PP a 0.5 m disminuyeron desde  $2.36 \pm 0.02 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en el tratamiento PAR hasta  $0.45 \pm 0.03 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en el tratamiento de luz solar completa en Agosto, y desde  $0.68 \pm 0.04$  hasta  $0.12 \pm 0.01 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para los mismos tratamientos respectivos, en Octubre (Figura 5-3). El efecto inhibitorio de UVR sobre PPN se debió principalmente a la radiación UVA en ambas profundidades, y se encontró un efecto inhibitorio

significativo de la radiación UVB sobre PP solamente en Agosto a 0.5 m (Figura 5-3, Tabla 5-4).

Las tasas de excreción de C orgánico por las algas (EOC) variaron desde  $0.024 \pm 0.003$  hasta  $0.184 \pm 0.024 \mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Figura 5-4). La radiación ultravioleta (UVR) produjo un incremento de los valores de EOC tanto en las capas superiores como en las intermedias. Este efecto fue debido principalmente a UVA, aunque UVB también ejerció un efecto muy significativo en las capas superiores durante Agosto (Tabla 5-4, Figura 5-4). Los valores de EOC fueron significativamente mayores en las capas intermedias que en las superiores, independientemente del tratamiento de luz y fecha experimental ( $F_{1,10}$ ,  $p=0.011$ ).



**Figura 5-4.** Excreción de carbono orgánico (EOC) y %EOC con respecto al carbono orgánico producido, medidos en los tratamientos experimentales de luz en las capas superiores e intermedias del lago. Las barras de error indican medias  $\pm$  DE.

Con objeto de comparar los efectos de la composición espectral de la radiación solar sobre la liberación de C orgánico entre experimentos, los valores de excreción de C orgánico (EOC) se normalizaron con respecto a los correspondientes valores de C orgánico producido (PP). De este modo, %EOC comprendió desde 1.3 hasta 48%, con

valores experimentales generalmente mayores a finales del período libre de hielo (Octubre) que a mediados de verano (Agosto), y siendo máximos en las capas superiores bajo exposición a UVR (Figura 5-4).

La radiación UVR incrementó el porcentaje de excreción de carbono fotosintético (%EOC) en ambas profundidades y períodos estudiados. Este efecto se debió principalmente a UVA, aunque UVB también contribuyó a mediados de verano, particularmente en las capas superiores (Tabla 5-4, Figura 5-4).

### **Efectos del espectro de radiación solar sobre la incorporación de TdR por las bacterias**

Mientras que en las capas intermedias ninguna región espectral de la radiación solar ejerció efectos significativos sobre las tasas de incorporación bacteriana de TdR, se encontró un claro patrón en las capas superiores (Figura 5-5): las tasas de incorporación de TdR fueron 3-4 veces mayores en los tratamientos UVA+PAR y PAR que en los oscuros, y fueron significativamente inhibidas por UVB. Este efecto inhibitorio fue más pronunciado a finales del período libre de hielo (82%), que a mediados de verano (39%). La luz solar completa estimuló (2 veces) las tasas de incorporación de TdR a mediados de verano pero las inhibió (37%) a finales del período libre de hielo (Tabla 5-5).

### **Efectos del espectro de radiación solar sobre el uso bacteriano del C orgánico suministrado por las algas**

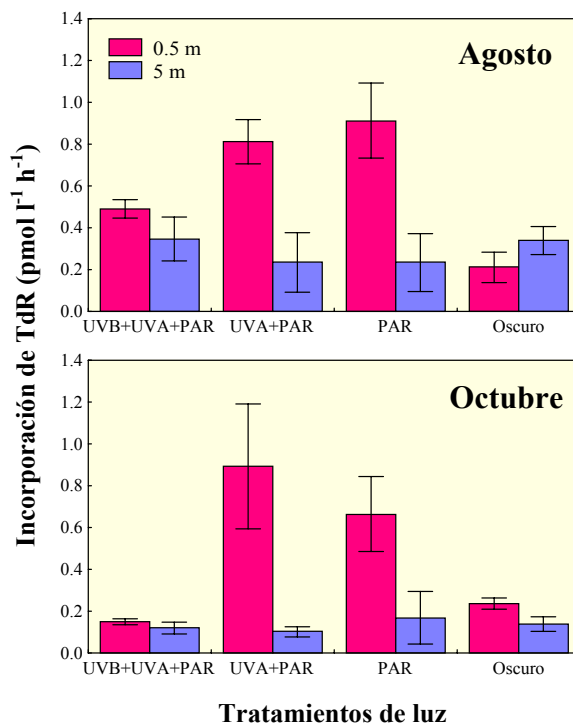
La asimilación bacteriana del C fotosintético liberado por las algas (POC<sub>2</sub>, Tabla 5-6) no mostró un patrón claro. Sin embargo, cuando se normalizó con respecto a los sustratos potencialmente disponibles, el porcentaje de exudados fotosintéticos asimilados por las bacterias (%PEA) presentó un patrón de variación similar al de las tasas de incorporación de TdR en las capas superiores, con los valores más altos en los tratamientos UVA+PAR y PAR (Tabla 5-6, Figura 5-6).

En las capas intermedias, el %PEA fue significativamente mayor en los tratamientos PAR ( $F_{1,4}$ ,  $p < 0.001$  en cada período) pero no mostró diferencias significativas entre los tratamientos UVB+UVA+PAR y UVA+PAR (Tablas 5-4 y 5-6).



En conjunto, los valores de %PEA fueron mayores a mediados de verano que a finales del período libre de hielo (Tabla 5-6).

Los valores de eficiencia de uso del C fotosintético por las bacterias (%CUEb) fueron significativamente mayores a mediados de verano que a finales del período libre de hielo para cada tratamiento de luz en las capas superiores ( $F_{1,4}$ ,  $p < 0.005$ , Tabla 5-6). Además, los valores de %CUEb fueron significativamente mayores en las capas superiores que en las intermedias en cada tratamiento de luz ( $F_{1,4}$ ,  $p < 0.01$ , Tabla 5-6). Aunque no se observaron diferencias significativas entre tratamientos de luz en las capas intermedias, en las superiores %CUEb mostró un patrón de variación similar al de las tasas de incorporación de TdR y de %PEA (Tabla 5-6, Figura 5-6).



**Figura 5-5.** Tasas de incorporación bacteriana de TdR medidas en los tratamientos experimentales de luz en las capas superiores e intermedias del lago. Las barras de error indican medias  $\pm$  DE.

## DISCUSIÓN

Hasta donde nosotros conocemos, esta investigación constituye la primera evaluación *in situ* del papel de la composición espectral de la radiación solar en la interacción alga-bacteria. La elucidación de esta interacción es crucial para la comprensión del flujo de C desde el bucle microbiano hasta niveles tróficos superiores,

**Tabla 5-4.** Efectos de distintas regiones espectrales de la radiación solar en cada profundidad expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las variables respuesta (ver texto) con respecto a cada control, en Agosto y Octubre de 1997. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

		Agosto 1997									
		PP		EOC		%EOC		%PEA		%CUEb	
Efecto	Prof.(m)	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
UVB	0.5	-55	***	224	**	620	***	-69	***	-81	***
	5	-7	n.s.	23	n.s.	31	*	-7	n.s.	22	n.s.
UVA	0.5	-57	***	-25	n.s.	73	**	19	***	20	*
	5	-40	**	155	***	324	***	-54	***	-60	n.s.
UVR	0.5	-81	***	142	**	1149	***	-63	***	-77	***
	5	-44	***	212	***	456	***	-57	***	-52	n.s.

		Octubre 1997									
		PP		EOC		%EOC		%PEA		%CUEb	
Efecto	Prof.(m)	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
UVB	0.5	-28	n.s.	-25	n.s.	4	n.s.	-65	***	-77	***
	5	-10	n.s.	-16	n.s.	-7	n.s.	-9	n.s.	40	n.s.
UVA	0.5	-76	***	69	**	619	***	-7	n.s.	-21	n.s.
	5	-26	*	74	**	138	***	-67	***	-64	n.s.
UVR	0.5	-83	***	26	**	651	***	-67	***	-82	***
	5	-33	**	47	*	121	***	-70	***	-49	n.s.

en particular en los lagos oligotróficos de alta montaña, donde la mayor parte del C orgánico disuelto (DOC) es de origen autóctono (Laurion et al. 2000, Reche et al. 2001). En este tipo de lagos, con bajos valores de DOC y clorofila, el porcentaje de penetración de la radiación UV en la columna de agua es muy alto (Scully y Lean 1994, Morris et al. 1995, Williamson et al. 1996, Sommaruga y Psenner 1997, Laurion et al. 2000). Así, en

La Caldera, más del 1% de la intensidad de radiación UVB superficial alcanzó los 5 m de profundidad.

### **Efectos del espectro de radiación solar sobre la producción primaria y la liberación de C orgánico por las algas**

De acuerdo con nuestra hipótesis, los resultados ponen de manifiesto que UVR inhibió en gran medida la producción primaria fitoplanctónica. En conjunto, el efecto de UVA fue más acusado que el de UVB, aunque tanto UVB como UVA ejercieron un efecto negativo similar a mediados de verano en las capas superiores del lago. Diversos estudios han documentado que UVA constituye una causa principal de inhibición de las tasas fotosintéticas en fitoplancton y picoplancton autótrofo (Bühlman et al. 1987, Cullen et al. 1992, Helbling et al. 1992, Smith et al. 1992, Kim y Watanabe 1993, Holm-Hansen et al. 1993, Bertoni y Callieri 1999, Helbling et al. 2001, Callieri et al. 2001). Estos resultados están relacionados con el hecho de que, aunque la radiación UVA contiene menos energía por fotón que la radiación UVB, en el espectro de radiación solar existe una mayor fracción de UVA que de UVB, por lo que su efecto puede ser mayor, con independencia de la concentración de ozono estratosférico (Cullen et al. 1992, Arrigo 1994). Además, se considera que gran parte de la inhibición ejercida por UVR sobre la fotosíntesis en fitoplancton es el resultado de cambios estructurales de los pigmentos fotosintéticos (Young et al. 1993), y es conocido que la radiación UVA puede dañar de forma indirecta al ADN mediante la formación de radicales de oxígeno que pueden formar muescas en las cadenas de ADN y enlaces cruzados entre proteínas y ADN (Peak y Peak 1989).

Los valores de producción y productividad primarias fueron consistentemente más bajos en Octubre que en Agosto, lo que probablemente estuvo relacionado con la menor temperatura registrada a finales del período libre de hielo (ver Tabla 3-1), dado el efecto fisiológico de este factor sobre la fotosíntesis (Davison 1991, Markager et al. 1999). Sin embargo, la inhibición de la producción primaria por UVR fue de intensidad similar en ambos períodos estudiados (Tabla 5-4), lo que contrasta con los resultados obtenidos en otros estudios, referentes a una intensificación del efecto inhibitorio de UVR sobre la actividad fotosintética cuando la temperatura es baja (Gómez et al. 2001, Neale et al. 2001).

Aunque la excreción de C orgánico (EOC) estuvo directamente relacionada con la producción primaria (PP) según una escala estacional y vertical (Capítulo IV), consistente con los encuentros de otros autores (Lignell 1990a, Maurin et al. 1997), nuestros resultados experimentales mostraron valores significativamente mayores de EOC dentro de cada capa discreta cuando las algas estuvieron expuestas a UVR. En conjunto, UVA fue la región del espectro responsable de este incremento de EOC. No obstante, UVB también causó un incremento significativo de EOC en las capas superiores del lago a mediados de verano, coincidiendo con el efecto inhibitor de UVB sobre la producción primaria. Este resultado pudo deberse a la mayor dosis incidente de UVB a mediados de verano que a finales del período libre de hielo (Figura 5-1). Cuando los datos de EOC se normalizaron con respecto a la producción de C orgánico total para comparar entre experimentos con diferente composición fitoplanctónica, se obtuvo un patrón similar y más pronunciado de %EOC (Figura 5-4). Este resultado, junto con el hecho de que los valores de %EOC medidos estacionalmente en la columna de agua fueran mayores en las capas superiores del lago que en las profundas en 1996 y 1997 (Capítulo IV), apoya la consideración de %EOC como un indicador de estrés fisiológico que puede reflejar el grado de desacople entre fotosíntesis y crecimiento determinado por el estrés de radiación UV en sistemas deficientes en nutrientes (Berman-Frank y Dubinsky 1999).

### **Efectos del espectro de radiación solar sobre la incorporación de TdR por las bacterias**

La producción bacteriana normalmente es estimada mediante la cuantificación de las tasas de incorporación de precursores moleculares, tales como TdR (Fuhrman y Azam 1982). Diversos estudios han mostrado que la mayor parte de la TdR incorporada por las bacterias se localiza en su ADN (Fuhrman y Azam 1982, Jeffrey et al. 1990, Ducklow et al. 1992, *pero ver* Robarts et al. 1986), y es por tanto usada para medir la síntesis de ADN y de aquí el crecimiento celular (Moriarty 1990). Estos ensayos de incorporación de TdR se realizan en contenedores opacos, ya que la incubación en oscuridad elimina los efectos estimuladores de la producción primaria sobre el crecimiento bacteriano (Aas et al. 1996). Sin embargo, las incubaciones en oscuridad también eliminan los efectos negativos de la radiación solar sobre las bacterias y otros componentes del ecosistema (Aas et al. 1996). Por ello, tal y como indican Sommaruga et al. (1997), la exposición simultánea del bacterioplancton y del precursor (ej. TdR) a la radiación solar daría una estimación más

realista de las tasas de incorporación *in situ*, ya que la irradiación y los procesos de consumo no estarían separados en el tiempo ni en el espacio.

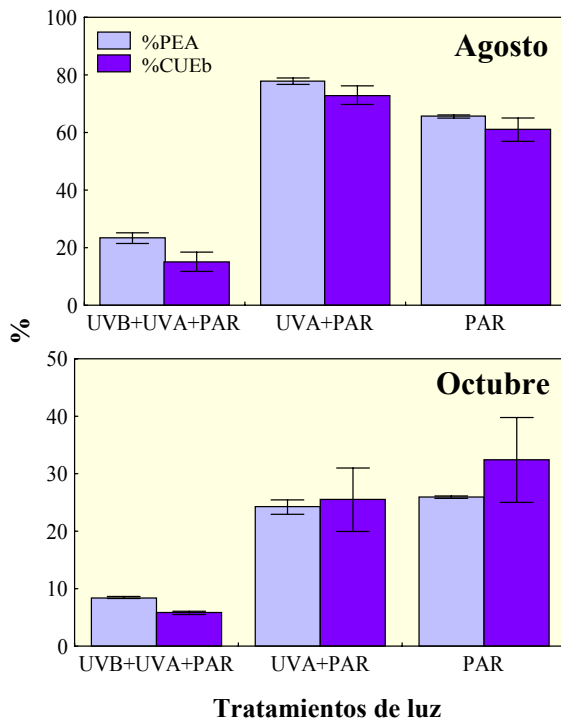
**Tabla 5-5.** Efectos de distintas regiones espectrales de la radiación solar en cada profundidad expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las tasas de incorporación de TdR con respecto a cada control, en Agosto y Octubre de 1997. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s.: no significativo.

Luz	Prof.(m)	Ago-97		Oct-97	
		$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
UVB	0.5	-39	**	-82	**
	5	48	n.s.	18	n.s.
UVA	0.5	-11	n.s.	34	n.s.
	5	0	n.s.	-40	n.s.
UVR	0.5	-46	**	-78	***
	5	48	n.s.	-29	n.s.
PAR	0.5	334	**	181	**
	5	-31	n.s.	22	n.s.
(UVA+PAR)	0.5	286	**	278	**
	5	-31	n.s.	-27	n.s.
Luz	0.5	133	**	-37	**
	5	2	n.s.	-14	n.s.

Porque nuestro principal objetivo era evaluar el efecto de la composición espectral de la radiación solar sobre la interacción alga-bacteria en las condiciones más próximas a las naturales, en nuestra aproximación experimental nosotros expusimos simultáneamente las bacterias (en agua completa, sin tratar) y su trazador (TdR) a la radiación solar *in situ*. De esta forma, la irradiación solar, el proceso de incorporación bacteriana de TdR, la influencia del C fotosintético liberado por las algas, y otras interacciones complejas entre procesos abióticos (ej. fotólisis de DOM, formación de radicales libres, etc.) y bióticos (ej. competencia por nutrientes minerales limitantes) no estuvieron separados en el tiempo durante las incubaciones.

Esta aproximación metodológica ya había sido realizada en el estudio de Aas et al. (1996), con incubaciones de entre 2 y 11.5 horas. Sin embargo, dado que la TdR puede ser fotoalterada por exposición a la radiación solar (*ver discusión* en Sommaruga et al. 1997), en nuestro estudio incubamos por un período de tiempo que no excedió de 1 h. Además, los resultados obtenidos en experimentos paralelos realizados con muestras de agua del lago a las que se les había retirado las algas, mostraron que no hubo diferencias significativas entre las tasas de incorporación de TdR obtenidas bajo condiciones de luz solar y las obtenidas en oscuridad cuando la composición elemental bacteriana fue suficientemente rica en P para crecer (Medina-Sánchez et al. 2002, ver Capítulo VII, Tabla 7-1, Figura 7-2). Por tanto, según estos resultados, en nuestras condiciones experimentales la fotoalteración potencial de TdR fue insignificante tras estos cortos períodos de incubación (1 h).

Los resultados obtenidos usando esta aproximación metodológica muestran que UVB inhibió la PB sólo en las capas superiores del lago, lo que es consistente con los resultados de otros estudios y con la capacidad de UVB de dañar directamente al ADN (Sieracki y Sieburth 1986, Herndl et al. 1993, Müller-Niklas et al. 1995, Aas et al. 1996, Jeffrey et al. 1996 a, b, Visser et al. 1999). Aunque la intensidad de radiación incidente de UVB es más baja en Octubre que en Agosto debido al mayor ángulo solar (Figura 5-1),



**Figura 5-6.** %PEA y %CUEb medidos en los tratamientos experimentales de luz en las capas superiores del lago. Las barras de error indican medias  $\pm$  DE.

encontramos que el efecto negativo de UVB sobre las tasas de incorporación de TdR fue más acusado en Octubre. Como discuten Laurion et al. (2000), las variaciones en las densidades de fitoplancton en ecosistemas de aguas claras con bajos valores de concentración de DOC pueden también ejercer un efecto aditivo sobre la atenuación de UVR. De hecho, aunque el DOC constituye el primer factor regulador de la atenuación de UVR, los valores del porcentaje de atenuación obtenidos a partir de modelos basados en la concentración de DOC son aproximados, estimas de primer orden que no toman en consideración la absorción o dispersión por otras sustancias y partículas en el agua, que podrían ser responsables de la variabilidad de  $K_{d,\lambda}$  que no es explicada por la concentración de DOC (Morris et al.

1995, Williamson et al. 1996). Por tanto, la disminución de la densidad de fitoplancton (Medina-Sánchez et al. 1999, Capítulo III) en Octubre con respecto a la de Agosto pudo conducir a la inhibición más pronunciada de la PB por UVB observada en Octubre.

El efecto estimulador significativo de UVA+PAR y PAR sobre las tasas de incorporación de TdR observadas en las capas superiores puede ser explicado como una

respuesta bacteriana al incremento de liberación de C orgánico por las algas, al menos bajo la radiación UVA. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Aas et al. (1996) y Sommaruga et al. (1997) en algunos de sus experimentos en agua completa (presencia de algas). Más aún, Aas et al. (1996) encontraron que la retirada de la fracción particulada  $>0.8 \mu\text{m}$  condujo a la pérdida de los efectos estimuladores de PAR, UVA+PAR, y luz solar completa. Esto sugiere que las interacciones entre los productores primarios y las bacterias pueden influenciar en el efecto de UVR sobre la actividad bacteriana.

No obstante, otros procesos subyacentes en la respuesta bacteriana al C orgánico pudieron también ser responsables de este patrón. Así, es conocido que el ADN dañado puede ser reparado tanto por enzimas fotoliasas (mecanismos de fotoreparación) que son activadas por longitudes de onda largas de UVA (370 a 400 nm) y longitudes de onda cortas de PAR (400 a 450 nm) y que anulan los efectos dimerizantes de UVB (Kim y Sancar 1993, Friedberg et al. 1995), como por mecanismos independientes de la luz (Sancar y Sancar 1988, Friedberg et al. 1995, Booth et al. 2001). Estos procesos de reparación serían pertinentes en nuestras condiciones experimentales porque el bacterioplancton ya había sido expuesto de forma natural e ininterrumpida a la radiación solar completa durante unas 5 horas previamente a las incubaciones, así que es altamente probable que el ADN bacteriano estuviera ya parcialmente dañado (Visser et al. 1999). Tal y como indican Aas et al. (1996), la incorporación de radioisótopos no permite discriminar entre los que son incorporados por la síntesis semiconservativa de ADN, de los que lo son por la síntesis reparadora de ADN, por lo que nuestros resultados no pueden ser utilizados para cuantificar mecanismos de reparación. Sin embargo, se acepta que los mecanismos de reparación “oscuros”, que son consumidores de timidina, son los únicos que operan en oscuridad (Sancar y Sancar 1988). Por tanto, esperaríamos que las tasas de incorporación de TdR debido a la reparación “oscura” (consumidora de TdR) serían como máximo similares en los tratamientos UVA+PAR y PAR que en los oscuros. Por tanto, el incremento de las tasas de incorporación de TdR observadas en nuestro estudio en los tratamientos UVA+PAR y PAR (hasta 3-4 veces superiores) con respecto a los oscuros, se debió principalmente a la síntesis semiconservativa de ADN, y por tanto a un crecimiento celular, que fue posible gracias a la fotoreparación del ADN dañado.

Como resumen de todo lo anterior, nosotros interpretamos el incremento significativo de las tasas de incorporación de TdR en los tratamientos UVA+PAR y PAR como una respuesta bacteriana debida a la recuperación por fotoreparación en condiciones de alta intensidad de UVA y PAR, que se manifiesta como un estimulado

crecimiento bacteriano si está disponible el suficiente C fotosintético. De hecho, los resultados de experimentos paralelos llevados a cabo en La Caldera muestran que, en ausencia de algas, esta recuperación potencial no se manifestó como un estímulo en el crecimiento bacteriano (Medina-Sánchez et al. 2002, Capítulo VII). Más aún, Aas et al. (1996) encontraron un efecto inhibitor mayor de la radiación solar en ausencia de algas. Aunque en los tratamientos de radiación solar completa también ocurren los mecanismos de fotoreparación y un incremento en la tasa de exudación de C orgánico fotosintético, el daño simultáneo ejercido por la exposición a UVB y/o la potencial alteración del C fotosintético (Benner y Biddanda 1998, Obernosterer et al. 1999, Obernosterer et al. 2001, Reche et al. 2001) pudieron frenar el estímulo de la actividad bacteriana.

Nuestros resultados experimentales son consistentes con los obtenidos por Kaiser y Herndl (1997), quienes encontraron una recuperación significativa de la actividad bacteriana previamente inhibida por UVB, después de que el bacterioplancton fuera expuesto a UVA y PAR. No obstante, mientras que estos autores encontraron esta recuperación a intensidades de UVA y PAR moderadamente bajas, nosotros sólo lo detectamos a altas intensidades de luz, esto es, en las capas superiores del lago. Nuestros resultados concuerdan con los de Davidson y van der Heijden (2000) quienes encontraron que las bacterias en agua completa fueron capaces de reparar el daño inducido por UVR y crecer mientras residían en aguas superficiales de la Antártida.

A la luz de las anteriores consideraciones, nosotros concluimos que el efecto neto de la radiación solar completa (estimulador o inhibitor) sobre la actividad bacteriana en las capas superiores es el resultado de la interacción entre los efectos nocivos de UVB y los procesos de recuperación promovidos por UVA y PAR. Así, la fotoreparación pudo contrarrestar completamente el efecto negativo de UVB a mediados de verano, pero no a finales del período libre de hielo, probablemente debido al más severo efecto dañino de UVB durante este último periodo en la columna de agua. La fotoreparación, debido a su bajo coste energético, será particularmente ventajosa para las bacterias que viven en ambientes donde la luz solar es abundante pero la disponibilidad de nutrientes es baja (Weinbauer et al. 1997), tales como los lagos oligotróficos de alta montaña. Por tanto, esta capacidad de recuperación puede ser interpretada como un mecanismo adaptativo, por el cual las bacterias utilizan UVA y PAR para contrarrestar de forma simultánea el daño provocado por la exposición a altas intensidades de UVB, particularmente cuando residen en las capas superiores del lago.



### Efectos del espectro de radiación solar sobre el uso bacteriano del C orgánico suministrado por las algas

Como aproximación para evaluar experimentalmente el efecto de la composición espectral de la radiación solar sobre las bacterias y sobre la interacción alga-bacteria, nosotros cuantificamos la proporción de exudados fotosintéticos asimilados por las bacterias (%PEA) bajo diferentes regímenes de luz. El hecho de obtener los mayores valores en los tratamientos UVA+PAR y PAR en las capas superiores del lago, o en los

**Tabla 5-6.** Tasas absolutas de asimilación de exudados fotosintéticos por las bacterias ( $\text{POC}_2$ ), normalizadas con respecto a los exudados disponibles (%PEA), y eficiencias de uso del carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb), obtenidos en los experimentos. Los valores son medias  $\pm$  DE.

Mes	Prof. (m)	Tratamiento	$\text{POC}_2$ ( $\mu\text{g C l}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	PEA (%)	CUEb (%)
Ago	0.5	UVB+UVA+PAR	$0.019 \pm 0.006$	$24.0 \pm 1.7$	$14.1 \pm 2.9$
		UVA+PAR	$0.019 \pm 0.003$	$77.8 \pm 1.1$	$73.0 \pm 3.2$
		PAR	$0.021 \pm 0.003$	$65.6 \pm 0.5$	$61.0 \pm 4.0$
	5	UVB+UVA+PAR	$0.034 \pm 0.002$	$18.8 \pm 1.3$	$4.0 \pm 0.7$
		UVA+PAR	$0.030 \pm 0.002$	$20.1 \pm 0.6$	$3.2 \pm 1.7$
		PAR	$0.026 \pm 0.002$	$43.4 \pm 1.3$	$8.2 \pm 4.1$
Oct	0.5	UVB+UVA+PAR	$0.005 \pm 0.000$	$8.5 \pm 0.2$	$5.8 \pm 0.3$
		UVA+PAR	$0.018 \pm 0.003$	$24.2 \pm 1.2$	$25.5 \pm 5.5$
		PAR	$0.011 \pm 0.001$	$25.9 \pm 0.2$	$32.4 \pm 7.4$
	5	UVB+UVA+PAR	$0.014 \pm 0.006$	$12.4 \pm 4.3$	$2.4 \pm 0.3$
		UVA+PAR	$0.017 \pm 0.001$	$13.6 \pm 0.2$	$1.7 \pm 0.2$
		PAR	$0.030 \pm 0.005$	$41.2 \pm 1.7$	$4.6 \pm 3.0$

tratamientos PAR en las capas intermedias, indica que las bacterias pueden incorporar el C orgánico “fresco” recién liberado por las algas con una mayor eficiencia bajo estas condiciones de luz que bajo la radiación solar completa (presencia de UVB) (Tabla 5-6, Figura 5-6). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pausz y Herndl (1999) en experimentos de laboratorio con algas cultivadas. Por tanto, UVB también afectó a la

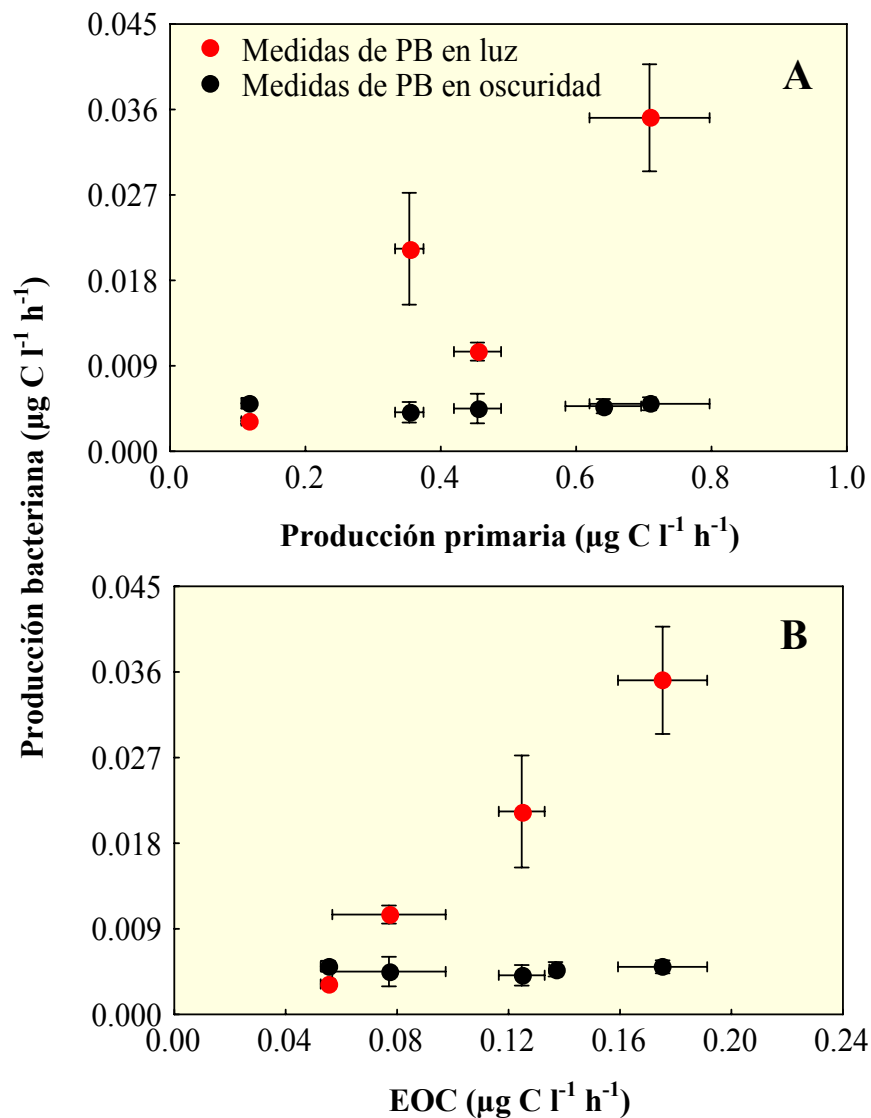
eficiencia de consumo de C fotosintético por las bacterias, lo que pudo estar relacionado con la inhibición del crecimiento bacteriano por UVB mostrado en nuestro estudio, aunque también la biodisponibilidad del C liberado por el fitoplancton pudo estar disminuida bajo UVB debido a procesos de humificación (Benner y Biddanda 1998, Obernosterer et al. 1999, Obernosterer et al. 2001, Reche et al. 2001).

Aunque la dosis total de UVR recibida por las bacterias fue diferente en las dos aproximaciones experimentales ( $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H-TdR}$ ), se encontró un patrón similar de %PEA y de las tasas de incorporación de TdR en las capas superiores. Este resultado sugiere una relación entre la capacidad de las bacterias para incorporar el C y su capacidad para canalizarlo hacia nueva biomasa bacteriana. Así, la eficiencia de uso del C fotosintético por las bacterias (%CUEb) puede cuantificar esta relación, porque las tasas de incorporación de timidina pueden ser convertidas a C bacteriano producido mediante el apropiado factor de conversión, calculado para este sistema (ver Capítulo II). En conjunto, los máximos valores de %CUEb se obtuvieron en los tratamientos de luz sin UVB en las capas superiores del lago (Tabla 5-6, Figura 5-6). Por tanto, %CUEb, %PEA y las tasas de incorporación de TdR compartieron un patrón similar en las capas superiores del lago en este estudio.

Para extrapolar nuestros resultados experimentales a las condiciones naturales, redibujamos la relación entre PB y PP, o entre PB y EOC, con ambas variables medidas bajo la radiación solar completa (Figura 5-7), obteniéndose una tendencia directa entre las dos variables también en las capas superiores del lago. La falta de relación entre ambas variables a partir de las tradicionales incubaciones en oscuridad para PB resultó de una subestima de la producción bacteriana a mediados de verano, y de una sobreestima a finales del período libre de hielo (Visser et al. 1999). Por tanto, consideramos que nuestra aproximación experimental es realista y permite determinar el papel de la composición espectral de la radiación solar en la interacción alga-bacteria.

## **CONCLUSIONES E IMPLICACIONES**

Como recapitulación, nuestra hipótesis estuvo soportada por nuestros resultados. La radiación ultravioleta, particularmente UVA, provocó una fuerte inhibición de la producción primaria y un incremento de los valores absolutos y proporcionales de EOC, incrementando la disponibilidad de C para las bacterias. Diversos estudios han mostrado un comportamiento migrador de especies algales relacionado con el régimen de radiación



**Figura 5-7.** Relación entre (A) producción bacteriana vs. producción primaria y (B) producción bacteriana vs. excreción de carbono orgánico (EOC), medidas en las capas superiores del lago en 1997. Se comparan los valores de PB obtenidos en incubaciones bajo luz solar vs. oscuridad. Barras de error como en Figura 4-2.

solar (ej. Figueroa et al. 1997 b). En este sentido, las migraciones verticales diarias que realizan las especies del fitoplancton en La Caldera (Carrillo et al. 1991 b) les permitiría evitar parcialmente el daño causado por la radiación UVB. Pero dado que la mayor parte del estrés fisiológico de las algas (inhibición de la producción primaria, mayor exudación absoluta y relativa del C fijado) se debió a UVA, que tiene una alta capacidad de penetración en la columna de agua por su relativamente bajo coeficiente de atenuación vertical (Figura 5-2), es difícil para las algas encontrar refugios efectivos que les evite la exposición a buena parte de la radiación UVA en La Caldera, debido a la escasa profundidad media de la laguna (4.3 m). Esto puede explicar la ausencia en este ecosistema de picoplancton autótrofo, dada su mayor sensibilidad a la radiación UVR que el nanoplancton autótrofo (Bertoni y Callieri 1999, Callieri et al. 2001). Además, el exitoso desarrollo de la comunidad algal nanoplanctónica en La Caldera puede estar relacionado con su potencial metabolismo mixotrófico, que le permite utilizar a las bacterias como fuente de C y nutrientes minerales (ver Capítulo VIII).

Dado que el efecto neto de la radiación solar completa sobre la actividad bacteriana estuvo restringido a las capas superiores del lago y fue inhibitorio sólo a finales del período libre de hielo, concluimos que la comunidad bacteriana de La Caldera está bien adaptada a la radiación solar, por lo que mantiene su capacidad de responder al C orgánico liberado por las algas, que es susceptible de ser consumido por las bacterias (Chróst 1983, Chróst y Faust 1983, Sundh 1989, 1992, Kirchman et al. 1991, Sundh y Bell 1992, Maurin et al. 1997, Pausz y Herndl 1999, este estudio). La concordancia entre los resultados obtenidos con las dos diferentes aproximaciones metodológicas utilizadas (incorporación de  $^3\text{H}$ -TdR y asimilación de  $^{14}\text{C}$  orgánico por las bacterias) refuerza nuestras conclusiones e interpretaciones respecto al patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar, e implica que nuestras medidas de PB bajo condiciones de luz fueron realistas.

El hecho de que las bacterias hagan un uso más eficiente del C fotosintético (valores de %CUEb más altos) en las capas superiores que en las intermedias puede ser interpretado como el resultado de la efectividad de los mecanismos fotoreparadores (los menos costosos energéticamente) que contrarrestan el daño producido por la radiación UVB en estas condiciones de alta intensidad de luz, y permiten una respuesta positiva consistente en un mayor y más eficiente crecimiento bacteriano cuando disponen de suficiente carbono fotosintético. Por tanto la fotoreparación funciona como un mecanismo adaptativo que permite a las bacterias soportar el estrés de radiación del sistema y obtener ventaja de la adversidad.

## CAPÍTULO VI

---

### Efectos interactivos luz-nutrientes

La ventaja más ligera de un ser, de cualquier edad o en cualquier estación, sobre los demás seres con los cuales entra en competición, o una adaptación mejor, por mínima que sea, a las condiciones físicas que le rodean, cambiará el equilibrio en su favor.

Charles Darwin (1809-1882), *“El origen de las especies”*

## INTRODUCCIÓN

Junto con la radiación solar, otro factor ecológico primordial en los ecosistemas acuáticos es el suministro y disponibilidad relativa de nutrientes, que afecta al crecimiento y composición taxonómica de las especies (Schindler 1977, Pérez-Martínez y Cruz-Pizarro 1995) o a su contenido elemental (García-Álvaro et al. 2000, Núñez-Olivera et al. 2001, Villar-Argaiz et al. 2001). Dado que en los lagos situados por encima de la línea de árboles las entradas de nutrientes tienen una naturaleza pulsada, que engloba desde las entradas alóctonas asociadas a procesos meteorológicos (Carrillo et al. 1990 b, Morales-Baquero et al. 1999, Migon y Sandroni 1999) hasta los procesos de excreción y reciclado por el zooplancton (Carrillo et al. 1996 a, b, Villar-Argaiz et al. 2001), el conocimiento de los efectos ejercidos por los pulsos de nutrientes es de especial interés en ecosistemas como La Caldera. Aunque existe gran cantidad de estudios que evalúan los efectos individuales del espectro de radiación o de los nutrientes sobre los organismos, es aún poco conocida la influencia de los efectos interactivos de ambos factores abióticos sobre los organismos. Por tanto, el estudio de estos efectos interactivos es especialmente necesario para la comprensión del funcionamiento de los ecosistemas, y constituye actualmente un “punto caliente” de investigación (Folt et al. 1999).

Hasta la fecha muy pocos estudios han abordado el efecto interactivo de estos dos factores abióticos, y se han centrado en aspectos de la estructura y sucesión de la comunidad pelágica (Bergeron y Vincent 1997) o en aspectos funcionales exclusivamente de la comunidad algal (Xenopoulos et al. 2002). Por tanto, hasta donde nosotros conocemos, no existen estudios que aborden desde esta perspectiva la interacción funcional entre fitoplancton y bacterias medida *in situ*. Nosotros hipotetizamos la existencia de efectos interactivos entre las diferentes regiones del espectro de radiación solar y la disponibilidad de nutrientes limitantes (P) sobre la actividad algal y bacteriana, y sobre su interacción, sólo cuando éstos nutrientes limitan su crecimiento.

El objetivo de este Capítulo es cuantificar experimentalmente cómo influyen las variaciones en la disponibilidad de P, asociadas a entradas pulsadas de este nutriente, en el patrón de respuesta al espectro de radiación solar de procesos metabólicos algales y bacterianos medidos *in situ* a corto plazo, prestando particular atención a la interacción entre ambas comunidades.

Para la consecución de este objetivo se evalúan experimentalmente los efectos interactivos entre el enriquecimiento con P y la composición espectral de la radiación

solar sobre (i) la producción primaria, (ii) la excreción de C orgánico por las algas, (iii) la producción bacteriana, (iv) utilización del C fotosintético por las bacterias.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

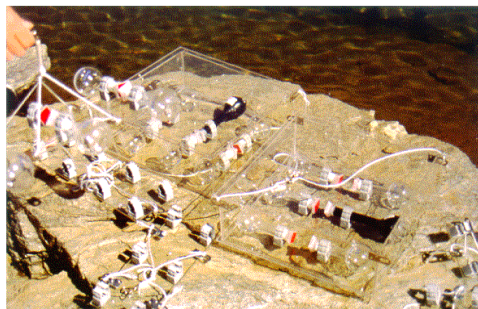
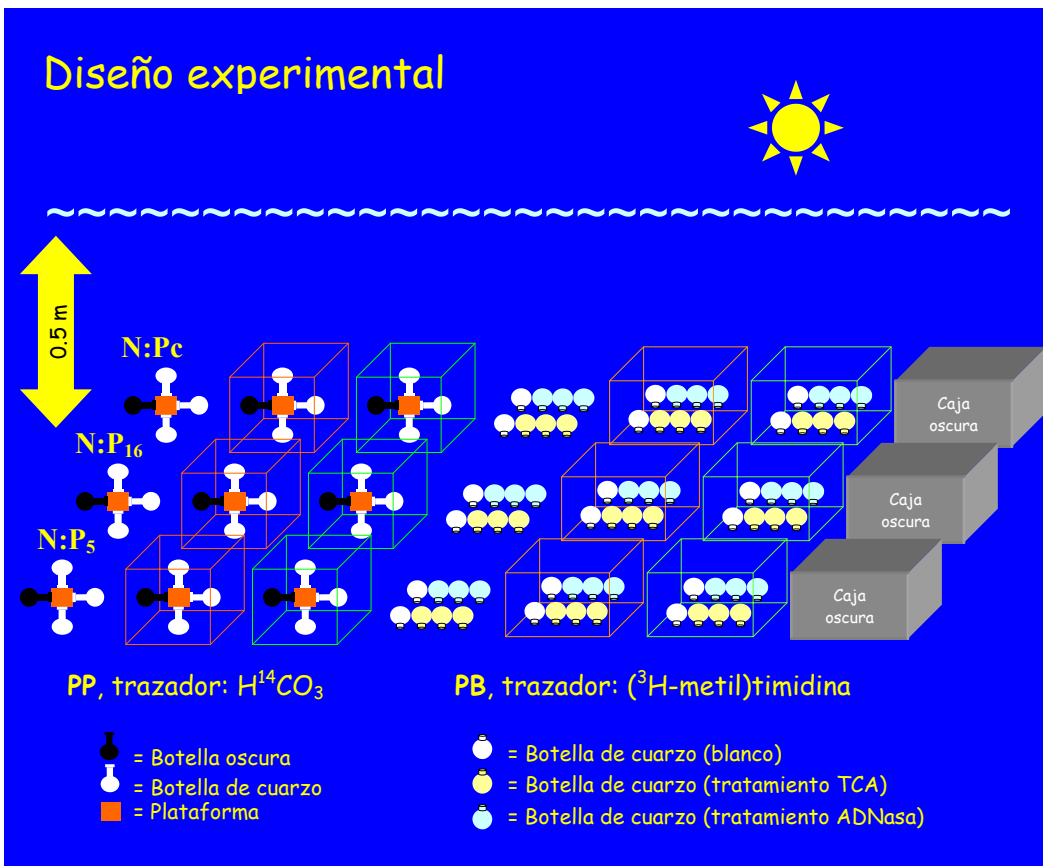
### **Diseño experimental**

Los experimentos se realizaron en Agosto y Octubre de 1997 durante días despejados. Para cada experimento se siguieron idénticos procedimientos y protocolos a los descritos en el Capítulo V para obtener una muestra compuesta de agua del lago, construir los tratamientos experimentales de luz y determinar los valores de las variables respuesta. Tan sólo señalar que las incubaciones se realizaron en las capas superiores del lago (profundidad de 0.5 m), dado que ahí los efectos del espectro de radiación solar fueron más acusados (Capítulo V).

Para evaluar el efecto del enriquecimiento con P inorgánico, se llevó a cabo un diseño experimental de  $2 \times 4$  tratamientos: agua de lago no enriquecida vs. enriquecida con P (con dos niveles), y los cuatro tratamientos de luz especificados en el Capítulo V. Los dos niveles de enriquecimiento con P se obtuvieron añadiendo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a sendos volúmenes conocidos de la muestra compuesta hasta alcanzar una razón molar N:P de 16 (tratamiento N:P<sub>16</sub>), o una razón molar N:P de 5 (tratamiento N:P<sub>5</sub>). La cantidad de P requerida para cada tratamiento N:P fue calculada a partir de la concentración de P disuelto encontrada en la columna de agua en la fecha de muestreo previa a cada experimento. Tras la adición de P, las submuestras enriquecidas se agitaron vigorosamente y, junto con la submuestra no enriquecida, se dejaron un tiempo de aclimatación de 90 minutos dentro del lago y expuestas a la radiación solar completa (contenedores abiertos por arriba), antes de ser utilizadas para llenar las botellas experimentales.

### **Análisis estadísticos**

El efecto del espectro de radiación solar, del enriquecimiento con P y de su interacción se examinó mediante ANOVA de 2 vías. Las diferencias entre tratamientos se



Preparación de las botellas de incubación

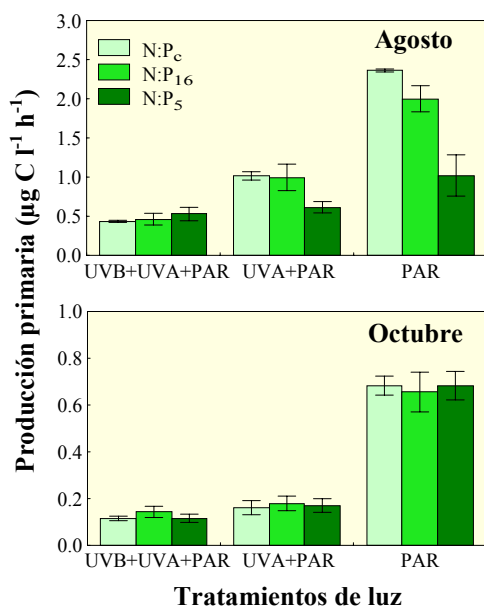


examinaron mediante análisis de contrastes (LSD), ajustando las probabilidades del análisis al test de Bonferroni. Además, el efecto interactivo entre cada región del espectro de radiación solar y el enriquecimiento con P se verificó mediante los correspondientes ANOVAs de 2 vías, incluyendo en cada análisis los tratamientos de luz que exclusivamente se distinguen en una determinada región espectral.

Se verificaron las asunciones requeridas por el ANOVA tal y como se describe en el Capítulo anterior, y los datos se transformaron logarítmicamente cuando estas condiciones no se cumplían.

## RESULTADOS

### Efectos del enriquecimiento con P sobre la respuesta del fitoplancton al espectro de radiación solar: producción primaria y excreción de C fotosintético



**Figura 6-1.** Producción primaria medida en los tratamientos experimentales de luz y de enriquecimiento con P (razón N:P). Las barras de error indican medias  $\pm$  DE.

respuesta de la PP al espectro de radiación, fundamentalmente al perderse el efecto depresor de UVB en los tratamientos N:P<sub>5</sub> (Tabla 6-3). A finales del período libre de

La adición de P no estimuló las tasas de producción primaria a mediados de verano. Incluso, los valores de PP disminuyeron significativamente en los tratamientos enriquecidos con respecto a su control (N:P<sub>c</sub>) en ausencia de UVB y/o de UVR (Tabla 6-1, Figura 6-1). Este efecto depresor sobre PP condicionó que en los tratamientos enriquecidos se atenuara el estímulo de la PP que causa la ausencia de la radiación ultravioleta (UVB, UVA, UVR). Por lo tanto, hubo un efecto antagónico significativo entre el enriquecimiento con P y las distintas calidades de luz, tal y como indican las significativas interacciones UVB  $\times$  N:P, UVA  $\times$  N:P, y UVR  $\times$  N:P (Tabla 6-2, Figura 6-2). Como consecuencia, se produjo una variación en el patrón de

**Tabla 6-1.** Efectos experimentales de la adición de P (dos niveles de N:P) en cada tratamiento de luz expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las variables respuesta (ver texto) con respecto a cada control, en Agosto y Octubre de 1997. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

		Agosto 1997									
		PP		EOC		%EOC		%PEA		%CUEb	
Efecto	Tratamientos luz	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
N:P <sub>16</sub>	UVB+UVA+PAR	15	n.s.	50	**	35	**	-63	***	-88	***
	UVA+PAR	-2	n.s.	801	***	819	***	-74	***	-94	***
	PAR	-15	**	866	***	1042	***	-62	***	-96	***
N:P <sub>5</sub>	UVB+UVA+PAR	29	n.s.	73	***	36	**	-51	***	-88	***
	UVA+PAR	-39	**	363	***	669	***	-64	***	-92	***
	PAR	-57	***	307	***	856	***	-47	***	-90	***

		Octubre 1997									
		PP		EOC		%EOC		%PEA		%CUEb	
Efecto	Tratamientos luz	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
N:P <sub>16</sub>	UVB+UVA+PAR	24	n.s.	11	n.s.	-10	n.s.	97	***	46	**
	UVA+PAR	11	n.s.	4	n.s.	-6	n.s.	-42	***	-67	***
	PAR	-4	n.s.	-8	n.s.	-5	n.s.	-45	***	-60	***
N:P <sub>5</sub>	UVB+UVA+PAR	1	n.s.	1	n.s.	1	n.s.	179	***	332	***
	UVA+PAR	6	n.s.	5	n.s.	0	n.s.	2	n.s.	-22	n.s.
	PAR	0	n.s.	2	n.s.	2	n.s.	9	**	13	n.s.

hielo, la adición de P no ejerció ningún efecto sobre la PP (Tabla 6-1, Figura 6-1), siendo el espectro de radiación solar el factor responsable del patrón de respuesta de PP, como indica el porcentaje de varianza explicada (Tabla 6-4, Figura 6-4).

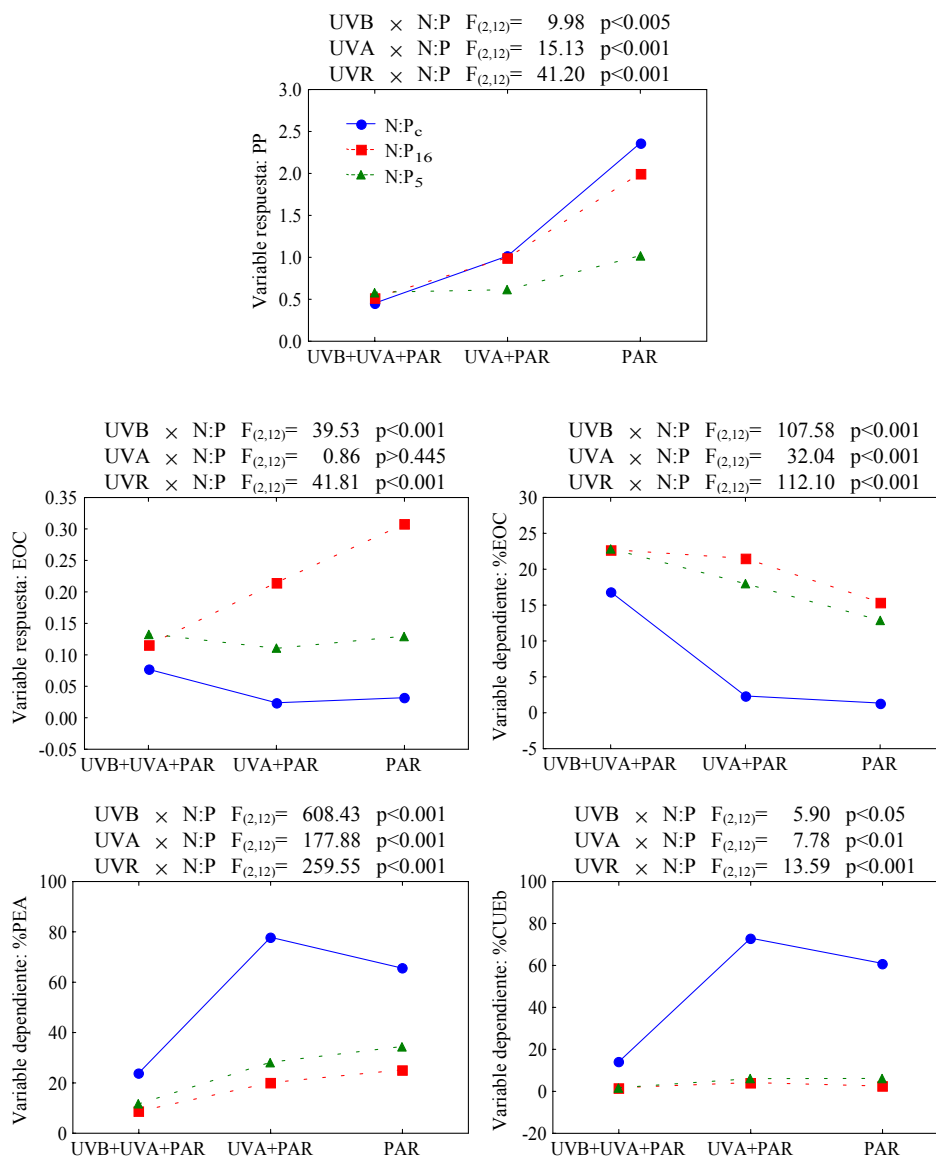
A mediados de verano, la excreción de carbono fotosintético (EOC) fue estimulada significativamente en ambos tratamientos N:P y en todas las condiciones de luz. El incremento fue más acusado en los tratamientos sin UVB, y particularmente cuando el enriquecimiento se hizo hasta una razón N:P<sub>16</sub> (Tabla 6-1 y Figura 6-3). Mientras que en el tratamiento N:P<sub>5</sub> la tasa de EOC no varió con los tratamientos de luz,

en el tratamiento N:P<sub>16</sub> las diferentes calidades de luz afectaron significativamente a la tasa de EOC, obteniéndose valores progresivamente mayores en ausencia de UVB y en ausencia de UVR (Tabla 6-1 y Figura 6-3). Estas diferencias en las tasas de liberación de C fotosintético (EOC) dependiendo del tratamiento N:P se reflejaron en las significativas

**Tabla 6-2.** Efectos de la radiación solar (1) y de la adición de P (2) sobre las variables respuesta (ver texto) según el modelo ANOVA de 2-vías. g1, g2: grados de libertad. PV: Porcentaje de la varianza explicada calculada como suma de cuadrados del tratamiento/suma de total de cuadrados. Experimento de Agosto.

Variable	Efecto	g1	g2	F <sub>(g1,g2)</sub>	p	PV
PP	1	2	18	216.83	<0.0001	76.62
	2	2	18	40.67	<0.0001	14.37
	1×2	4	18	24.48	<0.0001	8.65
	Error					0.35
EOC	1	2	18	7.24	<0.0050	2.69
	2	2	18	230.79	<0.0001	85.83
	1×2	4	18	29.85	<0.0001	11.10
	Error					0.37
%EOC	1	2	18	231.98	<0.0001	25.66
	2	2	18	576.82	<0.0001	63.79
	1×2	4	18	94.43	<0.0001	10.44
	Error					0.11
%PEA	1	2	18	2055.59	<0.0001	35.24
	2	2	18	3396.55	<0.0001	58.23
	1×2	4	18	380.11	<0.0001	6.52
	Error					0.02
%CUEb	1	2	18	136.42	<0.0001	17.52
	2	2	18	631.90	<0.0001	81.14
	1×2	4	18	9.49	<0.0005	1.22
	Error					0.13

interacciones UVB × N:P y UVR × N:P (Tabla 6-2, Figura 6-2), que indican un efecto antagónico entre N:P y UVB ó UVR. Por tanto, el enriquecimiento con P modificó de forma acusada el patrón de excreción de C, anulando el incremento de las tasas de EOC que ejercía UVB en los tratamientos no enriquecidos (Tabla 6-3). A finales del período libre de hielo, la adición de P no ejerció ningún efecto sobre EOC (Tabla 6-1, Figura 6-3),



**Figura 6-2.** Efectos interactivos entre las distintas regiones espectrales de radiación solar y la adición de P sobre cada variable respuesta (ver texto), según el modelo ANOVA de 2-vías. Experimento de Agosto.

**Tabla 6-3.** Efectos de distintas regiones espectrales de la radiación solar en cada razón N:P expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las variables respuesta (ver texto) con respecto a cada control, en Agosto y Octubre de 1997. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

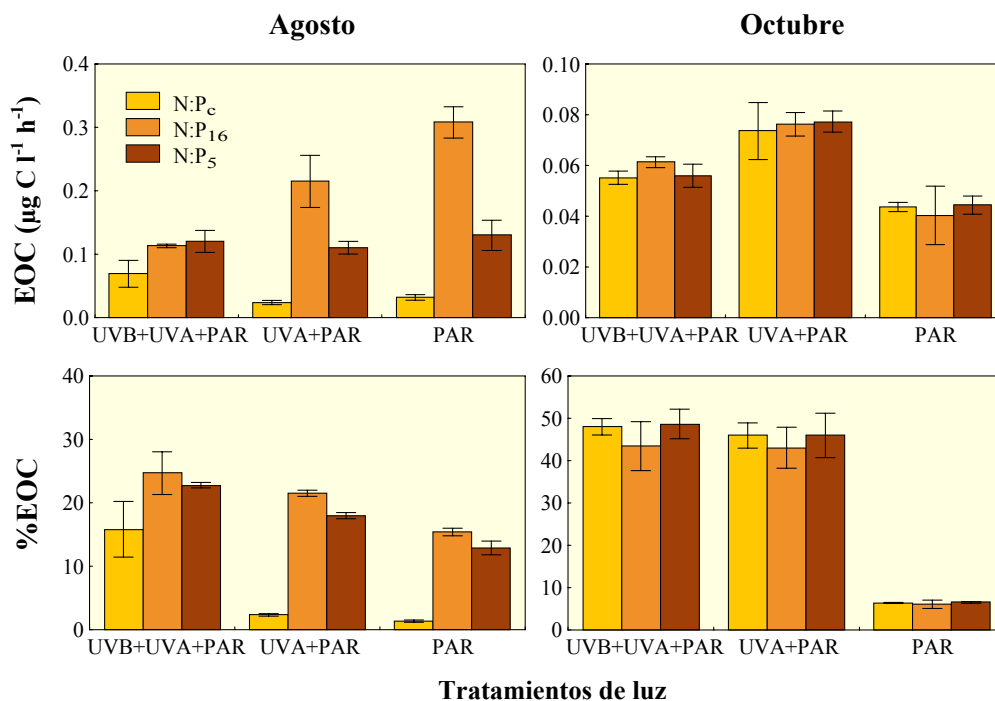
		Agosto 1997									
Efecto	N:P	PP		EOC		%EOC		%PEA		%CUEb	
		$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
UVB	N:Pc	-55	***	224	**	620	***	-69	***	-81	***
	N:P <sub>16</sub>	-48	***	-46	***	6	n.s.	-57	***	-59	***
	N:P <sub>5</sub>	-5	n.s.	21	n.s.	27	**	-59	***	-71	***
UVA	N:Pc	-57	***	-25	n.s.	73	**	19	***	20	*
	N:P <sub>16</sub>	-50	***	-30	**	40	**	-20	***	66	**
	N:P <sub>5</sub>	-40	**	-15	n.s.	40	**	-18	***	-1	n.s.
UVR	N:Pc	-81	***	142	**	1149	***	-63	***	-77	***
	N:P <sub>16</sub>	-74	***	-63	***	48	***	-65	***	-31	*
	N:P <sub>5</sub>	-43	**	3	n.s.	77	***	-66	***	-72	***

		Octubre 1997									
Efecto	N:P	PP		EOC		%EOC		%PEA		%CUEb	
		$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
UVB	N:Pc	-28	n.s.	-25	*	4	n.s.	-65	***	-77	***
	N:P <sub>16</sub>	-20	n.s.	-20	**	1	n.s.	19	**	0	n.s.
	N:P <sub>5</sub>	-32	n.s.	-28	***	6	n.s.	-4	n.s.	25	n.s.
UVA	N:Pc	-76	***	69	**	619	***	-7	n.s.	-21	n.s.
	N:P <sub>16</sub>	-73	***	89	***	610	***	-2	n.s.	-35	**
	N:P <sub>5</sub>	-75	***	74	***	607	***	-13	***	-46	***
UVR	N:Pc	-83	***	26	**	651	***	-67	***	-82	***
	N:P <sub>16</sub>	-78	***	52	***	616	***	16	**	-35	**
	N:P <sub>5</sub>	-83	***	26	*	648	***	-17	***	-32	**

siendo nuevamente el espectro de radiación solar el factor responsable de su patrón de respuesta, como indica el porcentaje de varianza explicada (Tabla 6-4, Figura 6-4).

El porcentaje de excreción de C fotosintético en relación con el producido (%EOC) respondió a la adición de P siguiendo básicamente el mismo patrón descrito para los valores absolutos de excreción de C (EOC). Así, a mediados de verano, la adición de P incrementó los valores de %EOC en todos los tratamientos de luz, siendo el incremento más acusado en los tratamientos sin UVB y particularmente en el tratamiento N:P<sub>16</sub>



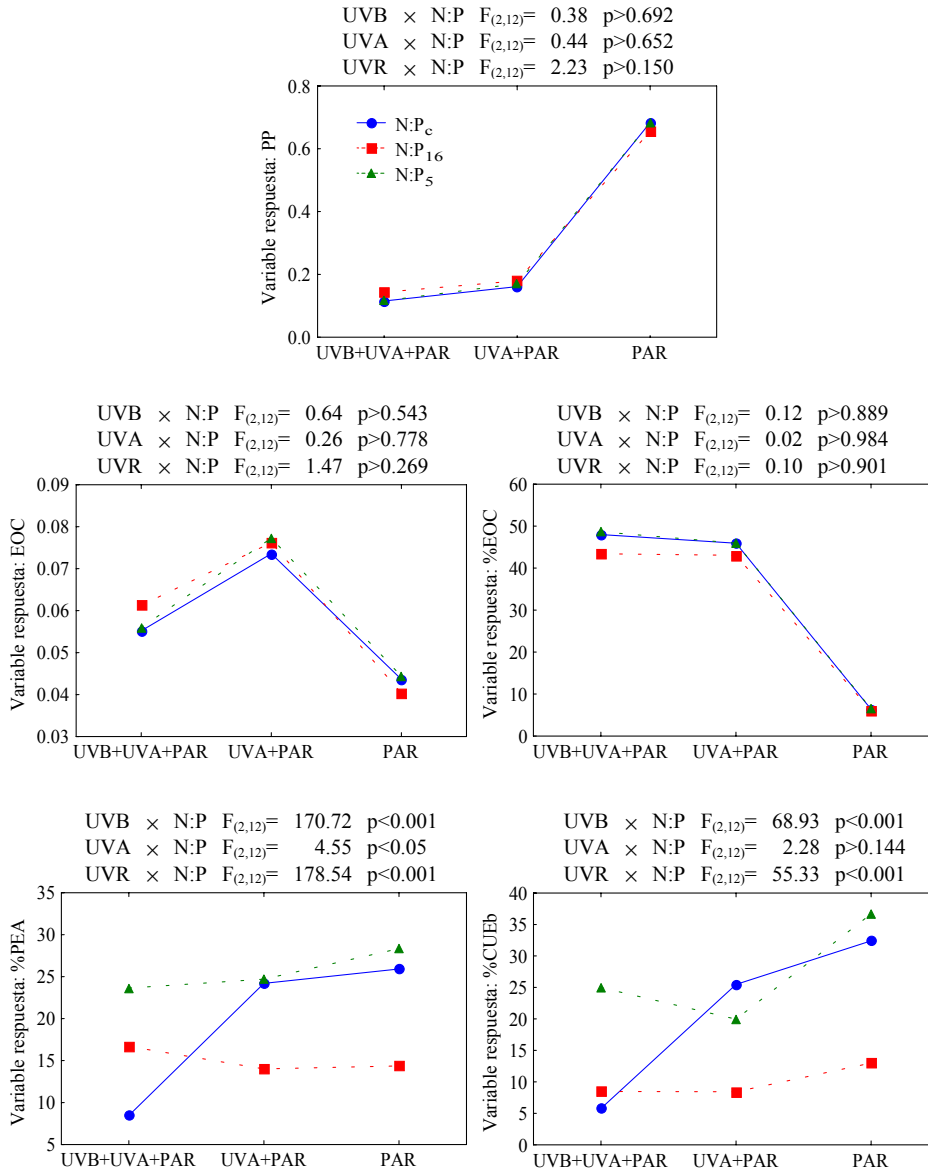
**Figura 6-3.** Excreción de carbono orgánico (EOC) y %EOC con respecto al carbono orgánico producido medidos en los tratamientos experimentales de luz y de enriquecimiento con P (razón N:P). Las barras de error indican medias  $\pm$  DE.

(Tabla 6-1, Figura 6-3). El patrón de respuesta al espectro de radiación de %EOC en los tratamientos enriquecidos fue próximo al obtenido en los tratamientos no enriquecidos. Esto es, UVR determinó un incremento significativo de los valores de %EOC, aunque en los tratamientos N:P<sub>16</sub> sólo afectó UVA, y en los tratamientos N:P<sub>5</sub> afectaron ambas regiones del espectro (Tabla 6-3, Figura 6-3). El enriquecimiento con P ejerció un efecto interactivo antagónico con UVB, UVA y UVR (Tabla 6-2, Figura 6-2) al atenuar el efecto

que estas radiaciones ejercían en los tratamientos no enriquecidos (Tabla 6-3, Figura 6-3). A finales del período libre de hielo, el enriquecimiento con P no modificó el patrón de respuesta de %EOC al espectro de radiación solar (Tablas 6-3, 6-4, Figuras 6-3 y 6-4). En conclusión, independientemente del período estacional y del estado de enriquecimiento en P, la radiación ultravioleta (UVR) condicionó mayores valores de %EOC.

**Tabla 6-4.** Efectos de la radiación solar (1) y de la adición de P (2) sobre las variables respuesta (ver texto) según el modelo ANOVA de 2-vías. g1, g2: grados de libertad. PV: Porcentaje de la varianza explicada calculada como suma de cuadrados del tratamiento/suma de total de cuadrados. Experimento de Octubre.

Variable	Efecto	g1	g2	$F_{(g1,g2)}$	p	PV
PP	1	2	18	358.16	<0.0001	99.21
	2	2	18	1.03	>0.3783	0.28
	1×2	4	18	0.84	>0.5166	0.23
	Error					0.28
EOC	1	2	18	63.71	<0.0001	97.13
	2	2	18	0.25	>0.7841	0.38
	1×2	4	18	0.63	>0.6455	0.96
	Error					1.52
%EOC	1	2	18	1269.51	<0.0001	99.74
	2	2	18	2.22	>0.1372	0.17
	1×2	4	18	0.08	>0.9881	0.01
	Error					0.08
%PEA	1	2	18	108.08	<0.0001	22.85
	2	2	18	261.25	<0.0001	55.24
	1×2	4	18	102.63	<0.0001	21.70
	Error					0.21
%CUEb	1	2	18	85.17	<0.0001	34.96
	2	2	18	118.94	<0.0001	48.83
	1×2	4	18	38.49	<0.0001	15.80
	Error					0.41

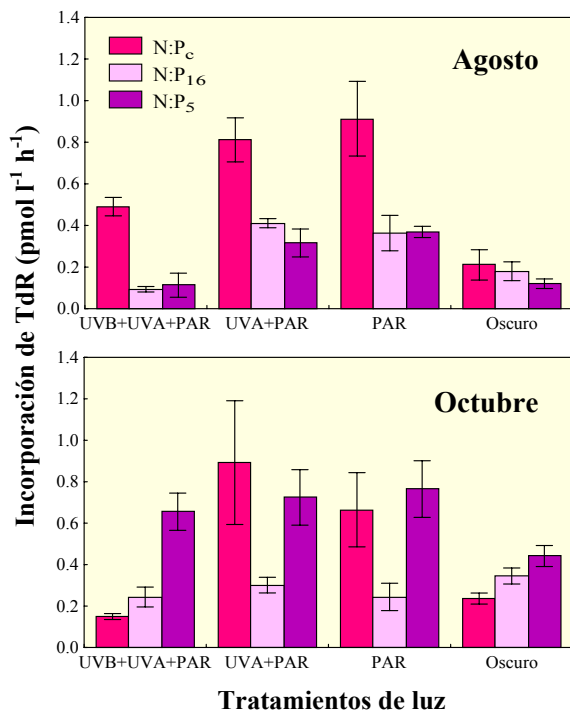


**Figura 6-4.** Efectos interactivos entre las distintas regiones espectrales de radiación solar y la adición de P sobre cada variable respuesta (ver texto), según el modelo ANOVA de 2-vías. Experimento de Octubre.



## Efectos del enriquecimiento con P sobre la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar

A mediados de verano, el enriquecimiento con P produjo una significativa disminución de las tasas de incorporación de TdR en todos los tratamientos de luz,



**Figura 6-5.** Tasas de incorporación bacteriana de TdR medidas en los tratamientos experimentales de luz y de enriquecimiento con P (razón N:P). Las barras de error indican medias  $\pm$  DE.

excepto en el oscuro (Tabla 6-5, Figura 6-5). Esta reducción tras la adición de P supuso una alteración parcial del patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar, que se concreta en una pérdida del efecto estimulador neto de la luz solar completa y en una disminución del efecto positivo ejercido por PAR (Tabla 6-6, Figura 6-5). Estas modificaciones implican un efecto antagónico entre el enriquecimiento con P y las regiones del espectro estimuladoras de la actividad bacteriana, esto es PAR y luz solar completa, como indican las interacciones significativas Luz  $\times$  N:P y PAR  $\times$  N:P (Tabla 6-7, Figura 6-7). A finales del período libre de hielo, el enriquecimiento con P produjo un incremento significativo de las tasas de incorporación de [<sup>3</sup>H]TdR sólo en los tratamientos de

luz solar completa y oscuros, mientras que en los tratamientos UVA+PAR y PAR se encontró una significativa inhibición en la actividad bacteriana (tratamientos N:P<sub>16</sub>) o no se observó un estímulo (tratamientos N:P<sub>5</sub>) (Tabla 6-5, Figura 6-5). Por tanto, el enriquecimiento con P condujo a una acusada modificación del patrón de respuesta al espectro de radiación solar: pérdida total del patrón en los tratamientos N:P<sub>16</sub>, y anulación del efecto inhibitor de UVB y de luz solar completa en los tratamientos N:P<sub>5</sub>. El enriquecimiento con P ejerció un efecto antagónico con UVB, UVR, PAR, UVA+PAR ó

Luz solar completa, tal y como indican las respectivas interacciones significativas encontradas (Tabla 6-7, Figura 6-7).

### Efectos del enriquecimiento con P y del espectro de radiación solar sobre la interacción algas-bacterias: uso bacteriano del C fotosintético

El enriquecimiento con P ejerció un efecto diferente en los distintos períodos estacionales sobre la asimilación de C fotosintético normalizada con respecto a la cantidad de C disponible (%PEA). A mediados de verano, la adición de P produjo una significativa reducción en los valores de %PEA en todas las condiciones de luz,

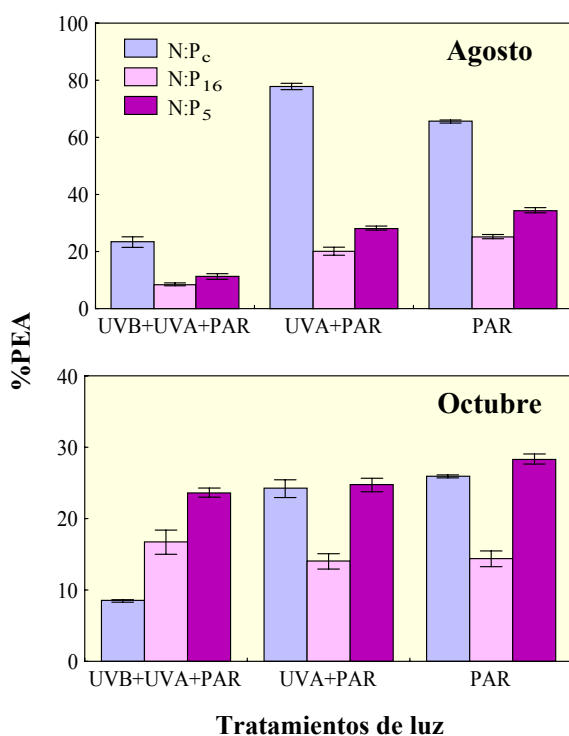
**Tabla 6-5.** Efectos experimentales de la adición de P (dos niveles) en cada tratamiento de luz expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las tasas de incorporación de TdR con respecto a cada control, en Agosto y Octubre de 1997. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

N:P	Tratamientos luz	Ago-97		Oct-97	
		$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
N:P <sub>16</sub>	UVB+UVA+PAR	-81	***	63	**
	UVA+PAR	-49	**	-66	***
	PAR	-60	***	-63	***
	Oscuro	-14	n.s.	46	*
N:P <sub>5</sub>	UVB+UVA+PAR	-77	***	338	***
	UVA+PAR	-61	***	-19	n.s.
	PAR	-60	***	15	n.s.
	Oscuro	-43	n.s.	87	***

particularmente en el tratamiento N:P<sub>16</sub> (Tabla 6-1, Figura 6-6). A pesar de esta disminución, la eficiencia de asimilación (%PEA) conservó el patrón de respuesta al espectro de radiación de solar, al continuar los valores significativamente mayores en los tratamientos UVA+PAR y PAR (Figura 6-6). Dado que el efecto inhibitor de UVB y UVR fue más acentuado (en valores absolutos, ver Figura 6-2) en condiciones de no enriquecimiento que tras la adición de P, se originó un efecto interactivo antagónico entre el enriquecimiento con P y las radiaciones UVB y UVR, como indica el análisis de las interacciones N:P  $\times$  UVB y N:P  $\times$  UVR (Tabla 6-2, Figura 6-2). Es interesante destacar el cambio de signo del efecto de UVA al pasar a condiciones enriquecidas (estimulador en N:P<sub>c</sub> vs. inhibitor en N:P enriquecido, Tabla 6-3), responsable de la interacción antagónica N:P  $\times$  UVA (Tabla 6-2, Figura 6-2).

A finales del período libre de hielo, los efectos más significativos de la adición de P fueron: (i) un incremento de %PEA bajo luz solar completa (más acentuado en el

tratamiento N:P<sub>5</sub>); (ii) una disminución de %PEA en el tratamiento N:P<sub>16</sub> en ausencia de UVB (Tabla 6-1, Figura 6-6). Estos efectos determinaron una acusada modificación del patrón de respuesta de la eficiencia de asimilación de C fotosintético por las bacterias (%PEA) al espectro de radiación solar ya que se anuló o atenuó el efecto inhibitor de UVB y UVR sobre %PEA (Tabla 6-3), originando un efecto interactivo antagónico significativo N:P × UVB y N:P × UVR (Tabla 6-4, Figura 6-4). Otro efecto débilmente significativo obtenido tras el enriquecimiento fue un incremento del %PEA en el tratamiento PAR - N:P<sub>5</sub> (Tabla 6-1) responsable de la interacción N:P × UVA (Figura 6-4).



**Figura 6-6.** Eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA) medida en los tratamientos experimentales de luz y de enriquecimiento con P (razón N:P). Las barras de error indican medias ± DE.

La eficiencia de uso del C fotosintético por las bacterias (%CUE<sub>b</sub>) también reflejó importantes variaciones estacionales en su respuesta a la adición de P. Así, a mediados de verano, encontramos una disminución de los valores de %CUE<sub>b</sub> en todos los tratamientos de luz, particularmente en ausencia de UVB (Tabla 6-1, Figura 6-8). Estos efectos, sin embargo, no modificaron de forma sustancial el patrón de respuesta de %CUE<sub>b</sub> al espectro de radiación solar, ya que, en los tratamientos enriquecidos, UVB y UVR continuaron ejerciendo efectos inhibitorios sobre %CUE<sub>b</sub> (Tabla 6-3, Figura 6-8). No obstante, dado que el efecto inhibitor de UVB (y UVR) fue más atenuado en los tratamientos enriquecidos, particularmente en N:P<sub>16</sub> (Tabla 6-3, Figura 6-2), se encontró un efecto interactivo antagónico N:P × UVB y N:P × UVR (Tabla 6-2, Figura 6-2).

Por otro lado, el efecto estimulador ejercido por UVA sobre %CUEb en los tratamientos N:P<sub>c</sub> se pierde en el tratamiento N:P<sub>5</sub> (Tabla 6-3, Figura 6-8) reflejándose en un significativo efecto interactivo antagonico N:P × UVA (Figura 6-2).

A finales del período libre de hielo la adición de P produjo: (i) un incremento de %CUEb en luz solar completa, más acusado en N:P<sub>5</sub>; (ii) una disminución de %CUEb en los tratamientos N:P<sub>16</sub> en ausencia de UVB (Tabla 6-1, Figura 6-8). Debido a estos

**Tabla 6-6.** Efectos de distintas regiones espectrales de la radiación solar en cada razón N:P, expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las tasas de incorporación de TdR con respecto a cada control, en Agosto y Octubre de 1997. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

Luz	N:P	Ago-97		Oct-97	
		$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
UVB	N:P <sub>c</sub>	-39	**	-82	**
	N:P <sub>16</sub>	-77	***	-19	n.s.
	N:P <sub>5</sub>	-64	**	-10	n.s.
UVA	N:P <sub>c</sub>	-11	n.s.	34	n.s.
	N:P <sub>16</sub>	13	n.s.	23	n.s.
	N:P <sub>5</sub>	-14	n.s.	-5	n.s.
UVR	N:P <sub>c</sub>	-46	**	-78	***
	N:P <sub>16</sub>	-74	***	0	n.s.
	N:P <sub>5</sub>	-69	***	-14	n.s.
PAR	N:P <sub>c</sub>	334	**	181	**
	N:P <sub>16</sub>	102	**	-29	n.s.
	N:P <sub>5</sub>	208	***	73	**
(UVA+PAR)	N:P <sub>c</sub>	286	**	278	**
	N:P <sub>16</sub>	128	**	-13	n.s.
	N:P <sub>5</sub>	163	**	64	**
Luz	N:P <sub>c</sub>	133	**	-37	**
	N:P <sub>16</sub>	-48	n.s.	-29	n.s.
	N:P <sub>5</sub>	-6	n.s.	48	*

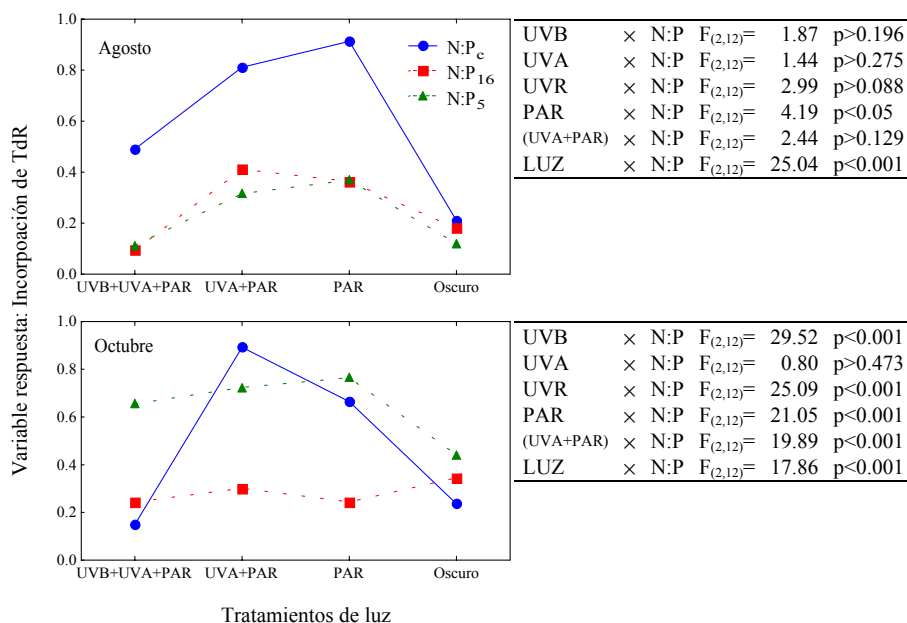
efectos, el patrón de respuesta al espectro de radiación solar de %CUEb se modificó sustancialmente, básicamente por la pérdida del efecto inhibitor de UVB sobre %CUEb y por la atenuación del efecto inhibitor de UVR (Tabla 6-3, Figura 6-8), lo que determinó un efecto interactivo antagonico N:P × UVB y N:P × UVR (Figura 6-4).

La comparación entre la disponibilidad de C fotosintético para las bacterias (EOC) y los requerimientos bacterianos de este C (CARB) permite detectar situaciones de limitación potencial de C fotosintético para el crecimiento bacteriano (Figura 6-9). En los tratamientos no enriquecidos, e independientemente del período estacional, la disponibilidad de C fue significativamente superior a las demandas bacterianas sólo en los tratamientos de luz solar completa. Tras un enriquecimiento con P, los valores de EOC fueron superiores a los de CARB en todos los tratamientos de luz a mediados de verano,

tanto en N:P<sub>16</sub> como en N:P<sub>5</sub>. Por el contrario, a finales del período libre de hielo, el suministro de C fue del mismo orden que las demandas bacterianas en los tratamientos N:P<sub>5</sub>, bajo cualquier régimen de luz, o significativamente mayor que las demandas bacterianas en los tratamientos N:P<sub>16</sub> bajo UVB ó UVA (Figura 6-9).

**Tabla 6-7.** Efectos de la radiación solar (1) y de la adición de P (2) sobre la incorporación de TdR según el modelo ANOVA de 2-vías. g1, g2: grados de libertad. PV: Porcentaje de la varianza explicada calculada como suma de cuadrados del tratamiento/suma de total de cuadrados.

Período	Efecto	g1	g2	$F_{(g1,g2)}$	p	PV
Agosto	1	3	24	51.45	<0.0001	47.59
	2	2	24	50.87	<0.0001	47.05
	1×2	6	24	4.80	<0.0025	4.44
	Error					0.92
Octubre	1	3	24	24.22	<0.0001	25.37
	2	2	24	52.60	<0.0001	55.09
	1×2	6	24	17.66	<0.0001	18.49
	Error					1.05

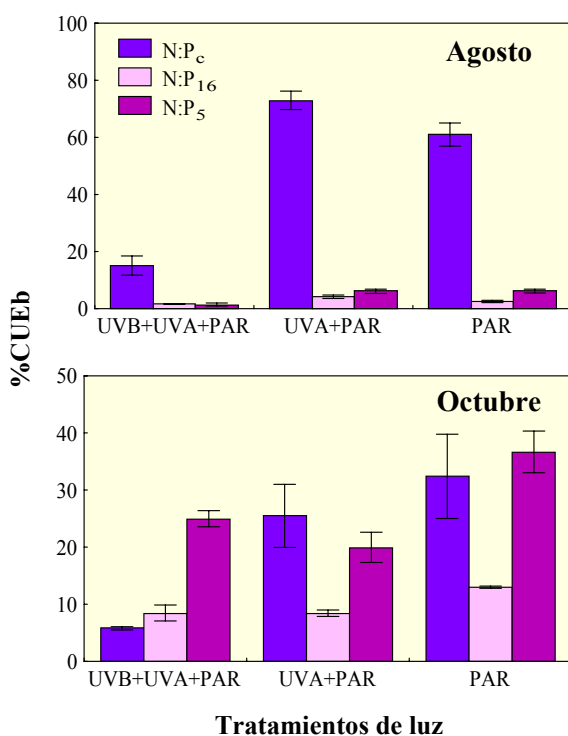


**Figura 6-7.** Efectos interactivos entre las distintas regiones espectrales de radiación solar y la adición de P sobre la incorporación de TdR según el modelo ANOVA de 2-vías.

## DISCUSIÓN

### Efectos del enriquecimiento con P sobre la respuesta del fitoplancton al espectro de radiación solar: producción primaria y excreción de C fotosintético

Nuestros resultados ponen de manifiesto que el enriquecimiento con P interaccionó con los efectos ejercidos por UVR sobre la producción primaria y la excreción de C fotosintético a mediados del período estival, pero no a finales del período



**Figura 6-8.** Eficiencia de uso del carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb) medida en los tratamientos experimentales de luz y de enriquecimiento con P (razón N:P). Las barras de error indican medias  $\pm$  DE.

libre de hielo. Variaciones estacionales de la temperatura o de la composición taxonómica del fitoplancton podrían condicionar, en parte, estas diferencias estacionales. Sin embargo, los resultados obtenidos en estudios experimentales paralelos realizados en mesocosmos en La Caldera indican que la diferente composición elemental inicial del fitoplancton (razón N:P<sub>f</sub>) en ambos períodos estacionales condicionó la respuesta de las algas al enriquecimiento con P (Villar-Argaiz 1999, Villar-Argaiz et al. 2002 b, Carrillo et al. enviado). La variación estacional de las razones elementales de la fracción algal en este ecosistema evidencia que el fitoplancton fue deficitario en P a mediados de verano, ya que su razón N:P alcanzó valores superiores a 20 (*sensu* Healey y

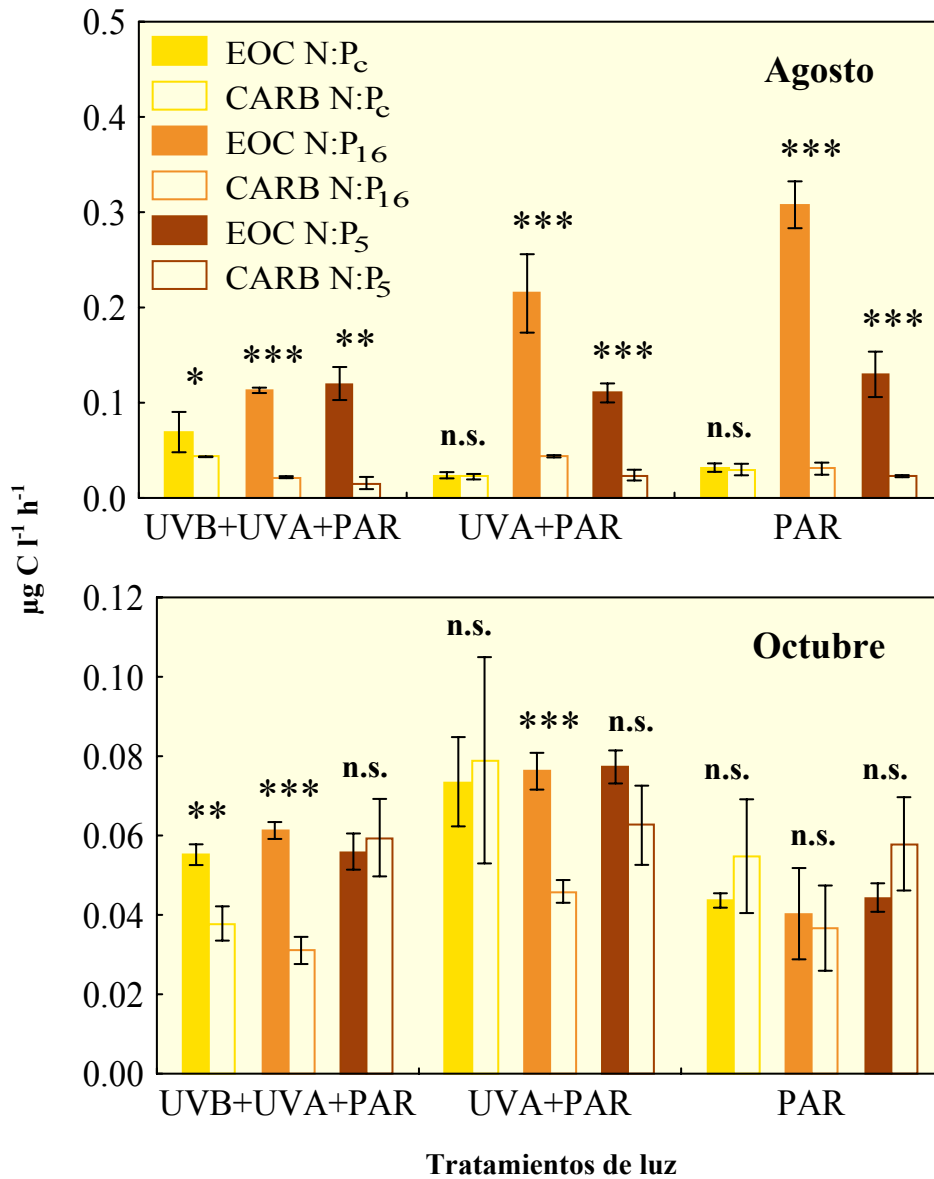
Henzel 1980). Por el contrario, hacia finales del período libre de hielo la razón N:P de las algas (8.8) indica una composición elemental enriquecida en P (Villar-Argaiz et al. 2001, 2002 b, Medina-Sánchez et al. 2002, Carrillo et al. enviado). Estos autores encontraron una relación negativa entre la tasa neta de crecimiento del fitoplancton y su razón N:P, indicando que la composición elemental, reflejo de su estado fisiológico,

puede ser un predictor del crecimiento algal (Sterner y Elser 2002) y puede constituir el principal factor que condicione la respuesta de las algas al espectro de radiación solar tras una alteración de la razón N:P del sustrato disponible.

La sorprendente ausencia general de estímulo de la producción primaria en las capas superiores del lago con el enriquecimiento en P, en un sistema donde el P es crónicamente limitante ( $DIN:TP > 12$ , *sensu* Morris y Lewis 1988), podría estar relacionada con la composición elemental de las algas. De este modo, la disminución de la tasa de fijación de C en los tratamientos sin UVB, junto con el incremento general de la tasa de excreción de C (EOC) tras el enriquecimiento con P a mediados de verano, cuando la comunidad algal muestra un acentuado estrés nutritivo (razón  $N:P_f$  inicial alta), puede tener su origen en dos procesos metabólicos no excluyentes entre sí: (i) un ajuste metabólico causado por la adquisición de nutrientes minerales limitantes, y (ii) un predominio del metabolismo mixotrófico en la comunidad algal.

En este trabajo denominamos al ajuste metabólico activado durante el consumo de nutrientes minerales por algas deficitarias en P como “respuesta transitoria” previa al crecimiento celular. Esta respuesta transitoria pudo ser observada porque las incubaciones en presencia del trazador para producción primaria se realizaron entre 1.5-2 h después del enriquecimiento con P. Este tiempo correspondió a la fase de respuesta anterior a la de crecimiento poblacional. De hecho, Villar-Argaiz (1999) y Carrillo et al. (enviado) encontraron que el P adicionado fue diferencialmente incorporado por la fracción algal en este período estacional y, posteriormente, sobre una escala temporal más larga (días), se tradujo en crecimiento celular, alcanzándose abundancias de un orden de magnitud superior a las de las condiciones iniciales.

Desde un punto de vista fisiológico, la respuesta transitoria previa implicaría una movilización de carbohidratos no estructurales (ej. almidón) y lípidos acumulados en el aparato plastidial durante la fase de limitación de P (Van Donk y Essen 1995, Plaxton y Carswell 1999, Ramos et al. en preparación). Tras un incremento pulsado en la disponibilidad de P, estos compuestos de C orgánico serían catabolizados, bien totalmente hasta la obtención de ATP y poder reductor, como fuentes de energía para sustentar los procesos de biosíntesis previos a la fase de crecimiento, bien parcialmente hasta ácidos orgánicos (ej. málico, cítrico, etc.) a través de la ruta glicolítica alternativa constituida por enzimas dependientes de PPi (pirofosfato inorgánico), conservadora de la concentración intracelular de Pi (Plaxton y Carswell 1999), para posteriormente ser liberados al medio. La naturaleza ácida de los exudados permiten mantener un pH bajo en las inmediaciones



**Figura 6-9.** Suministro (EOC) vs. demandas bacterianas (CARB) de carbono fotosintético medidos en los tratamientos experimentales de luz y de enriquecimiento con P (razón N:P). Las barras de error indican medias  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  indican los niveles de significación entre ambas variables ( $t$ -test). n.s.: no significativo



de las células, lo que favorece el estado disuelto y reactivo del Pi externo y, por tanto, su susceptibilidad de ser incorporado por las células (Plaxton y Carswell 1999). El hecho de que la disminución de la tasa de PP se observara en los tratamientos sin UVB indica que esta respuesta transitoria puede ser más acentuada en condiciones de ausencia de UVB, más favorecedoras de la incorporación de P (Hessen et al. 1995) y del crecimiento algal (Vincent y Roy 1993, Cullen y Neale 1994, este estudio). Además, dado que los valores de PP fueron mayores en los tratamientos sin UVB, se pudo detectar dicha respuesta con una mayor resolución en estos tratamientos de luz.

Otra posible interpretación de la disminución de la PP tras el enriquecimiento con P se relacionaría con el metabolismo mixotrófico que exhibe buena parte de la comunidad algal de La Caldera (ver Capítulo VIII), lo que constituye un rasgo característico de las comunidades algales de ecosistemas oligotróficos y de montaña (Nygaard y Tobiesen 1993, Arenovski et al. 1995, De Hoyos et al. 1998, Isaksson et al. 1999, Hitchman y Jones 2000). Dado que las bacterias incorporan con alta eficiencia los nutrientes minerales disueltos en condiciones de baja concentración, debido a su alta relación superficie: volumen (Currie y Kalff 1984, Bratbak y Thingstad 1985, Güde 1985, Cotner y Wetzel 1992, Thingstad et al. 1993, Kirchman 1994) y a sus altos requerimientos minerales (bajas razones C:P y N:P, Fagerbakke et al. 1996), la mixotrofia es una estrategia adaptativa en estos ecosistemas, puesto que permite “utilizar” a las bacterias como fuente de nutrientes limitantes. Además, la mixotrofia permite a las algas eliminar a sus potenciales competidores, las bacterias (Thingstad 1996), lo que es particularmente ventajoso para las algas cuando éstas son deficientes en P (alta razón N:P<sub>f</sub> en Agosto). Además de los nutrientes minerales, la bacterivoría implica un consumo por parte de las algas del C orgánico contenido en las bacterias. Ello puede traducirse en un exceso temporal del contenido intracelular de C en relación con otros nutrientes (ej. alta razón C:P) necesarios para el crecimiento algal, lo que explicaría tanto el incremento de las tasas de excreción de C orgánico como la disminución de la tasa de fijación de C en los tratamientos enriquecidos.

Apoyando esta interpretación, Sanders et al. (2001) encuentran que la adquisición de nutrientes minerales por mixótrofos (*Ochromonas* sp., Crisoficea) fue principalmente obtenida a través del consumo de bacterias. Sin embargo, algunos estudios han evidenciado una relación inversa entre la tasa de fagotrofia de mixótrofos y la concentración de nutrientes minerales disueltos (Urabe et al. 1999, Li et al. 2000), mientras que otros muestran estímulos de la tasa de bacterivoría de mixótrofos tras enriquecimientos con nutrientes minerales, como resultado indirecto de un estímulo de las

presas (Isaksson et al. 1999). Por tanto, no existe un consenso general acerca de las variaciones que han de experimentar las tasas de bacterivoría en relación con la disponibilidad de nutrientes. Es posible, por tanto, que la capacidad de fagotrofia sea un atributo relacionado con el estado fisiológico de las células (Isaksson et al. 1999), relacionado con su composición elemental (Urabe et al. 2000).

Una composición elemental de las algas enriquecida en P (no limitación) a finales del periodo libre de hielo condicionó que la adición de P no ejerciera efectos significativos sobre las tasas de PP y de excreción de C fotosintético. Villar-Argaiz (1999) y Carrillo et al. (enviado) encontraron que, en este período estacional, una adición de P causó un incremento del volumen celular y de la “cell quota” ( $\mu\text{g P c\acute{e}l}^{-1}$ ) de la comunidad fitoplanctónica, que siguió una estrategia de consumo de lujo más que de crecimiento poblacional. Estos resultados apoyarían la falta de respuesta a la adición de P en nuestros experimentos, y que la radiación ultravioleta, y no los nutrientes, fuera el principal factor responsable del patrón de variación experimental de las tasas de producción primaria y de excreción absoluta y porcentual de C fotosintético (Tabla 6-4).

En conclusión, nuestros resultados concernientes a la actividad del fitoplancton corroboran la hipótesis propuesta, ya que el enriquecimiento con P afectó e interaccionó con el espectro de radiación solar sólo cuando las algas estuvieron limitadas por P. Xenopoulos et al. (2002) también encontraron efectos interactivos significativos entre el espectro de radiación solar y el enriquecimiento con P sobre comunidades algales limitadas por P, aunque, a diferencia de nuestros experimentos, obtuvieron una mayor sensibilidad del fitoplancton a UVR cuando la disponibilidad de P fue mayor (ver implicaciones).

### **Efectos del enriquecimiento con P sobre la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar**

La distinta composición elemental inicial del bacterioplancton (razón N:P<sub>b</sub>) también pudo condicionar el diferente patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar en los dos períodos experimentales estudiados. A mediados de verano, los valores de la razón N:P<sub>b</sub> fueron próximos a 20, mientras que en los experimentos de finales del período libre de hielo la razón N:P<sub>b</sub> indicaba una fuerte limitación por P (N:P<sub>b</sub> = 40.6) (Medina-Sánchez et al. 2002, Villar-Argaiz et al. 2002 b, Carrillo et al. enviado). De acuerdo con los umbrales propuestos por Chrzanowsky et al. (1996) en lagos

oligotróficos, que relacionan composición elemental y tasa de crecimiento de bacterias, razones molares N:P<sub>b</sub> superiores a 20 son predictoras de un lento crecimiento bacteriano. Estos criterios pueden explicar también que las tasas de incorporación de timidina fueran más bajas a finales del período libre de hielo que en Agosto.

La sorprendente disminución de la actividad bacteriana observada a mediados de verano en nuestras condiciones experimentales podría ser interpretada como el resultado de una ventaja competitiva de algas severamente limitadas por P frente a bacterias no limitadas. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Villar-Argaiz (1999), Duarte et al. (2000) y Carrillo et al. (enviado) sobre una escala temporal larga. Está documentado que el nanoplancton presenta ventaja competitiva sobre el bacterioplancton en situaciones de alta concentración de sustratos inorgánicos (Tarapchak y Moll 1990, Cotner y Wetzel 1992) o cuando las entradas de nutrientes minerales son pulsadas (Suttle et al. 1988, Villar-Argaiz 1999, Villar-Argaiz et al. 2002 b). Bergeron y Vincent (1997), en experimentos realizados con una aproximación similar a la de nuestro estudio, encontraron, tras el enriquecimiento con P, una disminución en la abundancia bacteriana y un crecimiento sostenido del nanoplancton bajo diferentes calidades de luz. Estos autores explican sus resultados atendiendo a la ventaja competitiva del nanoplancton frente a las bacterias debido a su mayor capacidad de almacenamiento de nutrientes, como ya se ha documentado en otros estudios (Suttle et al. 1987, Sterner et al. 1995).

Sin embargo, sólo una ventaja competitiva de las algas frente a las bacterias no explicaría satisfactoriamente la disminución de las tasas de incorporación de TdR tras el enriquecimiento. Un mecanismo responsable de esta disminución podría ser la capacidad bacterívora de algas mixotróficas, que al depredar selectivamente sobre las bacterias de mayor tamaño, que son las más activas y susceptibles de división celular (González et al. 1990, Sherr et al. 1992, Pernthaler et al. 1996), provocarían un consumo de producción bacteriana más que de efectivos de la comunidad bacteriana (Sherr y Sherr 1994), generándose así la disminución de actividad bacteriana observada. Es entonces llamativo que la bacterivoría tuviera un efecto mayor bajo condiciones de luz que en oscuridad, ya que distintos estudios han documentado que la mixotrofia constituye una ventaja adaptativa al utilizar la fracción bacteriana como fuente de C en situaciones o ecosistemas limitados por la luz (Caron et al. 1990, 1993). No obstante, nosotros consideramos que la mixotrofia también sería ventajosa en sistemas sometidos a un estrés de intensidad y calidad de radiación solar, ya que este tipo de metabolismo permitiría a los mixótrofos utilizar a las bacterias como fuente de C en condiciones de fotoinhibición de la

fotosíntesis, situación general en ecosistemas oligotróficos de aguas claras (Capítulo VIII).

A finales del período libre de hielo, la respuesta bacteriana pudo reflejar una interacción competitiva con las algas, pero condicionada por el régimen de luz, ya que fue favorable a las bacterias sólo en oscuridad y en luz completa. Este resultado estaría relacionado con las razones elementales de partida de ambas fracciones. Puesto que la composición elemental inicial de las algas estaba enriquecida en P, probablemente como resultado de una estrategia de consumo de lujo (Villar-Argaiz 1999, Carrillo et al. enviado), mientras que las bacterias fueron deficientes en este elemento, éstas mostraron una respuesta de crecimiento cuando las condiciones de luz fueron las más desfavorables al consumo de P por parte de las algas, esto es, presencia de UVB (Hessen et al. 1995, 1997) y oscuridad, quedando entonces este nutriente más disponible para las bacterias. En este sentido, es interesante destacar que las respuestas de inhibición bacteriana debido al enriquecimiento fueron, en conjunto, más acentuadas en los tratamientos N:P<sub>16</sub>, posiblemente debido a que en ellos la entrada de P fue cuantitativamente crítica para potenciar procesos de competencia o fagotrofia, pero, a diferencia de los tratamientos N:P<sub>5</sub>, insuficiente para satisfacer los requerimientos de P de ambas comunidades. No obstante, la falta de estímulo de crecimiento bacteriano en los tratamientos enriquecidos (N:P<sub>5</sub>) sin UVB pudo deberse también a una limitación potencial por C orgánico (ver abajo).

Las modificaciones del patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación en ambos períodos tras el enriquecimiento con P pueden ser interpretadas, por tanto, como una consecuencia derivada de la interacción competitiva alga-bacteria por el P y de la estrategia mixotrófica del fitoplancton. Dependiendo de las razones elementales iniciales de ambas comunidades, estos procesos condujeron a una falta de estímulo e incluso una disminución de la actividad bacteriana bajo todas (mediados de verano) o algunas (finales de verano) condiciones de luz, variaciones que se superpusieron a los efectos que las distintas regiones del espectro ejercen de forma subyacente sobre la actividad bacteriana.

### **Efectos del enriquecimiento con P y del espectro de radiación solar sobre la interacción algas-bacterias: uso bacteriano del C fotosintético**

El enriquecimiento con P ejerció efectos paralelos sobre la eficiencia de asimilación de C fotosintético (%PEA), la eficiencia de utilización de este C hacia nueva

biomasa bacteriana (%CUEb) y la tasa de incorporación de timidina (IT), variables que compartieron un mismo patrón de respuesta al espectro de radiación solar en cada período experimental. Así, cuando el enriquecimiento pulsado de P favoreció a las algas sobre las bacterias, éstas experimentaron una inhibición en su eficiencia de asimilación y de uso del C fotosintético y en su crecimiento. Por tanto, la concordancia entre estas variables de actividad bacteriana obtenidas por dos diferentes aproximaciones metodológicas, esto es, incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina y de  $^{14}\text{C}$  orgánico por las bacterias, se sigue manteniendo a pesar de las variaciones ocurridas con el enriquecimiento con P, lo que refuerza nuevamente nuestras anteriores conclusiones.

El análisis comparativo de la demanda-suministro de C fotosintético evidencia que, tras el enriquecimiento con P, las bacterias estuvieron potencialmente limitadas por C sólo en los tratamientos N:P<sub>5</sub> sin UVB en Octubre. Por ello, la carencia de estímulo de actividad bacteriana en estos tratamientos pudo ser el resultado, no sólo de una competencia con las algas, sino también de una limitación potencial por C fotosintético, que establece un umbral máximo de crecimiento bacteriano si las bacterias no utilizan otra fuente de C orgánico distinta al aportado por las algas. También en los tratamientos no enriquecidos, la respuesta positiva bacteriana a UVA+PAR y PAR llegaba hasta un máximo de actividad bacteriana, a partir del cual el C orgánico sería limitante. En los tratamientos N:P<sub>16</sub>, la interacción competitiva entre algas y bacterias predominó sobre la interacción comensalista, ya que la disponibilidad de C orgánico fue suficiente para soportar los requerimientos bacterianos.

## IMPLICACIONES

Es llamativo el hecho de que un incremento pulsado de Pi actúe como señal desencadenante de cambios metabólicos en las algas que condicionen variaciones en su interacción con las bacterias, dada la naturaleza pulsada de la mayor parte de las entradas de P a este sistema (Carrillo et al. 1990 b, Villar-Argaiz et al. 2001, 2002 b, Morales-Baquero et al. 1999). Nuestros resultados están en línea con la documentada ventaja adaptativa de las algas frente a las bacterias cuando las entradas de nutrientes limitantes son pulsadas (Suttle et al. 1988, Cotner y Wetzel 1992, Villar-Argaiz 1999), probablemente relacionada con la capacidad mixotrófica de la comunidad algal de La Caldera (ver Capítulo VIII). Por tanto, las algas cuentan con estrategias que les confiere ventaja sobre las bacterias, a pesar del elevado grado de adaptación de éstas últimas a la

radiación ultravioleta (Capítulo V). Esta ventaja de la comunidad algal ayuda a explicar su éxito y predominio sobre la comunidad bacteriana en este ecosistema a pesar de su oligotrofia.

La mayoría de los efectos interactivos significativos observados entre el enriquecimiento con P y las distintas regiones del espectro de radiación solar sobre las variables estudiadas tuvieron una naturaleza antagónica. Ello implica una atenuación de los efectos negativos de UVB ó UVA, así como de los positivos de UVA ó PAR, tras el enriquecimiento con P, hasta alterar el patrón de respuesta al espectro de radiación de algunas variables, según el período estacional (ej. EOC en Agosto, PB en Octubre). Por tanto, se podría concluir que las entradas pulsadas de nutrientes minerales al sistema parecen atenuar los efectos del espectro de radiación. En este sentido, Behrenfeld et al. (1994) observaron que UVB ejercía efectos sobre el fitoplancton sólo en muestras enriquecidas con nutrientes, y sugirieron que el estrés nutritivo puede reducir o enmascarar los efectos debidos al estrés por UVB, aunque también existen evidencias de lo contrario (Cullen y Lesser 1991).

Sin embargo, nosotros consideramos que la atenuación del estrés por radiación tras el enriquecimiento con P encontrada en nuestro estudio puede ser aparente. Así, la atenuación de los efectos de UVR sobre la PP en los tratamientos enriquecidos (interacciones antagónicas N:P  $\times$  UVX), constituiría más que un efecto interactivo de “protección” frente a la radiación ultravioleta, una consecuencia derivada de ajustes metabólicos activados por el consumo de P, particularmente bajo las calidades de luz más favorables al ulterior crecimiento algal. Asimismo, estos ajustes metabólicos condicionan, a través del incremento de las tasa de excreción de C fotosintético (EOC), la atenuación e incluso cambio de signo de los efectos de UVB y UVR sobre esta variable. No obstante, la radiación UVR siguió siendo el principal factor responsable de los mayores valores del porcentaje de excreción de C (%EOC) en el conjunto de los experimentos tras el enriquecimiento con P. Estos resultados evidencian que la radiación UV puede actuar amortiguando la tendencia de un incremento de la razón C:P de las algas (ej. por incremento de carbohidratos, *ver* Van Donk y Hessen 1995) en ecosistemas de aguas claras, independientemente de su composición elemental inicial. En este sentido, Xenopoulos et al. (2002) encontraron que uno de los principales efectos de la radiación UV fue disminuir la razón C:P de algas, lo que puede tener consecuencias en los niveles tróficos superiores al modificarse la calidad de su alimento.

En el caso de las respuestas bacterianas, la atenuación de los efectos del espectro de radiación solar tras el enriquecimiento estuvo condicionada por la interacción alga-bacteria, por lo que un conocimiento más preciso de los factores que afectan al bacterioplancton requiere el estudio experimental del efecto de estos factores (espectro de radiación solar, nutrientes limitantes) en presencia vs. ausencia de algas, materia del Capítulo siguiente.





## CAPÍTULO VII

---

### **Modulación de la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar por algas y nutrientes**

Parece que existe una comunidad de materia a lo largo de todo el universo visible, porque las estrellas contienen muchos de los elementos que existen en el Sol y en la Tierra. Es notable que los elementos difundidos más ampliamente entre las huestes de estrellas sean algunos de los elementos más estrechamente relacionados con los organismos vivientes de nuestro globo, entre ellos el hidrógeno, el sodio, el magnesio y el hierro.

William Huggins (1824-1910)

## INTRODUCCIÓN

Está establecido que un nutriente dado limita el crecimiento de los organismos cuando la disponibilidad del mismo es inferior a los requerimientos que de él tienen los organismos (Redfield 1958, Sterner y Elser 2002). El carbono orgánico, que es aportado directa o indirectamente por los productores primarios y sustenta el crecimiento de bacteriano (Rheinheimer 1992), ha sido considerado como el nutriente que primariamente limita la producción bacteriana. Este paradigma se ha establecido como inferencia de la correlación positiva de biomasa y producción entre fitoplancton y bacterias (ej. Cole et al. 1988), aunque la limitación de la actividad por carbono también ha sido demostrada directamente a partir de experimentos de enriquecimiento (Kirchman 1990, Kirchman et al. 1993, Carlson y Ducklow 1996, Rivkin y Anderson 1997, Vrede et al. 1999, Van Wambeke et al. 2002 a). Sin embargo, otros estudios han mostrado que el crecimiento bacteriano es estimulado por adiciones de nutrientes minerales (P ó N) solos (Toolan et al. 1991, Coveney y Wetzel 1992, Rivskin y Anderson 1997, Vrede et al. 1999), en presencia de DOM fotoalterado (Reche et al. 1998), o conjuntamente con C orgánico o P inorgánico (Morris y Lewis 1992, Rivskin y Anderson 1997, Vrede et al. 1999).

Basándose en la obtención de estímulos moderados de crecimiento bacteriano tras la adición de P solo o de glucosa sola, Felip et al. (1996) propusieron que, en condiciones *in situ*, tanto los nutrientes minerales como el carbono orgánico podrían co-limitar el crecimiento bacteriano. En teoría, una co-limitación real de bacterias heterotróficas por P y C implicaría que la producción bacteriana se estimularía sólo tras enriquecimientos con C+P, pero no con C o P solos. Sin embargo, bacterias CP-limitadas pueden ser estimuladas por la adición de sólo P si con ello se produce un incremento de la producción primaria y por tanto de la tasa absoluta de excreción de C orgánico (Van Wambeke et al. 2002 a). Por el contrario, la adición de sólo C orgánico estimulará exclusivamente a las bacterias heterotróficas y puede modificar la competencia alga-bacteria por el P a favor de las bacterias. En conclusión, las bacterias co-limitadas por C y P pueden ser estimuladas por la adición de P o C solos (Van Wambeke et al. 2002 a).

En nuestro estudio, la producción bacteriana parece estar controlada fundamentalmente por la tasa de excreción algal de C fotosintético (Capítulo IV), y también responde a un enriquecimiento con P, aunque mediada por procesos de interacción con el fitoplancton según su composición elemental y régimen de radiación solar (Capítulo VI). Por tanto, surge la cuestión de determinar la importancia relativa de ambos factores (C fotosintético vs. P) en el control del crecimiento bacteriano, y cómo

modulan la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar. Hasta donde nosotros conocemos, existe muy poca información acerca de la influencia de las algas y del régimen de radiación solar sobre la actividad bacteriana (Aas et al. 1996, Sommaruga et al. 1997), y prácticamente no se ha abordado el estudio de los efectos interactivos algas-nutrientes sobre el crecimiento bacteriano en diferentes calidades de luz.

Por tanto en este Capítulo nos proponemos como objetivos:

- (i) dilucidar experimentalmente si la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar depende de la presencia de las algas como fuente de C orgánico;
- (ii) evaluar la importancia relativa de la presencia de algas vs. enriquecimiento con P en la respuesta bacteriana a la radiación solar cuando la comunidad bacteriana presentó una composición elemental pobre en P (alta razón N:P<sub>b</sub>).

Al mismo tiempo, los experimentos llevados a cabo para abordar estos objetivos nos brindan la oportunidad de:

- (iii) evaluar la consistencia del patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar según una escala interanual, durante dos períodos clave en relación con el desarrollo de la comunidad planctónica y con la composición elemental relativa de las comunidades fitoplanctónica y bacteriana.

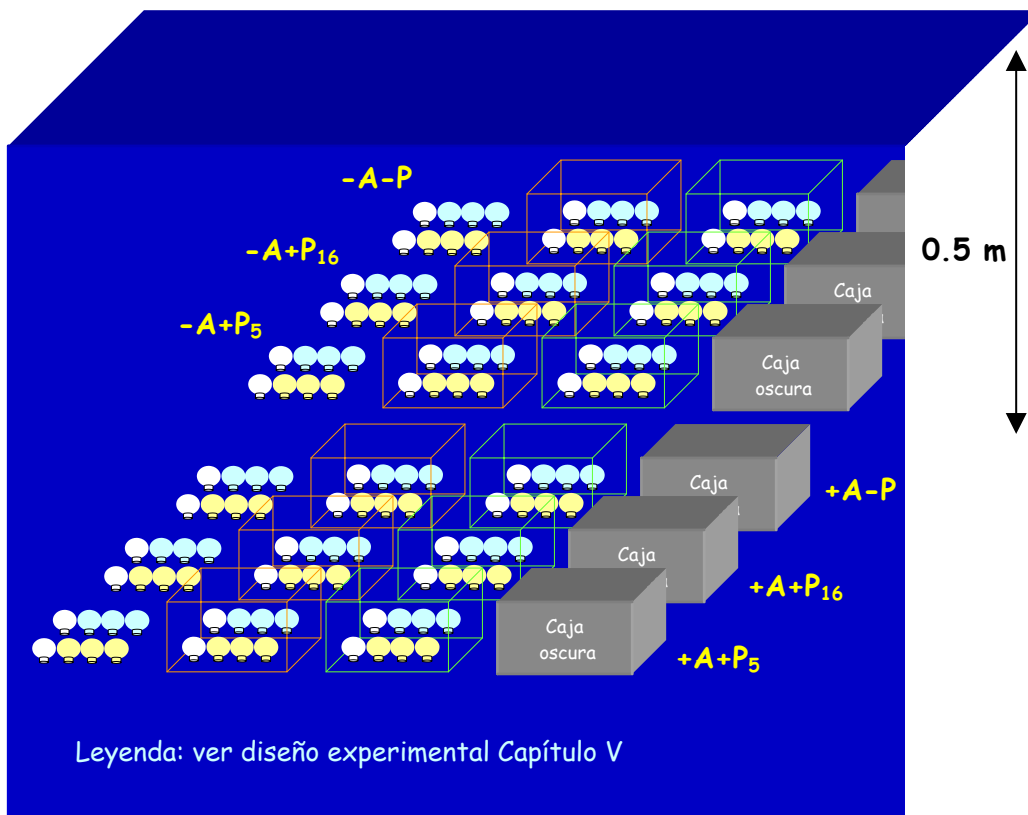
## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño experimental**

Los experimentos se realizaron en distintas fases del desarrollo de la comunidad durante el período libre de hielo de los años 1997 y 1998 en días despejados. La toma de muestras y la aproximación experimental y analítica (producción bacteriana) siguió el mismo procedimiento descrito en el Capítulo V.

Para evaluar el efecto de las algas sobre la actividad bacteriana se llevó a cabo un diseño experimental de 2 × 4 tratamientos: presencia vs. ausencia de algas, en los cuatro tratamientos de luz (Cuarzo: UVB+UVA+PAR; Mylar-D: UVA+PAR; UF3: PAR; Oscuro). Los tratamientos experimentales presencia vs. ausencia de algas se obtuvieron filtrando la muestra compuesta de agua del lago por filtros de 40 μm (Nytal) y de 1 μm

## DISEÑO EXPERIMENTAL



Aspecto parcial de las incubaciones *in situ*

(Whatmann GF/B) de tamaño de poro, respectivamente. Dada la ausencia de solapamiento de tamaño entre los organismos de La Caldera (Echevarría et al. 1990, Carrillo 1989, Medina-Sánchez et al. 1999, Villar-Argaiz 1999), la fracción comprendida entre 1 y 40  $\mu\text{m}$  correspondió esencialmente al fitoplancton, ya que la densidad de ciliados y de nanoflagelados heterotróficos fue muy escasa (Medina-Sánchez et al. 1999, ver Capítulo III). La fracción comprendida entre 0.2-1.0  $\mu\text{m}$  correspondió a las bacterias heterotróficas, ya que el picoplancton autótrofo no se encontró representado en este ecosistema (ver Capítulo III). La filtración a través de 1  $\mu\text{m}$  (GF/B) no supuso una retención significativa de bacterias, dado su pequeño tamaño (cocos, la forma dominante 0.28  $\mu\text{m}$  de diámetro medio; bacilos:  $0.9 \times 0.28 \mu\text{m}$  de longitud y anchura medias). De hecho, no se encontraron diferencias significativas (*t*-test para muestras dependientes,  $p > 0.2 \mu\text{m}$ ,  $n=6$ ) en la abundancia bacteriana entre muestras de agua entera vs. agua filtrada por 1  $\mu\text{m}$  (GF/B). La filtración por GF/B se realizó por gravedad y hasta un volumen máximo de 100 ml de agua del lago por filtro para evitar la obturación de sus poros (Medina-Sánchez et al. 2002).

Con objeto de evaluar la importancia relativa de la presencia de las algas y del enriquecimiento con P inorgánico sobre una comunidad bacteriana deficiente en este nutriente (razón  $\text{N:P}_b > 40$ ), se llevó a cabo un diseño experimental de  $2 \times 2 \times 4$  tratamientos: agua del lago no enriquecida vs. enriquecida con P (con dos niveles), presencia vs. ausencia de algas, y los cuatro tratamientos de luz anteriormente mencionados. El enriquecimiento con P se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el Capítulo VI. En el caso de los tratamientos enriquecidos sin algas, el  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  se añadió después de filtrar el agua de la muestra compuesta a través de 1  $\mu\text{m}$ .

### **Análisis estadísticos**

El efecto del espectro de radiación solar, de las algas y de su interacción se examinó mediante ANOVA de 2 vías. Además, el efecto interactivo entre cada región del espectro de radiación solar y la retirada de las algas se verificó mediante los correspondientes ANOVAs de 2 vías, incluyendo en cada análisis los tratamientos de luz que exclusivamente se distinguen en una determinada región espectral. Asimismo, el efecto del enriquecimiento con P, de la presencia de algas y de su interacción se examinó para cada tratamiento de luz mediante ANOVA de 2 vías. Las diferencias entre

tratamientos se examinaron mediante análisis de contrastes (LSD), ajustando las probabilidades del análisis al test de Bonferroni.

Se verificaron las asunciones requeridas por el ANOVA tal y como se describe en los Capítulos anteriores, y los datos se transformaron logarítmicamente cuando estas condiciones no se cumplían.

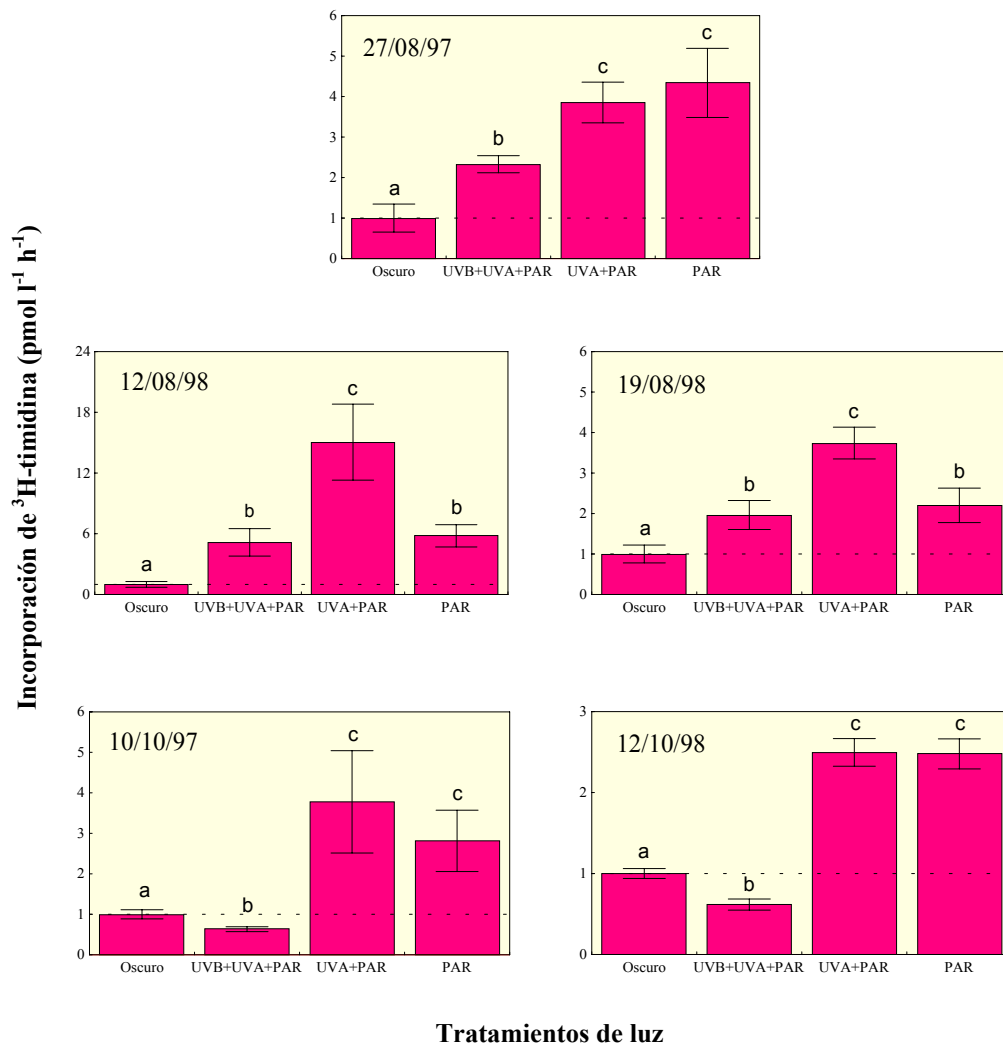
## RESULTADOS

### Patrones de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar (agua entera)

En los tratamientos experimentales de luz realizados con agua filtrada por 40  $\mu\text{m}$  (entera), los resultados mostraron un consistente patrón de actividad bacteriana según una escala tanto intra-anual como inter-anual (Tabla 7-1, Figura 7-1). Los rasgos de este

**Tabla 7-1.** Efectos experimentales de cada región espectral de la radiación solar en presencia (SI) y ausencia (NO) de algas, expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las tasas de incorporación de TdR con respecto a cada control, en diferentes experimentos. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

Efecto	Algas	10/Oct/1997		12/Ago/1998		19/Ago/1998		12/Oct/1998	
		$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
UVB	SI	-82	**	-66	**	-48	**	-75	***
	NO	-65	*	13	n.s.	9	n.s.	-56	*
UVA	SI	34	n.s.	160	**	70	**	1	n.s.
	NO	195	*	7	n.s.	62	n.s.	-27	n.s.
UVR	SI	-78	***	-11	n.s.	-11	n.s.	-75	***
	NO	2	n.s.	21	n.s.	77	n.s.	-68	**
PAR	SI	181	**	479	**	120	*	148	***
	NO	-13	n.s.	-30	n.s.	-24	n.s.	63	*
(UVA+PAR)	SI	278	**	1405	***	274	***	150	***
	NO	157	*	-25	n.s.	22	n.s.	19	n.s.
Luz	SI	-37	**	415	**	96	*	-38	**
	NO	-11	n.s.	-15	n.s.	34	n.s.	-48	*



**Figura 7-1.** Tasas de incorporación de timidina bajo diferentes calidades de luz. Nótese el diferente efecto neto de la radiación solar completa (tratamiento UVB+UVA+PAR vs. Oscuro) en los dos períodos estacionales estudiados, en ambos años. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos de luz. Barras de error: medias  $\pm$  DE.

patrón fueron: (i) un significativo efecto inhibitor de la radiación UVB sobre las tasas de incorporación de timidina; (ii) un significativo incremento (3-4 veces en promedio) de las tasas de incorporación de timidina bajo los tratamientos PAR y UVA+PAR, en comparación con los respectivos tratamientos oscuros, debido al efecto estimulador ejercido principalmente por PAR (en todos los experimentos), y secundariamente por UVA (en dos de los tres experimentos de Agosto).

La respuesta bacteriana a la radiación solar completa varió en los dos períodos estacionales estudiados en ambos años. A mediados de verano, las tasas de incorporación de timidina en los tratamientos UVB+UVA+PAR fueron significativamente mayores que las obtenidas bajo los tratamientos oscuros. Por tanto, la luz solar completa ejerció un efecto estimulador neto, a pesar del efecto inhibitor ejercido por UVB. Por el contrario, a finales de los periodos libres de hielo, la luz solar completa ejerció un efecto inhibitor neto (Tabla 7-1, Figura 7-1).

### Efectos de las algas sobre la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar

En todos los experimentos, la eliminación de la fracción algal produjo una significativa disminución de las tasas de incorporación de timidina en todos los tratamientos de luz (Tabla 7-2, Figura 7-2), así como una pérdida o atenuación de los

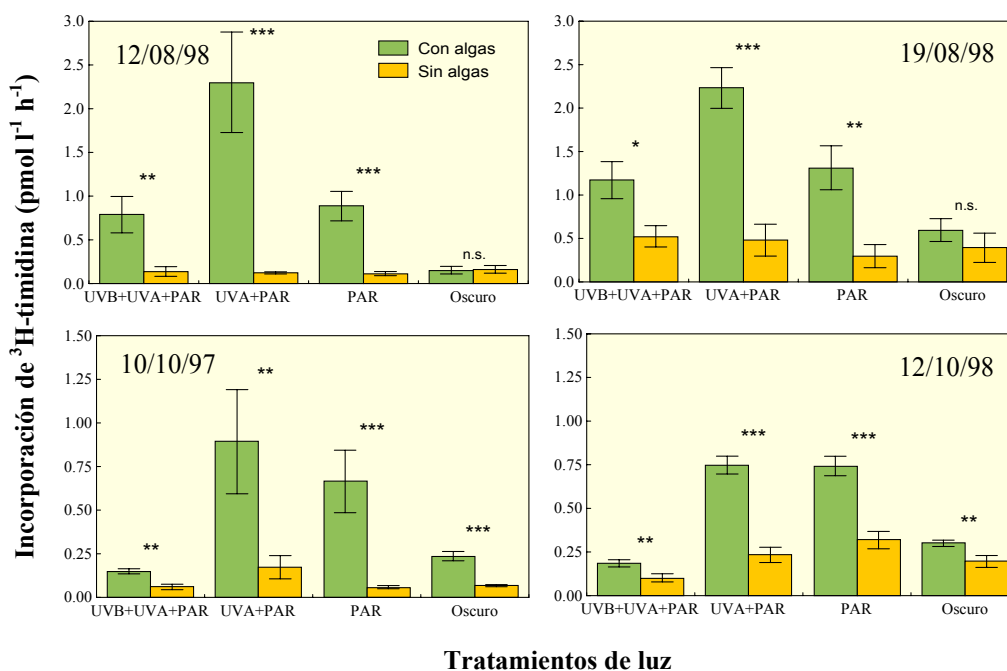
**Tabla 7-2.** Efectos experimentales de la retirada de las algas (-A) en cada tratamiento de luz (ver texto) expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las tasas de incorporación de TdR con respecto a cada control, en diferentes experimentos. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

Efecto	Trat.	10/Oct/1997		12/Ago/1998		19/Ago/1998		12/Oct/1998	
		$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
(-A)	Qz	-60	**	-83	**	-55	*	-45	**
	My	-81	**	-95	***	-78	***	-69	***
	UF3	-91	***	-87	***	-77	**	-57	***
	Os	-72	***	7	n.s.	-34	n.s.	-35	**



efectos que distintas regiones del espectro de radiación solar ejercían sobre la PB en agua entera. Estas modificaciones se reflejaron en interacciones significativas de carácter antagonico (Tabla 7-3, Figura 7-3).

A finales de los periodos libres de hielo, la eliminación de la fracción algal no modificó significativamente el efecto negativo neto que ejercía la luz solar completa sobre la PB, a pesar de que la disminución de PB asociada a la retirada de las algas también tuvo lugar en los tratamientos oscuros. Como consecuencia, no se obtuvo un efecto de interacción Luz solar completa  $\times$  (-algas) (Figura 7-3).



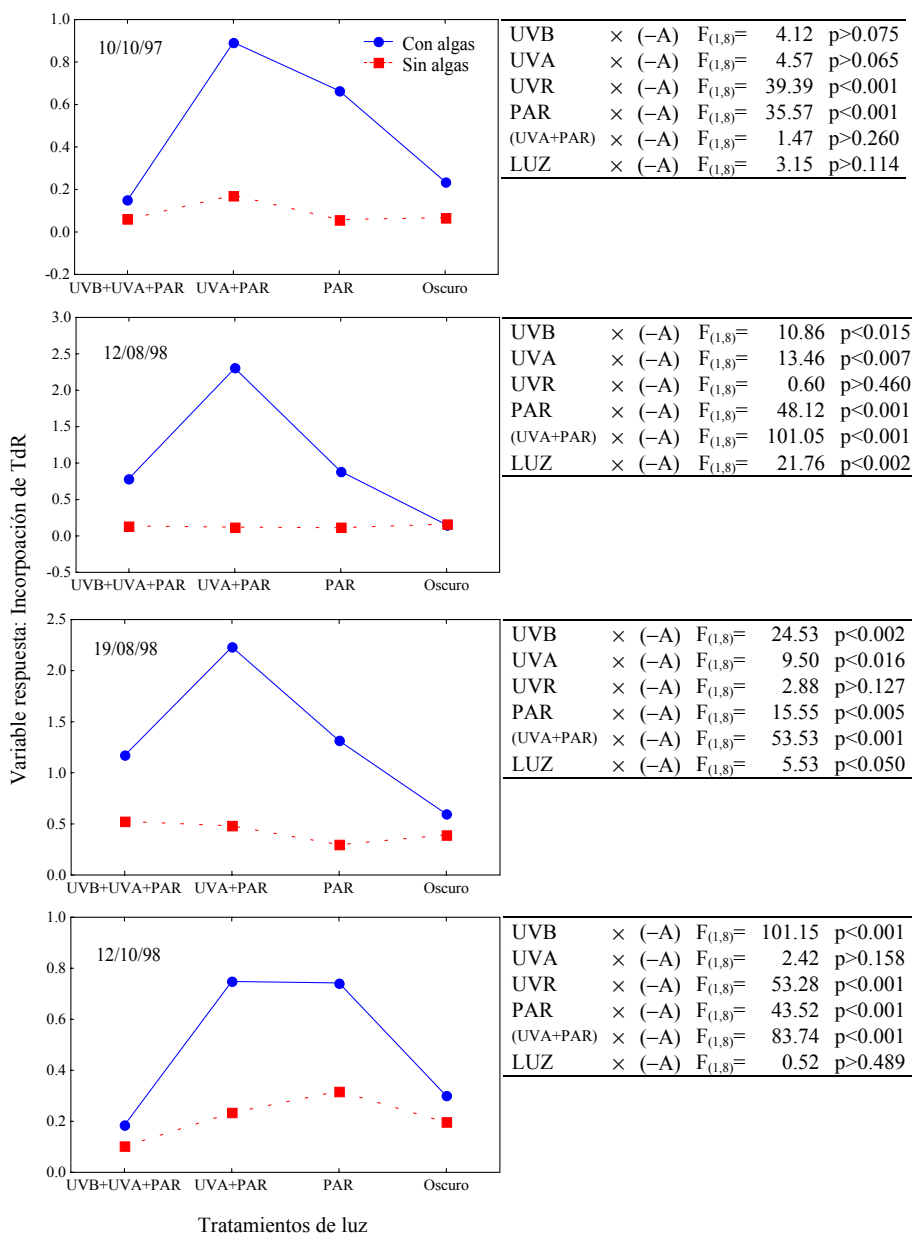
**Figura 7-2.** Efecto de la eliminación de la fracción algal sobre la tasa de incorporación bacteriana de timidina en distintas calidades de luz y periodos experimentales. Barras de error: medias  $\pm$  DE. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. no significativo.

### Efecto de las algas y del enriquecimiento con P sobre la respuesta de bacterias deficientes en P al espectro de radiación solar

Considerando como control absoluto el tratamiento sin algas y sin P ( $-A-P$ ), la adición de P hasta  $N:P_{16}$  ( $-A+P_{16}$ ) incrementó significativamente las tasas de incorporación de timidina sólo en los tratamientos de luz solar completa y oscuro, mientras que la adición de P hasta  $N:P_5$  ( $-A+P_5$ ) las incrementó significativamente en todos los tratamientos de luz (Tabla 7-4, Figura 7-4). Todos estos incrementos fueron particularmente pronunciados en los tratamientos de luz solar completa, lo que condujo a la supresión del efecto inhibitor que UVB y luz solar completa ejercían sobre la actividad bacteriana en los controles ( $-A-P$ ) (Tabla 7-5). La presencia de algas en condiciones no enriquecidas ( $+A-P$ ) estimuló la actividad bacteriana en todos los tratamientos de luz, particularmente los sometidos a radiación solar sin UVB (Tabla 7-4, Figura 7-4), ya que tanto UVB como la luz solar completa aún ejercieron efectos inhibidores (Tabla 7-5).

**Tabla 7-3.** Efectos de la radiación solar (1) y de la retirada de algas (2), sobre la incorporación de TdR, según el modelo ANOVA de 2-vías. g1, g2: grados de libertad. PV: Porcentaje de la varianza explicada calculada como suma de cuadrados del tratamiento/suma de total de cuadrados.

Fecha	Efecto	g1	g2	$F_{(g1,g2)}$	p	PV
10/10/97	1	3	16	36.32	<0.0001	12.49
	2	1	16	243.36	<0.0001	83.69
	1×2	3	16	10.11	<0.0006	3.48
	Error					0.34
12/08/98	1	3	16	19.09	<0.0001	7.33
	2	1	16	210.53	<0.0001	80.87
	1×2	3	16	29.70	<0.0001	11.41
	Error					0.38
19/08/98	1	3	16	22.07	<0.0001	12.02
	2	1	16	141.88	<0.0001	77.30
	1×2	3	16	18.60	<0.0001	10.13
	Error					0.54
12/10/98	1	3	16	133.86	<0.0001	27.71
	2	1	16	302.02	<0.0001	62.51
	1×2	3	16	46.25	<0.0001	9.57
	Error					0.21



**Figura 7-3.** Efectos interactivos entre las distintas regiones espectrales y la retirada de algas sobre la incorporación de TdR según el modelo ANOVA de 2-vías.

El efecto combinado de la presencia de algas y del enriquecimiento con P condujo a una pronunciada modificación del patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar descrito arriba (Figura 7-4), obteniéndose una interacción sinérgica significativa entre los dos factores (presencia de algas y enriquecimiento con P) en el tratamiento oscuro, una interacción antagonica significativa en los tratamientos de luz sin UVB, y ausencia de interacción bajo luz solar completa (Tabla 7-6, Figura 7-4).

## DISCUSIÓN

El patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar, así como sus variaciones intraanuales, fue consistente interanualmente en condiciones no manipuladas de agua del lago. Los argumentos discutidos en los Capítulos V y VI en relación con el papel de los mecanismos de fotoreparación y de la disponibilidad de C fotosintético como factores clave que condicionan tal patrón de respuesta bacteriana, no parecen ser suficientes para explicar las diferencias en el efecto neto ejercido por la luz solar completa sobre el crecimiento bacteriano entre los dos períodos experimentales estudiados. El conocimiento de las causas de estas diferencias estacionales es importante ya que los resultados obtenidos en los tratamientos de luz completa son los más próximos a las condiciones del lago.

Nuestros resultados muestran que el efecto inhibitorio de UVB sobre la PB fue más pronunciado en Octubre que en Agosto (Tabla 7-1), a pesar de que la intensidad de radiación UVB incidente a la superficie del lago es más baja en Octubre, debido al mayor ángulo solar (Figura 5-1, Capítulo V). Como ya se discutió en el Capítulo V, la disminución de la abundancia de fitoplancton ocurrida en Octubre podría explicar en parte estos resultados. No obstante, las variaciones de la densidad de fitoplancton pueden no ser suficientes para condicionar estas diferencias tan marcadas en la intensidad de inhibición por UVB, ya que según las predicciones del modelo modificado de Morris et al. (1995), la concentración de DOC explicó hasta un 89% de la varianza de  $K_{d,\lambda}$ . Es posible, por tanto, que otros factores, además de la variación en la transparencia del lago a la radiación UV, puedan determinar una mayor vulnerabilidad de las bacterias en este período a UVB, condicionando que el efecto neto de la luz solar completa fuera negativo.

Kaiser y Herndl (1997) discuten que la intensidad de inhibición de la actividad bacteriana por la radiación UVB, así como la rapidez de recuperación por efecto de UVA y PAR, puede depender de la disponibilidad de nutrientes para las bacterias.

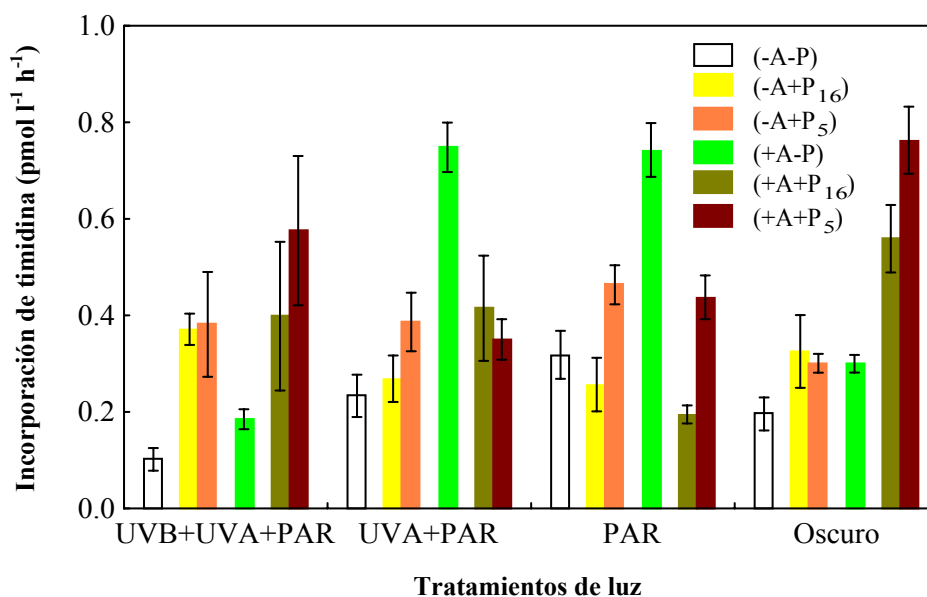
Efectivamente, nuestros experimentos muestran que la eliminación de la fracción algal resultó en una disminución de las tasas de incorporación de timidina bajo los tratamientos de luz, que condujo a una pérdida del efecto estimulador de UVA, UVA+PAR (en ambos períodos experimentales) y luz solar completa (finales del período libre de hielo). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores (Aas et al. 1996, Sommaruga et al. 1997), y muestran que la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar es dependiente de la presencia de algas. Sommaruga et al. (1997) señalan que las algas pueden ejercer un efecto de “escudo fotoprotector” de radiación UV para las bacterias. Nosotros consideramos que, de ser relevante este efecto fotoprotector, la actividad bacteriana no tendría por qué disminuir al retirar la fracción algal en aquellos tratamientos cuyo régimen de radiación no implicó un daño a las bacterias (ej. tratamientos PAR, UVA+PAR, y oscuridad, ver Figura 7-2). Por lo tanto, interpretamos que el papel modulador de las algas está fundamentalmente relacionado con el suministro que realizan de C fotosintético. Nuestra interpretación está sustentada por el incremento en la excreción de C fotosintético en los tratamientos con UVR, que es utilizado por las bacterias (ver Capítulo V) y que se refleja sobre una escala espacio-temporal más amplia en la relación directa significativa encontrada entre EOC y PB (ver Capítulo IV).

**Tabla 7-4.** Efectos experimentales de la adición de P (dos niveles: +P<sub>16</sub>, +P<sub>5</sub>), presencia de algas (+A), y ambos factores simultáneos (+A+P<sub>16</sub>, +A+P<sub>5</sub>) en cada tratamiento de luz (ver texto) expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las tasas de incorporación de TdR con respecto a cada control. Niveles de significación: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n.s. no significativo.

Efecto	UVB+UVA+PAR		UVA+PAR		PAR		Oscuro	
	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
(-A+P <sub>16</sub> )	265	***	15	n.s.	-19	n.s.	66	**
(-A+P <sub>5</sub> )	275	***	66	*	46	**	54	**
(+A-P)	82	*	221	***	133	***	53	**
(+A+P <sub>16</sub> )	291	***	78	**	-39	**	185	***
(+A+P <sub>16</sub> )	466	***	50	*	37	**	290	***

La dependencia bacteriana del C fotosintético se manifiesta incluso en la disminución de su actividad en los tratamientos oscuros de Octubre al retirar la fracción algal. Estos resultados indican que la liberación de C es un proceso funcional neutro que puede continuar durante períodos de tiempo de oscuridad posteriores a la exposición a la

luz, lo que está en línea con los resultados obtenidos por Mague et al. (1980), e incluso puede estar relacionado con la respuesta EPIR (ver Capítulo IV). Además, nuestros resultados indican una baja biodisponibilidad del C orgánico disuelto “viejo” del lago, dada la baja actividad bacteriana y la pérdida o atenuación del patrón de respuesta al espectro de radiación solar en ausencia de algas, lo que contrasta con los resultados obtenidos por otros autores (Aas et al. 1996, Somaruga et al. 1997). Nuestros resultados también podrían reflejar una fotoalteración del carbono autóctono que conduce a una disminución de su biodisponibilidad (Benner y Biddanda 1998, Obernosterer et al. 1999, Obernosterer et al. 2001, Reche et al. 2001).



**Figura 7-4.** Respuesta a diferentes tratamientos experimentales de una comunidad bacteriana inicialmente deficiente en P (alta N:P<sub>b</sub>). Leyenda: ver texto. Barras de error: medias  $\pm$  DE.

Aunque los mecanismos de fotoreparación pudieron actuar en ausencia de algas, sólo se manifestaron como crecimiento bacteriano adicional cuando las algas (fuente de C orgánico) estuvieron presentes. Este hecho subraya que el efecto de la radiación solar sobre las bacterias fue indirecto y mediatizado por la presencia de algas, lo que se revela en la atenuación de los efectos negativos de UVB o de luz completa, así como de los positivos de UVA, PAR ó luz completa en ausencia de algas.

Por tanto, la presencia de algas (como fuente de C) no explica el diferente efecto neto de la luz solar completa sobre las bacterias, puesto que, en ausencia de algas, la luz no ejerció ningún efecto directo sobre las bacterias en el período central del verano, mientras que su efecto continuó siendo inhibitorio a finales del período libre de hielo.

Como se vio en el Capítulo VI, la composición elemental de las bacterias se revela como factor clave que puede explicar el efecto neto de la luz solar en los distintos períodos experimentales. Cuando las bacterias presentaron una composición elemental más equilibrada, la luz solar completa ejerció un efecto estimulador neto (con algas) o nulo (sin algas), de forma que los procesos de fotoreparación pudieron contrarrestar el efecto inhibitorio de UVB. Por el contrario, a finales del período libre de hielo, una severa deficiencia bacteriana en P (razón N:P<sub>b</sub> > 40) determinó que la luz solar completa siempre ejerciera un efecto negativo. Esta explicación es soportada experimentalmente por la

**Tabla 7-5.** Efectos de cada región espectral de la radiación solar en distintos tratamientos experimentales (ver texto), expresados como variación porcentual [ $\Delta(\%)$ ] de las tasas de incorporación de TdR con respecto a cada control. Niveles de significación: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n.s. no significativo.

Efecto	-A-P		-A+P <sub>16</sub>		-A+P <sub>5</sub>		+A-P		+A+P <sub>16</sub>		+A+P <sub>5</sub>	
	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p	$\Delta(\%)$	p
UVB	-56	*	38	*	-1	n.s.	-75	***	-4	n.s.	64	n.s.
UVA	-27	n.s.	5	n.s.	-17	n.s.	1	n.s.	113	*	-20	n.s.
UVR	-68	**	45	*	-18	n.s.	-75	***	105	n.s.	32	n.s.
PAR	63	*	-21	n.s.	54	**	148	***	-65	***	-43	**
(UVA+PAR)	19	n.s.	-17	n.s.	28	*	150	***	-26	n.s.	-54	***
Luz	-48	*	14	n.s.	27	n.s.	-38	**	-29	n.s.	-25	n.s.

supresión del efecto inhibitorio de UVB y de la luz solar completa en Octubre después de un enriquecimiento con P (hasta las razones N:P<sub>16</sub> y N:P<sub>5</sub>), tanto en presencia como en ausencia de algas (Figura 7-4, Tabla 7-5, ver también Capítulo VI). De aquí se infiere que bacterias deficientes en P serían más vulnerables al efecto negativo ejercido por UVB que bacterias con una composición elemental más equilibrada. Las causas de esta mayor vulnerabilidad pueden estar relacionadas con las mayores necesidades de fósforo para la sustitución metabólica de los constituyentes celulares dañados por la radiación UVB o para proporcionar metabolitos (ej. ATP) implicados en procesos de reparación no dependientes de la luz (Xenopoulos et al. 2002).

Hasta donde conocemos, no existen estudios realizados *in situ* que hayan documentado los efectos conjuntos de la presencia de algas y de nutrientes limitantes sobre la actividad bacteriana bajo diferentes calidades de radiación solar. Dado que la presencia de algas jugó un papel determinante en el patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar en ambos períodos experimentales, y el enriquecimiento con P modificó este patrón principalmente en Octubre, cuando la composición elemental de las bacterias fue deficiente en P, nosotros hemos evaluado experimentalmente los efectos ejercidos por cada factor y sus interacciones en estas particulares condiciones.

Así, el enriquecimiento con P en Octubre (tanto en los tratamientos N:P<sub>16</sub> como N:P<sub>5</sub>) condujo a un moderado estímulo directo de la actividad bacteriana, particularmente en los tratamientos N:P<sub>5</sub>, consecuencia de una mejora de la composición elemental de las bacterias. No encontramos actualmente una explicación satisfactoria para la inesperada ausencia de estímulo significativo directo (ausencia de algas) de la actividad bacteriana en los tratamientos N:P<sub>16</sub> bajo UVA+PAR y PAR.

**Tabla 7-6.** Efectos de la presencia de algas (1) y de la adición de P (2), según el modelo ANOVA de 2-vías. g1, g2: grados de libertad. PV: Porcentaje de la varianza explicada calculada como suma de cuadrados del tratamiento/suma de total de cuadrados.

Tratamiento	Efecto	g1	g2	F <sub>(g1,g2)</sub>	p	PV
UVB+UVA+PAR	1	1	12	7.91	<0.0157	16.56
	2	2	12	36.84	<0.0001	77.15
	1×2	2	12	2.00	>0.1777	4.19
	Error					2.09
UVA+PAR	1	1	12	48.40	<0.0001	54.90
	2	2	12	9.40	<0.0035	10.67
	1×2	2	12	29.35	<0.0001	33.30
	Error					1.13
PAR	1	1	12	26.79	<0.0003	17.77
	2	2	12	70.83	<0.0001	47.00
	1×2	2	12	52.08	<0.0001	34.56
	Error					0.66
Oscuro	1	1	12	111.08	<0.0001	64.15
	2	2	12	43.95	<0.0001	25.38
	1×2	2	12	17.13	<0.0002	9.89
	Error					0.58



A partir de los resultados experimentales mostrados en la Figura 7-4 puede ser inferido que, en ausencia de algas, el efecto de la adición de P sobre bacterias deficientes en este elemento (tratamientos  $-A+P_{16}$  ó  $-A+P_5$ ) fue eliminar su vulnerabilidad a la radiación UVB, mientras que la presencia de algas en condiciones de agua no enriquecida no hizo que las bacterias fueran más resistentes a la radiación UVB; su efecto fue el de potenciar la actividad bacteriana, que alcanzó un aparente umbral máximo en los tratamientos de luz donde se excluyó UVB pero estuvieron presentes las regiones del espectro con capacidad fotoreparadora, esto es UVA y PAR (Kim y Sancar 1993, Friedberg et al. 1995, Quesada et al. 1995, Kaiser y Herndl 1997). Este umbral máximo de crecimiento bacteriano vendría determinado por la razón entre la disponibilidad y los requerimientos bacterianos de C fotosintético, que en dichos tratamientos comenzaría a ser limitante.

Los efectos interactivos de ambos factores (algas y P) fueron el reflejo de la relación competitiva entre algas y bacterias, modulada por el régimen de luz, y que, como se expuso en Capítulo anterior, resultó en una alteración del patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar tras la adición pulsada de P. Así, la interacción antagónica algas  $\times$  P encontrada en los tratamientos UVA+PAR y PAR (Tabla 7-6) sería indicativo de un resultado ventajoso para las algas bajo un régimen de radiación solar sin UVB; la interacción sinérgica obtenida en el tratamiento oscuro indica una ventaja competitiva de las bacterias. Finalmente, la ausencia de interacción algas  $\times$  P en luz solar completa indica una ausencia de ventaja de una comunidad sobre la otra en estas condiciones. Estos resultados muestran que la naturaleza de la interacción alga-bacteria (comensalismo vs. competencia) puede estar modulada por el régimen de luz y de suministro de nutrientes minerales, y están en línea con los aportados por Gurung et al. (1999) (con cautela por las diferencias en las condiciones experimentales entre ambos estudios), quienes encontraron cambios desde un comensalismo por C a una competencia por P dependiendo del suministro de nutrientes y de la intensidad de PAR en condiciones de cultivo.

## CONCLUSIONES

En resumen, nuestros resultados indican que: (i) el patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar fue consistente interanualmente y dependió de la presencia simultánea de las algas; (ii) la respuesta bacteriana a la radiación solar completa en

condiciones no manipuladas del agua del lago fue el resultado neto de procesos de daño y de recuperación, y estuvo relacionada con la composición elemental de las bacterias. Así, una razón N:P bacteriana equilibrada (mediados de verano), junto con la presencia de algas, condujo a un estímulo del crecimiento bacteriano como respuesta al suministro de C fotosintético, evidenciando un efecto neto positivo de la radiación solar completa. Por el contrario, cuando la composición elemental de las bacterias fue deficiente en P (Octubre, alta razón N:P<sub>b</sub>), el crecimiento bacteriano resultó más fuertemente inhibido por UVB, y el efecto neto de la radiación solar completa fue negativo, indicando una insuficiencia de los mecanismos de recuperación y, por tanto, una mayor vulnerabilidad de bacterias deficientes en P a la radiación UVB; (iii) en ausencia de algas y, como consecuencia, con un crecimiento bacteriano disminuido, la radiación UVB ejerció un efecto inhibitorio directo sobre las bacterias sólo cuando éstas tuvieron una razón N:P<sub>b</sub> alta, lo que refuerza la idea de una mayor vulnerabilidad de las bacterias a la radiación UVB cuando su composición elemental es deficiente en P.

Nuestros resultados indican que la respuesta bacteriana al espectro de radiación solar fue modulada por su composición elemental y por su interacción con la comunidad fitoplanctónica, cuyos efectos sobre las bacterias fueron positivos (suministro de C fotosintético) y negativos (competencia por nutrientes minerales limitantes). En última instancia, la composición elemental bacteriana determinó su grado de adaptación a los altos niveles de radiación UVB incidente en el ecosistema.

## **CAPÍTULO VIII**

---

### **Epílogo: mixotrofia en las algas**

¿Por qué no dispuso la naturaleza que los animales no viviesen unos de la muerte de los otros?

Leonardo Da Vinci (1452-1519)

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de esta memoria de tesis se ha discutido la existencia de un control por depredación de la comunidad bacteriana ejercido por el fitoplancton mixotrófico con capacidad bacterívora (ver Capítulos III, IV, VI, VII). Aunque tradicionalmente se ha asumido que las bacterias son principalmente consumidas por flagelados heterotróficos (Azam et al. 1983, Andersen y Fenchel 1985, McManus y Fuhrman 1986, Baretta-Bekker et al. 1994), diversos estudios realizados en ambientes naturales han evidenciado que los flagelados pigmentados pueden ser una causa principal de la mortalidad bacteriana, tanto en ambientes con reducidas intensidades de luz (Bird y Kalff 1986, 1987, 1989, Sanders y Porter 1988, Sanders et al. 1989, Bennet et al. 1990, Berninger et al. 1992, Hall et al. 1993), como con bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos (Nygaard y Tobiesen 1993, Arenovski et al. 1995, Havskum y Riemann 1996).

La fagotrofia por parte de células pigmentadas no debe ser considerada como una capacidad extraña o recientemente adquirida; más bien lo contrario, puesto que, desde el punto de vista evolutivo, la fagotrofia fue (y es) una capacidad esencial en la evolución de los eucariotas fotosintéticos. En efecto, grupos como las Clorofitas y Rodofitas surgieron mediante acontecimientos endosimbióticos, por los cuales cianobacterias originalmente ingeridas como fuente de alimento fueron retenidas como endosimbiontes fotosintéticos. Posteriormente éstos perdieron su autonomía y evolucionaron (¿o involucionaron?) hasta cloroplastos debido a procesos de transferencia hacia el núcleo del hospedador de los genes necesarios para el funcionamiento independiente (Bhattacharya y Medlin 1995, van den Hoek et al. 1995). Otros eucariotas como Heterokontas (diatomeas, crisófitas y algas pardas), Criptofitas, Haptofitas, Dinofitas, Euglenofitas, Clororacniofitas, e incluso metazoos, obtuvieron sus plastos por sucesivas rondas de endosimbiosis de miembros unicelulares pigmentados de Clorofitas, Rodofitas y Dinofitas, con una posterior transferencia en mayor o menor grado de genes funcionales al núcleo del hospedador (Clark 1992, Bhattacharya y Medlin 1995, van den Hoek et al. 1995, Smith y Douglas 1987, Palmer y Delwiche 1996). En conclusión, la fagotrofia en los eucariotas fotosintéticos es un carácter primitivo, de extensión universal, y su ausencia un carácter derivado (Raven 1997).

Algunos mixótrofos pueden cambiar su metabolismo desde una fagotrofia hasta una fotoautotrofia relativamente estricta, en tiempos más o menos cortos. Basándose en una gran variedad de especies, Sanders et al. (1990) introdujeron el concepto de

“gradiente mixotrófico” para englobar organismos desde fotoautótrofos hasta fagótrofos casi puros. Más recientemente, Jones (1997) postuló que el mejor procedimiento para identificar los recursos que requieren los mixótrofos de sus presas pasaría por cuantificar las variaciones en la tasa de ingestión como respuesta a las condiciones de luz. De este modo, clasificó a los protistas mixotróficos en cuatro categorías dependiendo de su modo de nutrición en condiciones de luz: grupo A, mixótrofos fundamentalmente fagotróficos, pero que utilizan el modo fototrófico cuando la densidad de presas es limitada; grupo B, mixótrofos fundamentalmente fototróficos, pero que cuentan con la fagotrofia como fuente de carbono a bajas intensidades de luz; grupo C, mixótrofos que obtienen la energía mediante fototrofia y usan la fagotrofia para adquirir nutrientes esenciales o sustancias para el crecimiento; grupo D, mixótrofos fundamentalmente fototróficos que utilizan la fagotrofia para sobrevivir bajo condiciones de oscuridad prolongada.

El mantenimiento de un metabolismo mixotrófico supone un coste mayor que el de un metabolismo estrictamente autótrofo o heterótrofo, debido principalmente a la síntesis de los aparatos fotosintético y fagotrófico en la misma célula. Raven (1995) ha estimado que el aparato fotosintético (más la maquinaria de asimilación de nutrientes inorgánicos) puede suponer hasta el 50% del costo de energía, C, N, P y Fe de la síntesis celular, y constituir una alta fracción de la biomasa, mientras que el aparato fagotrófico implica <10% del costo de síntesis celular.

A pesar de su mayor coste, el metabolismo mixotrófico constituye una estrategia adaptativa del fitoplancton para crecer en condiciones adversas si un modo de nutrición predominantemente fototrófico es suplementado por fagotrofia o viceversa (Rothhaupt 1996 a, b). Los beneficios de la fagotrofia en los flagelados fotosintéticos estriban en que ésta permite la adquisición de nutrientes o de C orgánico para mantener el crecimiento bajo condiciones de limitación de nutrientes o de luz, respectivamente. Si las condiciones de luz son saturantes, la ventaja de la fagotrofia estaría relacionada más con la adquisición de nutrientes (P, N, Fe) que de C o energía. Esta interpretación es consistente con el hecho de que las razones C:N, C:P y C:Fe de las presas (generalmente bacterias heterotróficas) son más bajas que las de los fagótrofos fotosintéticos (Caron et al. 1990, 1993, Fagerbakke et al. 1996). Cuando las condiciones de luz son limitantes, la ventaja de la fagotrofia estaría relacionada más bien con la adquisición de C orgánico (Caron et al. 1990, 1993), aunque algunos estudios experimentales no han mostrado una mayor tasa de bacterivoría a bajas intensidades de luz (Bird y Kalff 1987, Arenovski et al. 1995). En este escenario de limitación por luz, las diferencias en las razones C:N, C:P ó C:Fe entre

presas y fagótrofos tienden hacia un exceso de nutrientes en éstos últimos, aunque este exceso no sería tan elevado como en el caso de un fagótrofo no fotosintético con una composición elemental constitutiva similar y que usara la misma fuente de alimento (Raven 1997). Esta idea concuerda con los resultados obtenidos por Rothhaupt (1996 a, 1997) de una liberación de SRP y  $\text{NH}_4^+$  por el exclusivo fagótrofo *Spumella* sp. al alimentarse de bacterias, así como por el mixótrofo *Ochromonas* sp. cuando su modo de nutrición fue fundamentalmente fagotrófico (en oscuridad, o en luz con altas densidades de bacterias), mientras que consumió estos nutrientes cuando su modo de nutrición fue predominantemente fototrófico. Además, en condiciones de limitación de P pero no de luz, *Ochromonas* sp. retuvo intracelularmente el P de las bacterias, incluso durante las fases nocturnas, para su propio crecimiento fotosintético. Carrillo y Giussani (1991) también encontraron incrementos en el consumo de P por dinoflagelados durante el período nocturno.

El grupo de las crisofíceas contiene muchos flagelados mixotróficos y generalmente domina la comunidad fitoplanctónica en lagos oligotróficos y distróficos (Salonen y Jokinen 1988, Jansson et al. 1996), de altas latitudes (Duthie y Hart 1987, Eloranta 1989, 1995, Lepistö y Rosenström 1998) y de alta montaña (Martínez 1977, Sánchez-Castillo et al. 1989, Carrillo et al. 1990 a, 1991 a, b, 1995, De Hoyos et al. 1998, Medina-Sánchez et al. 1999, Villar-Argaiz et al. 2001), observaciones que soportan la idea de que la mixotrofia es una estrategia favorable en ambientes donde el fitoplancton está limitado por nutrientes minerales. En los lagos distróficos, las algas mixotróficas tienen ventaja, puesto que su capacidad fagotrófica les permite acceder a fuentes de C orgánico y nutrientes minerales en condiciones de limitación de luz. En el caso de los ecosistemas de alta montaña de aguas claras, como La Caldera, la cubierta invernal de hielo y nieve favorece el desarrollo bajo esta capa de algas mixotróficas, que dependen para su crecimiento de la bacterivoría, debido a las condiciones de limitación de luz (Felip et al. 1999). Tras el deshielo, el estrés de radiación y la oligotrofia (Carrillo et al. 1996 a, Medina-Sánchez et al. 1999) son condiciones que también favorecen la dominancia de crisofíceas y otros mixótrofos potenciales, ya que su capacidad bacterívora les confieren ventaja al poder explotar una fuente tanto de nutrientes minerales como de C orgánico, cuya síntesis está inhibida por el estrés de radiación solar (Carrillo et al. 2002, Capítulo V), y eliminar al mismo tiempo a sus propios competidores (Thingstad 1996). Su efecto sobre las bacterias permitiría no sólo explicar algunos de los resultados obtenidos, sino también ayudar a comprender la razón de algunas particularidades de este sistema, como la ventaja competitiva mostrada por la comunidad algal frente al

bacterioplancton, la escasa abundancia, biomasa, tamaño celular y actividad de la comunidad bacteriana, o el escaso desarrollo del bucle microbiano heterotrófico, contrariamente a lo esperado en un sistema oligotrófico (Cotner y Biddanda 2002).

Por tanto en este Capítulo nos proponemos como objetivos: (i) evaluar experimentalmente la existencia de capacidad bacterívora por parte de la fracción fitoplanctónica; (ii) cuantificar si esta capacidad varía en condiciones de luz vs. oscuridad; (iii) cuantificar posibles variaciones de esta capacidad en diferentes períodos de desarrollo de la comunidad planctónica.

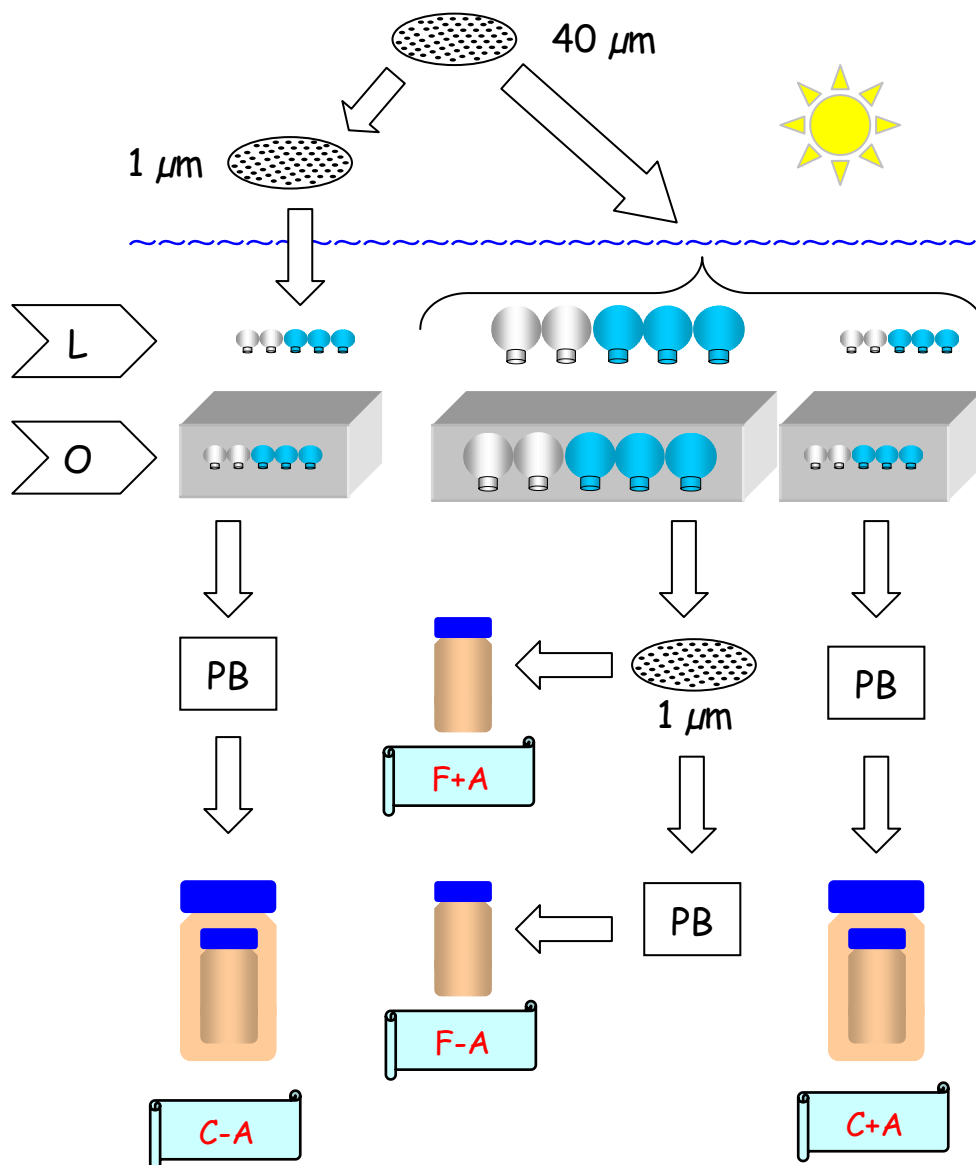
## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño experimental**

Los experimentos se realizaron en los períodos central y final de la estación libre de hielo de 1999, durante días despejados. Para cada experimento se obtuvo una muestra compuesta de agua del lago siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Capítulo V, y se cuantificó la abundancia y biomasa de bacterias y de las distintas especies fitoplanctónicas, como se describe en el Capítulo II. Se llevó a cabo un diseño experimental de  $2 \times 2$  tratamientos: presencia vs. ausencia de algas, y luz solar completa vs. oscuridad. Los tratamientos de algas se obtuvieron filtrando por gravedad agua de la muestra compuesta a través de filtros de  $40 \mu\text{m}$  (Nytal, tratamientos con algas, +A) y  $1 \mu\text{m}$  (Whatman GF/B, 100 ml máximo por filtro, tratamientos sin algas, -A) de diámetro de poro. Los tratamientos -A no implicaron una significativa retención de bacterias (ver Capítulo VII), y constituyeron controles de bacterivoría por ausencia de mixótrofos. Cada tratamiento de luz consistió en un conjunto de 5 (3 réplicas + 2 blancos) botellas experimentales de cuarzo de 35 ml (para los tratamientos +A) o de 5 ml (para los tratamientos -A) de capacidad nominal, situadas horizontalmente sobre una plataforma y descubiertas (tratamientos de luz completa, L) o cubiertas por un material opaco (tratamientos oscuros, O).

Inmediatamente antes de las incubaciones se añadió a cada botella experimental [metil- $^3\text{H}$ ] timidina (actividad específica: 76-82 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ , Amersham Pharmacia) hasta una concentración final de 10.9 nM. Para cada tratamiento, las botellas experimentales se

## Diseño experimental





incubaron *in situ* a 0.5 m de profundidad, durante 90 minutos simétricamente distribuidos alrededor del mediodía solar. Al final del período de incubación se añadió formaldehído neutralizado hasta una concentración final de 3.4% para detener la incorporación bacteriana de timidina, y la bacterivoría (en los tratamientos +A). Asimismo, los blancos fueron fijados con formaldehído neutralizado (c.f. 3.4 %) antes de proceder a las incubaciones. Estos blancos además de constituir controles de incorporación bacteriana de timidina también fueron controles de incorporación pasiva y adsorción de timidina en la fracción algal. De cada botella correspondiente a los tratamientos +A se tomaron 30 ml y se filtraron por un filtro Nuclepore<sup>®</sup> de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, que tras dos lavados con 2 ml de agua del lago filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$  (filtros estériles Millex<sup>®</sup>), se introdujo en un vial con líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman) para la lectura de tritio, lo que permitió calcular la tasa de incorporación de timidina en la fracción algal, que sólo puede tener su origen a través de un consumo de bacterias marcadas (Moriarty 1990, Bell 1993).

La cuantificación de la tasa de incorporación de timidina en la fracción bacteriana se llevó a cabo siguiendo dos aproximaciones: (i) protocolo clásico de filtración tras el tratamiento de TCA en frío (5 % c.f.) sobre el agua procedente del filtrado anterior (< 1  $\mu\text{m}$ ), y (ii) protocolo de centrifugación utilizando 5 ml de muestra procedente de los tratamientos (+A) y (-A). En esta aproximación se siguió básicamente el procedimiento descrito por Smith y Azam (1992), aplicado aquí a TdR. Para ello se trató cada muestra con TCA frío (5% c.f.) durante 20' para la extracción de las macromoléculas marcadas; posteriormente se introdujeron 2 ml de cada muestra en los correspondientes viales de centrifuga (Eppendorff), se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10', y a continuación se retiró el sobrenadante por aspiración. El proceso se repitió hasta completar la centrifugación de todo el volumen de cada muestra. Finalmente, se realizaron dos lavados con TCA frío (5%), y tras centrifugar y retirar el sobrenadante se llenaron los viales de centrifuga con líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman), y se introdujeron en viales de centelleo de vidrio que habían sido previamente lavados con acetona. Todas las lecturas de tritio se realizaron en un contador de centelleo Beckman provisto con autocalibración.

Para definir las tasas de incorporación de timidina en los distintos tratamientos y protocolos de análisis proponemos la siguiente nomenclatura:

Método	Tratamiento		Suma
	+A	-A	
Centrifugación	(C+A)	(C-A)	-
Filtración	(F+A)	(F-A)	FT

Nótese que:

- (C+A) representa la tasa de incorporación de timidina en las fracciones algal y bacteriana conjuntamente.
- (C-A) representa la tasa de incorporación de timidina sólo en la fracción bacteriana (en ausencia de mixótrofos).
- (F+A) representa la tasa de incorporación de timidina sólo en la fracción algal.
- (F-A) representa la tasa de incorporación de timidina sólo en la fracción bacteriana (en presencia de mixótrofos).
- FT representa la tasa de incorporación de timidina en las fracciones algal y bacteriana conjuntamente, calculada como suma de (F+A) + (F-A).

La bacterivoría fue estimada como % de producción bacteriana incorporada en la fracción algal (%PBa), calculado como:

$$\%PBa = (F+A) \times (C+A)^{-1} \times 100$$

o bien:

$$\%PBa = (F+A) \times FT^{-1} \times 100$$

### **Análisis estadísticos**

Para analizar la influencia del método utilizado sobre la incorporación de timidina se compararon los valores obtenidos de FT vs. (C+A) mediante ANOVA de 1 vía en cada situación experimental. El impacto de la mixotrofia sobre la comunidad bacteriana se evaluó comparando los valores de (F-A) vs. (C+A) mediante ANOVA de 1 vía en cada situación experimental. El efecto de la ausencia de mixótrofos, de la radiación solar, y de

su interacción sobre la tasa de incorporación de timidina se examinó mediante ANOVA de 2 vías en cada período experimental. Las diferencias entre tratamientos se examinaron mediante análisis de contrastes (LSD) ajustando las probabilidades del análisis al test de Bonferroni (como fue descrito en el Capítulo VII).

Como en los Capítulos anteriores, se verificaron las asunciones requeridas por el ANOVA y los datos se transformaron logarítmicamente cuando estas condiciones no se cumplían.

## RESULTADOS

La comunidad algal potencialmente mixotrófica (crisofíceas + criptofíceas + dinofíceas) constituyó una pequeña fracción del total de la comunidad fitoplanctónica en términos de abundancia y biomasa (Tabla 8-1), mientras que HNF y ciliados no estuvieron significativamente representados.

**Tabla 8-1.** Abundancia y biomasa de los grupos taxonómicos, y proporción de mixótrofos y de fotótrofos de la comunidad algal durante los experimentos de 1999. Crs: crisofíceas, Din: dinoflagelados, Crp: criptofíceas, Cia: cianofíceas, Dia: diatomeas, Clo: clorofíceas, Mix: mixótrofos, Fot: fotótrofos.

Mes	Concepto	Grupos taxonómicos						% Grupos tróficos	
		Crs	Din	Crp	Cia	Dia	Clo	Mix	Fot
Ago	Abundancia (cél ml <sup>-1</sup> )	346	52	0	15	0	2846	12	88
	Biomasa (µg C l <sup>-1</sup> )	0.91	0.39	0	0.03	0	7.26	15	85
Sep	Abundancia (cél ml <sup>-1</sup> )	223	4	6	0	77	860	20	80
	Biomasa (µg C l <sup>-1</sup> )	0.58	0.03	0.07	0	1.41	2.19	16	84

Con independencia del período experimental y del tratamiento de luz, los valores de incorporación de timidina medidos en los tratamientos (C+A) no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.5$ ) con los obtenidos en los tratamientos FT (Figura 8-1).

En todas las situaciones experimentales, la fracción algal (F+A) presentó valores de incorporación de timidina  $> 0$  (Figura 8-2). La fracción de producción bacteriana

incorporada por las algas varió entre 30-36% (Agosto) y 25-37% (Septiembre), aunque el impacto de la mixotrofia sobre la comunidad bacteriana sólo fue significativo en los tratamientos con luz (L) (Tabla 8-2).

La ausencia de mixótrofos, lejos de implicar un incremento en la actividad bacteriana, causó una significativa disminución de la misma (excepto en el tratamiento oscuro de Agosto), particularmente acusada en los tratamientos con luz (L) (Figura 8-3), lo que se reflejó en una interacción sinérgica significativa luz  $\times$  algas (Tabla 8-3).

## DISCUSIÓN

### Aspectos metodológicos

En nuestra aproximación experimental tuvo lugar de forma simultánea el proceso de etiquetado de las bacterias y el consumo de las mismas por los mixótrofos durante el

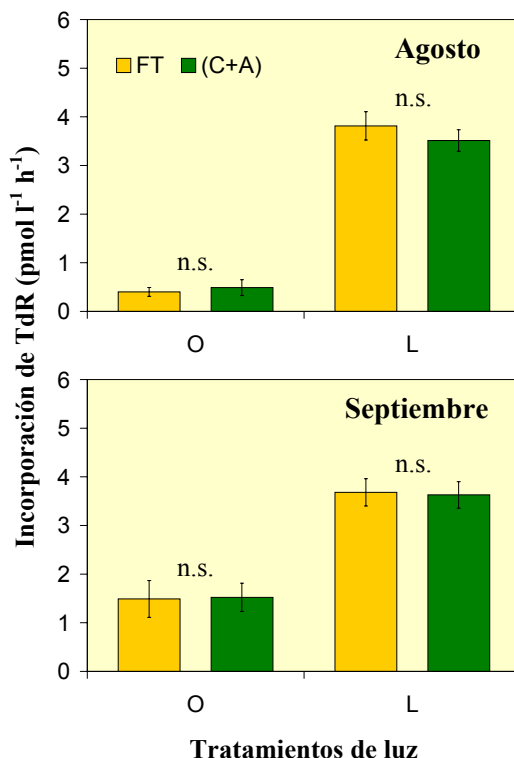
**Tabla 8-2.** Bacterivoría estimada como porcentaje de producción bacteriana incorporada en la fracción algal (%PB<sub>A</sub>) y grado de significación según modelo ANOVA entre (F-A) vs. (C+A) en cada situación experimental (ver material y métodos). Nivel de significación: \*p<0.05, \*\*p<0.01, n.s.: no significativo

Mes	Trat. luz	%PB <sub>A</sub>	p
Ago	Luz (L)	30.5	*
	Oscuro (O)	36.1	n.s.
Sep	Luz (L)	37.2	**
	Oscuro (O)	24.6	n.s.

tiempo de incubación. Por tanto nuestro método, a diferencia de otras técnicas como FLBs (“fluorescently labeled bacteria”) o RLBs (“radio labeled bacteria”) no permite calcular las tasas absolutas de ingestión de bacterias. Además, la potencial subestima del proceso de bacterivoría que supone la simultaneidad del consumo y el etiquetado de las presas se vería ampliamente compensada por el efecto estimulador que la presencia de algas ejerce sobre el crecimiento bacteriano, como muestra la reducción significativa de las tasas de incorporación de timidina en ausencia de las algas (Figura 8-3, Tabla 8-3), consistente con los resultados obtenidos con anterioridad en La Caldera (ver Capítulo VII). Nuestra aproximación experimental permite cuantificar la bacterivoría de potenciales mixótrofos como proporción de producción bacteriana retenida

por la comunidad algal. Consideramos que esta cuantificación es posible porque el tritio incorporado por la fracción algal sólo puede tener su origen en el consumo de bacterias

etiquetadas, dado que las algas eucarióticas carecen de mecanismos de transporte para asimilar timidina externa, y/o de enzimas timidina-kinasas que permitan la utilización metabólica de timidina disuelta externa (Bern 1985, Moriarty 1990, Bell 1993).



**Figura 8-1.** Comparación de la tasa de incorporación de timidina medida en los tratamientos FT vs. (C+A) en condiciones de oscuridad (O) y de radiación solar completa (Q) mediante ANOVA, n.s.: no significativo. Barras de error: medias  $\pm$  DE

Por otro lado en nuestro diseño experimental se utilizaron como trazadores del proceso de bacterivoría a las propias bacterias del lago, vivas y etiquetadas con tritio. Este procedimiento tiene la ventaja de reflejar al máximo las condiciones naturales en cuanto a composición específica, estructura de tamaños y estado fisiológico de las presas, con respecto al uso de FLB ó RLBs. El diseño de este método en nuestro estudio surge como alternativa a otras técnicas más ampliamente utilizadas para evaluar la bacterivoría por flagelados, ya que éstas no nos permitieron una adecuada cuantificación del proceso en nuestro sistema. En relación con esto, ha sido documentado que las técnicas de FLBs o RLBs pueden conllevar a estimas no realistas del proceso de bacterivoría si las tasas de consumo de bacterias etiquetadas no son similares a las de bacterias nativas. En este sentido, distintos estudios evidencian procesos

de consumo selectivo de bacterias vivas frente a FLBs, RLBs o esferas de látex (Sherr et al. 1987, Nygaard et al. 1988, Landry et al. 1991, McManus y Okubo 1991, Monger y Landry 1992, Wetherbee y Andersen 1992, González et al. 1993). Los procesos de selección de presas cobran una importancia cuantitativamente mayor en el caso de los mixótrofos que en el de los flagelados heterotróficos, ya que los primeros suelen presentar tasas de consumo comparativamente más bajas, y además son más selectivos (Tobiesen 1990, Nygaard y Tobiesen 1993). Por otro lado, otros estudios muestran un

efecto de la concentración de partículas presa sobre las tasas de consumo. De este modo, variaciones en la razón FLBs:bacterias nativas pueden afectar a la identificación de bacterívoros con bajas tasas de ingestión de FLBs (ej. criptofceas) y a la cuantificación de estas tasas (McManus y Okubo 1991, Isaksson et al. 1999).

**Tabla 8-3.** Efectos de la radiación solar (1) y de la retirada de las algas (2) sobre la incorporación de TdR según el modelo ANOVA de 2-vías. g1, g2: grados de libertad. PV: Porcentaje de la varianza explicada calculada como suma de cuadrados del tratamiento/suma de total de cuadrados.

Mes	Efecto	g1	g2	F <sub>(g1,g2)</sub>	p	PV
Ago	1	1	8	289.5	<0.0001	34.06
	2	1	8	326.7	<0.0001	38.44
	1×2	1	8	232.7	<0.0001	27.38
	Error					0.12
Sep	1	1	8	84.0	<0.0001	17.12
	2	1	8	329.5	<0.0001	67.15
	1×2	1	8	76.2	<0.0001	15.52
	Error					0.20

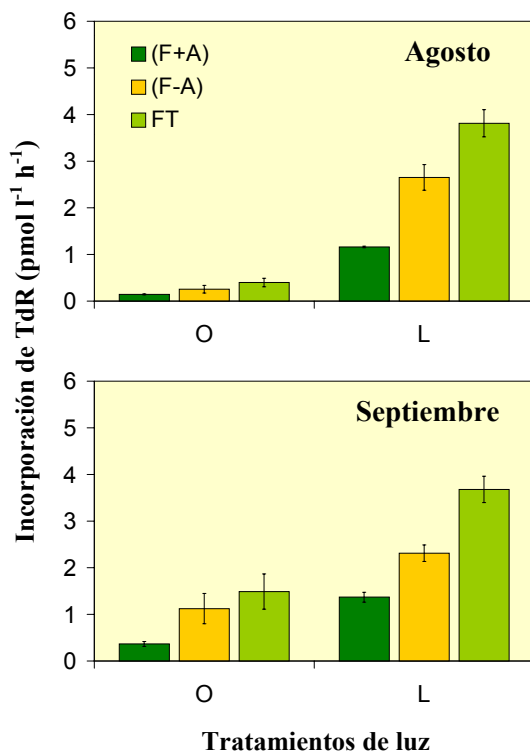
autofluorescencia de la clorofila/ficoeritrina, por lo que el uso de CTC no es aconsejable en la evaluación de la bacterivoría de mixótrofos (Epstein y Rossel 1995).

Finalmente, el uso de TdR en nuestra aproximación experimental cumple los requisitos requeridos en una sustancia trazadora ideal para la evaluación de la bacterivoría: vitalidad, especificidad de “tinción”, sensibilidad de detección y estabilidad temporal (Epstein y Rossel 1995). Sin embargo aún mantiene el “inconveniente” de que la TdR se incorporará principalmente en las bacterias metabólicamente activas, por lo que sólo puede ser estudiada la bacterivoría de esta parte de la comunidad de bacterioplancton, que, no obstante, es la que participa significativamente en el flujo de C. La buena correspondencia entre las dos métodos analíticos utilizados para cuantificar las tasas de incorporación de timidina, esto es, centrifugación y filtración diferencial, y la replicabilidad de los valores obtenidos ofrece una garantía de los resultados obtenidos.

El uso de colorantes vitales para el etiquetado de las bacterias, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Monger y Landry 1992, González et al. 1993) o el cloruro de cianoditolil tetrazolium (CTC) (Epstein y Rossel 1995), que evitan las anteriores desventajas, fue descartado en nuestro estudio; en el caso del FITC, por su inespecificidad (tinción de detritus) y debilidad de tinción cuando se aplica a comunidades naturales de bacterioplancton (Epstein y Rossel 1995); en el caso del CTC, por la coloración roja que da a las bacterias presa, similar a la de la

## Aspectos ecológicos

La comunidad algal de La Caldera pudo consumir una fracción (25-37%) de la producción bacteriana en un período anual en el que los potenciales mixótrofos



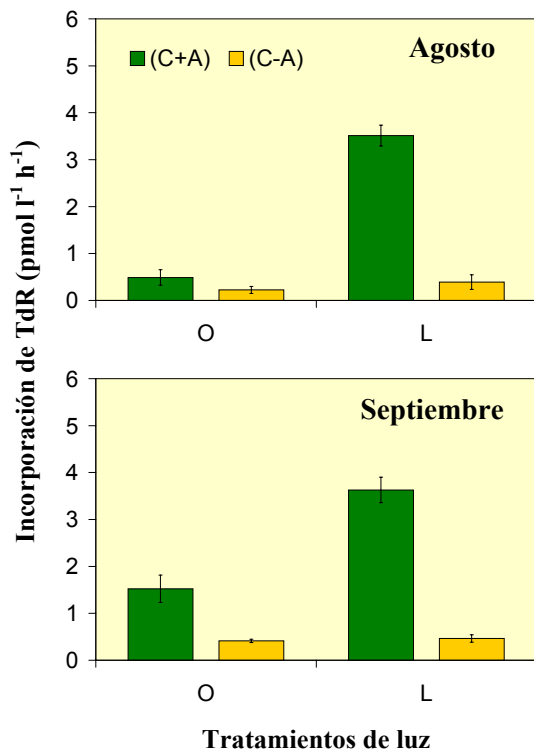
**Figura 8-2.** Tasas de incorporación de timidina medida en los tratamientos (F+A), (F-A) y FT en condiciones de oscuridad (O) y de radiación solar completa (L). Barras de error: medias  $\pm$  DE.

representaron una fracción minoritaria del total de la comunidad fitoplanctónica en términos de abundancia o biomasa (Tabla 8-1), puesto que los fotoautótrofos (fundamentalmente clorofíceas y diatomeas) dominaron la comunidad fitoplanctónica. La contribución de HNFs y ciliados en el consumo de producción bacteriana fue insignificante, dada la práctica ausencia de estas poblaciones durante los experimentos. Asumiendo que los mixótrofos mantengan esta misma capacidad bacterívora en períodos en los que representaron >90% de la biomasa total fitoplanctónica (ej. en 1996, Capítulo III), se puede deducir que el consumo algal de producción bacteriana podría alcanzar valores próximos al 100%. Estos resultados sugieren, por tanto, un fuerte control del bacterioplancton ejercido por los mixótrofos. Otros estudios también

documentan valores de bacterivoría por mixótrofos que superan el 100% de la producción bacteriana en las capas superficiales de ecosistemas marinos (Havskum y Riemann 1996).

Nuestros resultados muestran un impacto más significativo de la bacterivoría en condiciones de luz que en oscuridad (ver también Capítulo VI), en concordancia con los obtenidos por otros autores (Caron et al. 1993, Keller et al. 1994, Li et al. 1999, Li et al. 2000, Isaksson et al. 1999, Urabe et al. 2000). Esta relación directa entre luz y bacterivoría ha sido interpretada como una dependencia de la actividad fotosintética para

obtener los requerimientos energéticos asociados a la fagotrofia (Li et al. 1999). No obstante, otros estudios experimentales no han mostrado diferencias en las tasas de bacterivoría en relación con la intensidad de radiación (Bird y Kalff 1987, Arenovski et al. 1995), o incluso muestran una relación inversa entre la intensidad de radiación y las



**Figura 8-3.** Tasas de incorporación de timidina medida en los tratamientos (C+A) y (C-A) en condiciones de oscuridad (O) y de radiación solar completa (L). Barras de error: medias  $\pm$  DE.

tasas de ingestión de mixótrofos (Skovgaard 1996, Holen 1999). Urabe et al. (2000), que encontraron una mayor tasa de ingestión bacteriana en *Cryptomonas* sp. durante las horas diurnas de un ciclo diario, argumentan razones fisiológicas y estequiométricas para explicar este ciclo diario de actividad fagotrófica. Por un lado, proponen que *Cryptomonas* sp. aprovecharía las horas diurnas para acumular nutrientes por bacterivoría y C orgánico por fotosíntesis, que sería catabolizado durante la noche, cuando suele predominar la síntesis de proteínas, división celular y consumo de carbohidratos de reserva acumulados durante el día (Cuhel et al. 1984, Miyazaki et al. 1987, Gasol et al. 1993), con el consiguiente cese de la asimilación (ingestión). Por otro lado, argumentan que la ingestión de bacterias permitiría equilibrar la composición elemental de las algas, al

incorporar una cantidad significativa de nutrientes minerales en relación con el C. Así durante la noche, al no acumularse C por fotosíntesis, cesaría la bacterivoría y por tanto el coste energético del modo fagotrófico. Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que la bacterivoría también implica un incremento en la incorporación de carbono orgánico (procedente de las bacterias). Así, en las condiciones experimentales en las que un estímulo de la fagotrofia permite explicar las disminuciones de actividad bacteriana encontrada (Capítulo VI), se obtuvieron mayores tasas de excreción de carbono orgánico desde la fracción algal, indicando un posible exceso del mismo en relación con sus



necesidades. Por otro lado, este C extra puede ser utilizado para sufragar el coste energético de la fagotrofia, que además, según Raven (1995, 1997) no es muy elevado.

A partir de las consideraciones anteriores, nosotros proponemos que el estímulo de la fagotrofia bajo condiciones de luz en La Caldera es el resultado de una estrategia adaptativa de algas mixotróficas propias de ecosistemas estresados por la radiación solar, que les permitiría acceder a una fuente de C orgánico y nutrientes minerales (las bacterias). Esta estrategia tendría una particular relevancia en las capas superficiales del ecosistema, donde la inhibición de la producción primaria es máxima (Carrillo et al. 2002) así como, presumiblemente, la incorporación de nutrientes minerales disueltos (Döhler 1992, 1998, Hessen et al. 1995, 1997).

Sin embargo, surge la aparente paradoja de que bacterias dependientes del C fotosintético excretado por las algas (Carrillo et al. 2002, Capítulos IV y VII) sean a su vez fuente de C para las algas. Una posible solución de esta paradoja estribaría en que las bacterias constituyen “paquetes” de C orgánico y nutrientes disponibles para los mixótrofos durante las situaciones más desfavorables para la producción primaria, ya que las bacterias tienen asegurado el suministro de C orgánico en este ecosistema (Carrillo et al. 2002, Capítulo IV). Esta disponibilidad de C orgánico para las bacterias se comprueba en el hecho de que las tasas de EOC fueron significativamente superiores a los requerimientos bacterianos de C algal (CARB) en las condiciones naturales del lago (Capítulo IV), incluso en las condiciones de mayor estrés de radiación solar (tratamientos de cuarzo en las capas superiores, ver Figura 6-9). Además, en estas condiciones, las bacterias continúan asimilando C (y presumiblemente otros nutrientes) y creciendo gracias a sus eficientes mecanismos de reparación del ADN (Carrillo et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2002, Capítulo V). Por tanto, las bacterias se pueden considerar como “almacenes” de C orgánico y nutrientes disponibles para las algas durante las situaciones desfavorables para la producción primaria y el consumo algal de nutrientes disueltos.

### **Consecuencias de la mixotrofia: la estructura de la comunidad pelágica**

El consumo de nutrientes por fagotrofia permite a los mixótrofos ser el grupo dominante de la comunidad fitoplanctónica en sistemas como La Caldera (Capítulo III), donde la disponibilidad de nutrientes inorgánicos disueltos, particularmente P, es baja

(Carrillo et al. 1996 a, Medina-Sánchez et al. 1999), por lo que llegan a desplazar al fitoplancton autotrófico estricto (Isaksson 1998), que es más dependiente de nutrientes inorgánicos disueltos. Sin embargo, los mixótrofos, debido a sus costes metabólicos, presentan tasas de crecimiento fototrófico inferiores a las de los autótrofos obligados, lo que tiene consecuencias en la coexistencia y competencia entre ambos tipos de organismos dependiendo de las condiciones de limitación de nutrientes (Rothhaupt 1996 a, b). Por ello, cuando la disponibilidad de P aumentó en La Caldera (ej. en 1995; en la segunda mitad de 1997, con el incremento del reciclado de P por el zooplancton, Capítulo III) se desarrollaron grupos algales autotróficos como las clorofíceas que, junto con las crisofíceas, llegaron a co-dominar la comunidad fitoplanctónica. Esta variación condujo a una reducción de la fracción mixotrófica en relación con el fitoplancton total. Similares resultados encuentran Jansson et al. (1996) e Isaksson et al. (1999) al incrementarse la abundancia de algas fotoautótrofas en mucha mayor extensión que la de algas mixotróficas tras el enriquecimiento experimental con nutrientes (N + P) en mesocosmos inicialmente dominados por mixótrofos.

Asimismo, los mixótrofos pueden desplazar a los flagelados heterotróficos obligados (HNF), que dependen de una densidad mínima de bacterias para satisfacer sus necesidades de C (Havskum y Riemann 1996). No obstante, el umbral mínimo de abundancia de bacterias para sostener el crecimiento de flagelados heterotróficos varía dependiendo de la especie y de su modo de alimentación. Así, para flagelados heterotróficos que se alimentaron exclusivamente de bacterias cultivadas, Fenchel (1982) documentó que este umbral puede variar entre  $0.5-2 \times 10^6$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ , aunque establece que el crecimiento de HNF deja de estar limitado cuando la abundancia bacteriana excede de  $2 \times 10^6$   $\text{ml}^{-1}$  (Fenchel 1982). Umbrales similares ( $0.5-1 \times 10^6$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ) fueron establecidos por Zubkov y Sleight (1995 a, b) para dos géneros de HNF marinos. En comparación, los flagelados mixotróficos, al combinar bacterivoría con fotosíntesis, pueden medrar con concentraciones de bacterias relativamente más bajas que los HNF, por lo que los primeros tienen ventaja competitiva en esas condiciones. De este modo, Havskum y Riemann (1996) encontraron que los flagelados mixótrofos fueron responsables del 86% de la bacterivoría en las oligotróficas capas superficiales de la Bahía de Aarhus (Dinamarca), donde la abundancia de bacterias ( $9 \times 10^5$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ) fue probablemente insuficiente para mantener el crecimiento de flagelados heterotróficos obligados; asimismo, Jansson et al. (1996), en un sistema distrófico, encuentran un estímulo en la biomasa de flagelados heterotróficos y de bacterias tras un enriquecimiento con nutrientes (N + P) sobre mesocosmos dominados inicialmente por mixótrofos. Todas

estas evidencias pueden explicar la “normal” escasez de flagelados heterotróficos en La Caldera así como su desarrollo durante 1995, coincidiendo con un incremento en la densidad bacteriana ( $2.66 \times 10^6$  cél ml<sup>-1</sup>, Tabla 3-2), consecuencia de una mayor disponibilidad de P, y con la disminución de los mixótrofos frente a algas fotoautótrofas (ver Capítulo III).

Como ya apuntara Thingstad (1996), los mixótrofos pueden explotar de forma ventajosa la situación en la que el fitoplancton proporciona sustratos orgánicos de los que dependen las bacterias, mientras al mismo tiempo las bacterias compiten con las algas por los nutrientes minerales (Currie y Kalff 1984, Bratbak y Thingstad 1985, Güde 1985, Reche et al. 1997, Villar-Argaiz et al. 2002 b). De este modo, cuando la luz es abundante y los nutrientes minerales son escasos, las algas “criarían” a las bacterias alimentándolas con C orgánico disuelto “barato” y “cosecharían” de ellas nutrientes minerales “caros” en una forma empaquetada. Esta idea concuerda con la notable capacidad de acumulación de P mostrada por parte de las algas en La Caldera, así como su capacidad de regular la excreción de C orgánico en función de la disponibilidad de nutrientes (Villar-Argaiz 1999, Villar-Argaiz et al. 2002 b, Carrillo et al. enviado). Estos resultados apuntan hacia una gran complejidad en la interacción alga-bacteria, en la que las algas ejercerían el principal control. En este sentido, está documentada la capacidad de las algas mixotróficas para retener o liberar el P bacteriano (como SRP) dependiendo de su modo de nutrición predominante (autotrófico vs. fagotrófico) y de sus necesidades de nutrientes (Rothhaupt 1996 a, 1997). Este proceso puede constituir otro mecanismo de control del bacterioplancton por parte de las algas que permite modular la competencia con las bacterias por los nutrientes minerales.

Sin embargo, Isaksson et al. (1999), tras estudiar la mixotrofia en un sistema distrófico, argumentan que siendo la fotosíntesis la principal fuente de C para los mixótrofos, mientras que la fagotrofia sólo suplementa sus requerimientos nutricionales, las bacterias se constituyen en controladores de los mixótrofos, ya que éstos nunca pueden reducir la abundancia bacteriana por debajo de un nivel crítico. Por el contrario, nosotros consideramos que, al menos en La Caldera, los mixótrofos serían los organismos que controlan a las bacterias, ya que éstas dependen del C fotosintético (Carrillo et al. 2002, Capítulo V), cuya excreción está en gran medida regulada por las propias algas (Villar-Argaiz 1999, Villar-Argaiz et al. 2002 b); por otro lado, además de su capacidad de ingerir bacterias, principalmente las más grandes y activas (González et al. 1990, Sherr et al. 1992, Sherr y Sherr 1994, Pernthaler et al. 1996), las algas cuentan también con

mecanismos de transporte de membrana para incorporar P disuelto externo (Raven 1997) y además tienen una mayor capacidad de almacenamiento de P (Bergeron y Vincent 1997, Villar-Argaiz 1999). Todo esto se traduce en una ventaja competitiva de las algas mixotróficas, incluso sobre el fitoplancton y picoplancton autótrofo estricto, que explica su gran desarrollo, frente a la exigua abundancia, biomasa y tamaño celular de la fracción bacteriana en La Caldera (Capítulo III). La consecuencia de ello es una potenciación de la cadena de pastoreo frente al bucle microbiano heterotrófico en este ecosistema, según la siguiente secuencia: producción primaria (por mixótrofos) → C orgánico fotosintético disuelto (autóctono) → bacterioplancton → mixótrofos → niveles tróficos superiores, lo que explicaría el escaso desarrollo de dicho bucle frente al zooplancton en La Caldera.

Finalmente, los mixótrofos propios de sistemas de alta montaña no encajarían adecuadamente en ninguno de los cuatro grupos propuestos por Jones (1997), por lo que se podría ampliar la clasificación con un quinto grupo que englobaría a los mixótrofos que son principalmente fototróficos pero que cuentan con la fagotrofia para adquirir tanto nutrientes minerales (particularmente los limitantes) como C orgánico en situaciones de estrés de radiación solar, más que por una limitación de luz.

## SÍNTESIS

---

No debo buscar mi dignidad en el espacio, sino en el gobierno de mi pensamiento. No tendré más aunque posea mundos. Si fuera por el espacio, el universo me rodearía y se me tragaría como un átomo; pero por el pensamiento yo abrazo el mundo.

Blaise Pascal (1623-1662), *Pensées*

La comunidad pelágica de La Caldera se caracteriza por su simplicidad estructural, destacando la ausencia de picoplancton autótrofo y el escaso desarrollo del bacterioplancton, que se manifiesta tanto en parámetros estructurales (biomasa, abundancia, biovolumen celular) como en parámetros funcionales (producción, eficiencia de asimilación de C fotosintético). Asimismo, otros componentes del bucle microbiano (flagelados heterotróficos y ciliados) estuvieron débilmente representados en el sistema. No obstante, éstos experimentaron un significativo desarrollo cuando se incrementó la disponibilidad de P por resuspensión del sedimento asociado a la reducción del volumen de la laguna (en 1995, año de acusada sequía), o cuando la comunidad metazooplanctónica estuvo poco desarrollada, por efecto de una fuerte “dilución” de la laguna debido al incremento del régimen de precipitaciones (1996).

El escaso desarrollo del componente microbiano heterotrófico en relación con el componente autotrófico (alta razón A:H) contrasta con el predominio del componente microheterotrófico establecido en ecosistemas oligotróficos (Azam et al. 1983, del Giorgio et al. 1995, Gasol et al. 1997, Biddanda et al. 2001, Cotner y Biddanda 2002). Por ello, como hipótesis de trabajo nos planteamos evaluar qué efecto ejerce sobre la comunidad bacteriana y su interacción con el fitoplancton la alta intensidad de radiación ultravioleta que incide en el lago, dada su situación geográfica (alta montaña, latitud media) y sus características físico-químicas (aguas claras con baja concentración de DOC). Los resultados experimentales del efecto del espectro de radiación solar sobre el crecimiento bacteriano en presencia de algas mostraron que, sobre una escala interanual, la radiación UVB inhibió el crecimiento bacteriano en las capas superiores del lago; sin embargo las bacterias aprovechan la alta irradiancia de UVA y PAR para activar eficientes mecanismos de fotoreparación que contrarrestan el daño debido a UVB. Este efecto de recuperación se tradujo en las capas superiores en:

- (i) un acusado estímulo del crecimiento bacteriano en ausencia de UVB, si existe disponibilidad de C fotosintético (presencia de algas);
- (ii) un efecto neto estimulador de la radiación solar completa en el periodo central del verano (máxima irradiancia), e inhibidor sólo a finales del período libre de hielo, cuando la composición elemental bacteriana fue deficiente en P, lo que hizo a las bacterias más vulnerables a UVB. Esta vulnerabilidad se suprime si existe una entrada pulsada de P asociado a precipitaciones atmosférica.

Por lo tanto, la comunidad bacteriana está, en general, bien adaptada a la alta radiación solar incidente en el sistema, por lo que ésta no es el principal factor determinante del escaso desarrollo del componente microheterotrófico en La Caldera.

Una más plausible hipótesis que explique este escaso desarrollo reside en el control que la propia comunidad fitoplanctónica ejerce sobre el bacterioplancton. Esta regulación se establece a dos niveles: (A) mediante el suministro de carbono fotosintético excretado por las algas (control por recurso), y (B) a través de la depredación de las bacterias ejercida por el fitoplancton (control por consumidor).

El control mediante el suministro de C fotosintético (A) se establece debido a la dependencia bacteriana de este carbono para satisfacer sus demandas energéticas. En La Caldera, la excreción de C fotosintético fue el principal factor controlador de la producción bacteriana, reflejando una interacción fundamentalmente de naturaleza comensalista con las algas. Esto se evaluó siguiendo dos aproximaciones:

- (1) el estudio de la relación entre las variables implicadas (excreción de C fotosintético; asimilación, eficiencia de asimilación y de uso de este C por las bacterias) en diferentes escalas temporales de análisis;
- (2) la cuantificación experimental del efecto de la retirada de la fracción algal sobre la producción bacteriana en diferentes condiciones de luz.

Siguiendo la primera aproximación y sobre una escala estacional, la excreción de C fue el único factor, de entre otros potenciales factores controladores de actividad bacteriana (biomasa, temperatura, nutrientes limitantes), que explicó la varianza de la producción bacteriana. Sobre una escala diaria, existió una buena correspondencia entre los patrones de variación de la excreción de C y la producción bacteriana, aunque con un desfase de ésta última durante las horas crepusculares. Estos resultados indican que las bacterias respondieron positivamente a los incrementos en la disponibilidad de C orgánico ocurridos en diferentes fases del día, gracias a la actuación de mecanismos de fotoreparación y de reparación oscura.

Siguiendo la segunda aproximación, se infiere que el crecimiento bacteriano depende de la presencia de las algas, cuyo efecto estimulador sobre las bacterias estribó más en ser fuente de C fotosintético que en un efecto fotoprotector. La biodisponibilidad del C orgánico autóctono “viejo” fue escasa, posiblemente debido a su alta fotoreactividad (Reche et al. 2001).

La excreción de C fotosintético (EOC) es un proceso activo que depende directamente de la tasa de producción primaria (como mostró la relación directa entre EOC y PP), pero también está condicionado por la intensidad y calidad de radiación solar que incide sobre las células algales. Así, la radiación ultravioleta, particularmente UVA, causó un incremento tanto en las tasas absolutas como relativas de excreción de C fotosintético dentro de un mismo estrato de la columna de agua. Este resultado, junto con la obtención de máximos valores de %EOC en las capas superiores del lago, indican un fuerte estrés metabólico algal debido a la alta intensidad de radiación ultravioleta.

En efecto, experimentalmente encontramos una intensa inhibición de la producción primaria ejercida fundamentalmente por UVA, lo que generó un consistente patrón de variación vertical y diario de actividad fotosintética. La migración vertical diaria de las especies flageladas del fitoplancton de La Caldera (Carrillo et al. 1991 a) les permitiría, como mecanismo de fotoprotección, evitar parcialmente el daño causado por la radiación UVB. No obstante, este mecanismo sería poco eficaz para UVA en este ecosistema debido a la escasez de potenciales refugios efectivos (escasa profundidad media de la laguna, 4.3 m) y al bajo coeficiente de atenuación vertical de esta región del espectro en La Caldera. Esto puede explicar la ausencia de picoplancton autótrofo, que, por su tamaño, es más sensible a UVR que el nanoplancton (García-Pichel 1994, Bertoni y Callieri 1999, Callieri et al. 2001) y carece de las ventajas adaptativas de éste último relacionadas con su capacidad mixotrófica y de almacenamiento de nutrientes.

Las bacterias asimilaron el C orgánico liberado por las algas en cualquiera de las condiciones experimentales establecidas (valores  $POC_2 > 0$ ). Por otro lado, la similitud del patrón de variación en las capas superiores de la eficiencia de asimilación (%PEA) y de uso (%CUEb) del C fotosintético, así como de la producción bacteriana (PB), evidenciaron la actuación de los mecanismos de fotoreparación. Por tanto, las bacterias de La Caldera estuvieron en condiciones de responder positivamente a los incrementos en la liberación de C fotosintético, que son consecuencia del estrés por UVR o de una producción primaria estimulada (capas más profundas). De este modo, el patrón de variación vertical observado en la PB no fue el resultado de una covariación con la PP debido al gradiente de radiación solar, sino una respuesta bacteriana positiva al incremento de la tasa de excreción de C fotosintético en las capas profundas.

La concordancia entre los resultados obtenidos con las dos diferentes aproximaciones metodológicas utilizadas (incorporación de  $^3\text{H-TdR}$  y asimilación de  $^{14}\text{C}$  orgánico por las bacterias) refuerza nuestras interpretaciones respecto a la respuesta



bacteriana al espectro de radiación solar, e implica que las medidas de PB realizadas bajo condiciones de luz fueron realistas. Los valores de PB obtenidos en condiciones de luz revelaron la extensión de la relación positiva PB-EOC a las capas superiores del lago, donde medidas de PB realizadas en oscuridad, que habían sesgado los valores reales de PB, condujeron a una errónea falta de relación. Gracias a esta innovación metodológica se resuelven las contradicciones obtenidas entre este estudio y los realizados con anterioridad en el sistema con respecto a la relación PP-PB (Reche et al. 1996).

El segundo tipo de control del fitoplancton sobre las bacterias, la depredación (B), ha sido establecido tanto por evidencias indirectas como por resultados experimentales. Entre las primeras destacan: (i) la composición taxonómica del fitoplancton, con predominio de las crisofíceas, potenciales mixótrofos, en los periodos de mayor limitación por P; (ii) la relación inversa entre los parámetros estructurales de fitoplancton y bacterias en 1996, cuando la simplicidad de la comunidad pelágica hizo de este año un auténtico experimento natural; (iii) la ausencia de relación entre producción y biomasa bacteriana, así como entre producción primaria y biomasa algal, particularmente en 1996, con un exiguo desarrollo de herbívoros. Asimismo, evaluamos experimentalmente que la fracción fitoplanctónica es potencialmente capaz de incorporar una parte importante de la producción bacteriana. Los resultados experimentales mostraron que la actividad bacterívora del fitoplancton fue significativa sólo en condiciones de luz. Esto sugiere que la bacterivoría puede constituir una estrategia adaptativa que permite a las algas utilizar a las bacterias como fuentes de nutrientes minerales y C orgánico en condiciones de fotoinhibición de la producción primaria.

De lo anteriormente expuesto surge una situación paradójica (“ni contigo ni sin tí”), ya que bacterias que dependen del C fotosintético son a su vez fuentes de C orgánico para el fitoplancton mixótrofo. Una posible solución de esta paradoja estriba en el hecho de que las bacterias tuvieron asegurado el suministro de C fotosintético en la mayor parte de las condiciones naturales y experimentales establecidas (comparación entre EOC y CARB). De este modo, el estímulo de la fagotrofia en condiciones de luz constituye una vía alternativa de adquisición de C orgánico en condiciones desfavorables para su síntesis autotrófica, lo que implica dos ventajas adicionales: (i) una incorporación de los nutrientes minerales contenidos en las bacterias; (ii) eliminación de eficientes competidores por los nutrientes minerales.

La bacterivoría por parte de los mixótrofos pudo potenciarse, no sólo como respuesta a un régimen de luz fotoinhibidor, sino también en relación con su composición

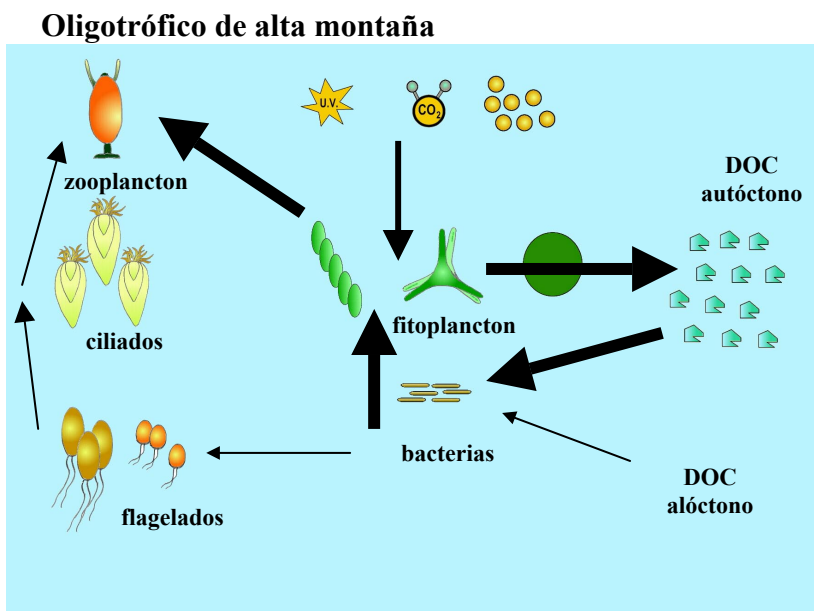
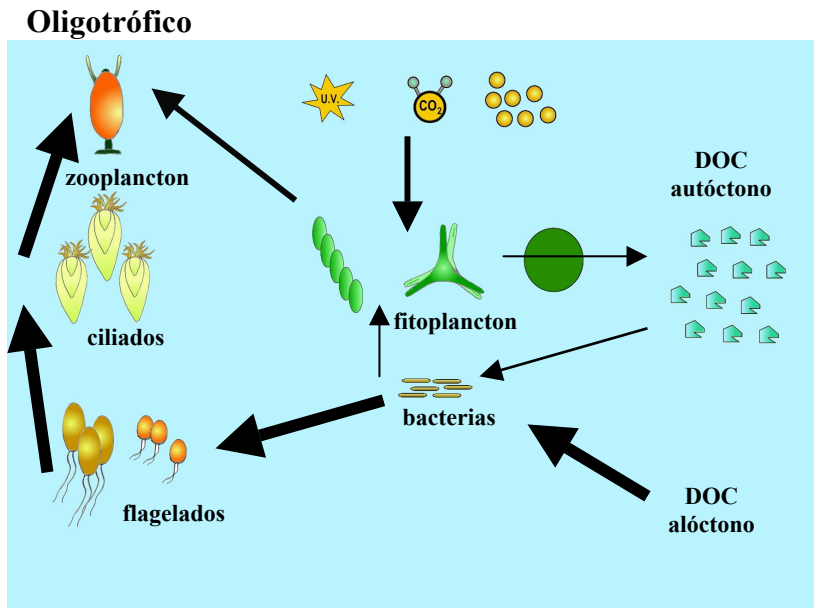
elemental y la disponibilidad de nutrientes minerales limitantes. Así, en un escenario en el que la composición elemental de las algas fue deficiente en P, mientras que la de las bacterias fue más equilibrada, una adición pulsada de P pudo potenciar la capacidad fagotrófica (en condiciones de luz) de los mixótrofos, lo que es evidenciado a partir de dos conjuntos de resultados:

- (i) la disminución del crecimiento bacteriano, a pesar de contar con suficiente P inorgánico y C fotosintético,
- (ii) la disminución de la fijación de C inorgánico y el incremento de la excreción de C orgánico por las algas, que podría ser el resultado de un exceso estequiométrico de C tras la ingestión de bacterias, aunque no es excluyente un ajuste transitorio del metabolismo debido al consumo de P para una ulterior estrategia de crecimiento algal.

En un escenario en el que la composición elemental de las algas fue suficiente en P, mientras que la de las bacterias fue deficiente en P, una adición pulsada de éste no modificó las variables de actividad algal, pero sí el patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar, como consecuencia de procesos simultáneos:

- (i) el estímulo del crecimiento bacteriano en oscuridad y luz completa, que resulta de la supresión del efecto dañino de UVB, y por tanto de su vulnerabilidad;
- (ii) la disminución del crecimiento bacteriano en todas las condiciones de luz, particularmente en las que son menos desfavorables para el consumo algal de P (antagonismo en -UVB, no sinergia en luz solar completa), sugiriendo que la bacterivoría y la interacción competitiva algas-bacterias por el P estuvo modulada por las condiciones de luz.

Los resultados anteriores ponen de manifiesto la existencia de efectos interactivos, generalmente antagonísticos, entre la composición espectral de la radiación solar y el incremento de disponibilidad de nutrientes limitantes sobre las variables respuesta cuando los organismos presentan una composición elemental deficiente en estos nutrientes. Con respecto al fitoplancton, los efectos atenuados de las regiones espectrales tras el enriquecimiento con P pueden ser solo aparentes, al estar condicionados principalmente por ajustes metabólicos. En relación con las bacterias, las interacciones



Modificado de Berman-Frank y Dubinsky (1999)

→ Flujo de C

reflejan una disminución de la vulnerabilidad a UVB, así como el resultado de efectos negativos por competencia o depredación ejercidos por las algas, según el régimen de luz.

Finalmente, la consecuencia del control por mixótrofos sobre las bacterias es establecer un “cortocircuito” del flujo de C, sin el establecimiento de un verdadero bucle microbiano y que determina una potenciación de la cadena de pastoreo (Figura anterior).

## CONCLUSIONES

---

Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitado de inexplicabilidad. Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra.

T. H. Huxley (1825-1895)

## CONCLUSIONES

1. La estructura de la comunidad planctónica experimentó variaciones significativas relacionadas con cambios en el régimen de precipitaciones, alcanzando la mayor complejidad estructural durante el período de sequía y la menor tras el acusado incremento del volumen de la laguna, que determinó una “dilución” de nutrientes y organismos en el ecosistema. Contrariamente a las tendencias establecidas para sistemas oligotróficos, en la laguna de La Caldera existió un escaso desarrollo tanto del bacterioplancton (baja abundancia, producción y pequeño tamaño celular), como de los componentes del bucle microbiano (ciliados y flagelados heterotróficos). El desarrollo de estos últimos fue favorecido por resuspensión de P desde el sedimento (1995, año seco) y por el menor control de depredación cuando el zooplancton estuvo escasamente desarrollado (1996, año húmedo).
2. El bacterioplancton depende del carbono fotosintético excretado activamente por las algas. Esta dependencia, que se evidenció sobre diferentes escalas temporales de análisis (diaria, estacional, interanual) y se cuantificó experimentalmente, constituye la base de una interacción alga-bacteria fundamentalmente comensalista.
3. La alta intensidad de radiación ultravioleta incidente determinó un estrés fisiológico en la fracción algal, manifestado en una inhibición de la producción primaria y un incremento en la tasa absoluta y relativa de excreción de C fotosintético. Las bacterias respondieron positivamente a esta mayor disponibilidad de C dada su adaptación a la radiación solar, determinada por eficientes mecanismos de fotoreparación que, mediados por la radiación UVA y PAR, contrarrestan el daño causado por UVB.

4. El patrón de respuesta bacteriana al espectro de radiación solar fue consistente interanualmente y dependió del C fotosintético excretado por las algas. La respuesta bacteriana a la radiación solar completa, resultado neto de procesos de daño y de recuperación, estuvo relacionada con la composición elemental de las bacterias. Cuando ésta fue deficiente en P, las bacterias fueron más vulnerables a UVB y determinó que la radiación solar completa ejerciera un efecto inhibitor neto sobre el crecimiento bacteriano. Esta vulnerabilidad se suprimió con un incremento en la disponibilidad de P.
  
5. Existieron efectos interactivos, generalmente antagónicos, entre la composición espectral de la radiación solar y el incremento de disponibilidad de nutrientes limitantes sobre la actividad de algas y bacterias cuando presentaron una composición elemental deficiente en estos nutrientes. En el fitoplancton, la atenuación de los efectos de las regiones espectrales de radiación tras el enriquecimiento con P estuvieron condicionados principalmente por ajustes metabólicos. En el caso de las bacterias, las interacciones reflejaron un estímulo de su crecimiento, así como el resultado de efectos negativos por competencia o depredación ejercidos por las algas, según el régimen de luz.
  
6. El fitoplancton ejerció un control de depredación sobre las bacterias como resultado de un metabolismo mixotrófico, lo que fue evidenciado por pruebas indirectas y experimentales. Esto se interpreta como una estrategia adaptativa que permite utilizar a las bacterias como fuente tanto de C orgánico (de origen fotosintético) como de nutrientes minerales limitantes en condiciones desfavorables para la síntesis autotrófica de C y para el consumo de nutrientes (alta intensidad de radiación ultravioleta), a la vez que eliminan a sus competidores por estos nutrientes (las propias bacterias). Este control de depredación puede explicar el escaso desarrollo del componente microheterotrófico en el sistema y la potenciación del flujo de C a través de la cadena de pastoreo.





## BIBLIOGRAFÍA

---

La biblioteca nos conecta con las intuiciones y los conocimientos extraídos penosamente de la naturaleza, de las mayores mentes que hubo jamás, con los mejores maestros, escogidos por todo el planeta y por la totalidad de nuestra historia, a fin de que nos instruyan sin cansarse, y de que nos inspiren para que hagamos nuestra propia contribución al conocimiento colectivo de la especie humana.

Carl Sagan (1934-1996), *Cosmos* (1980)

- Aas P, Lyons MM, Pledger R, Mitchel DL, Jeffrey WH (1996) Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat Microb Ecol* 11:229-238
- Abele-Oeschger D, Tüg H, Röttgers R (1997) Dynamics of UV-driven hydrogen peroxide formation on an intertidal sandflat. *Limnol Oceanogr* 42:1406-1415
- Aguirre-von-Wobeser E, Figueroa FL, Cabello-Pasini A (2001) Photosynthesis and growth of red and green morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) from the Philippines. *Mar Biol* 138:679-686
- Alebicjuretic A (1994) Precipitation chemistry within Kvarner Bay area, Northern Adriatic (Croatia). *Water Air Soil Poll* 78:343-357
- Allredge AL, Passow U, Logan BE (1993) The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Res* 40:1131-1140.
- Altamirano M, Flores-Moya A, Conde F, Figueroa FL (2000) Growth seasonality, photosynthetic pigments, and carbon and nitrogen content in relation to environmental factors: a field study of *Ulva olivascens* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycología* 39:50-58
- American Public Health Association (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater. Franson MA (ed), Port City Press, Baltimore
- Ammerman JW, Fuhrman JA, Hagström A, Azam F (1984) Bacterioplankton growth in seawater. I. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Mar Ecol Prog Ser* 18:31-39
- Ammerman JW, Azam F (1985) Bacterial 5'-nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanisms of phosphorus regeneration. *Science* 227:1338-1340
- Ammerman JW, Azam F (1991) Bacterial 5'-nucleotidase activity in estuarine and coastal marine waters: characterization of enzyme activity. *Limnol Oceanogr* 36:1427-1436
- Amon RMW, Benner R (1996) Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 41:41-51
- Andersen OK, Goldman JC, Caron DA, Dennet MR (1986) Nutrient cycling in a microflagellate food chain: 3. Phosphorus dynamics. *Mar Ecol Prog Ser* 31:47-55
- Andersen P, Fenchel T (1985) Bacterivory by microheterotrophic flagellates in seawater samples. *Limnol Oceanogr* 30:198-202
- Andersen T, Hessen DO (1991) Carbon, nitrogen, and phosphorus-content of fresh-water zooplankton. *Limnol Oceanogr* 36:807-814

- 
- Anderson GC, Zeuschel RP (1970) Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal and offshore areas of the Northeast Pacific Ocean. *Limnol Oceanogr* 15:402-407
- Andersson A, Larsson U, Hagström A (1986) Size-selective grazing by a microflagellate on pelagic bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 33:51-57
- Arenovski AL, Lim EL, Caron DA (1995) Mixotrophic nanoplankton in oligotrophic surface waters of the Sargasso Sea may employ phagotrophy to obtain major nutrients. *J Plankton Res* 17:801-820
- Aristegui J, Montero MF, Ballesteros S, Basterretxea G, van Lenning K (1996) Planktonic primary production and microbial respiration measured by <sup>14</sup>C assimilation and dissolved oxygen changes in coastal waters of the Antarctic Peninsula during austral summer: implications for carbon flux studies. *Mar Ecol Prog Ser* 132:191-201
- Arrigo K (1994) Impact of ozone depletion on phytoplankton growth in the southern ocean: large-scale spatial and temporal variability. *Mar Ecol Prog Ser* 114:1-12
- Avila A, Queraltmitjans I, Alarcón M (1997) Mineralogical composition of African dust delivered by red rains over Northeastern Spain. *J Geophys Res Atmos* 102: 21977-21996
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257-263
- Azam F, Smith DC (1991) Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state: a mechanistic view. In: Demers S (ed) *Particle analysis in Oceanography*. Springer-Verlag, Berlin. p 213-236
- Azam F, Smith DC, Long RA, Steward GF (1995) Bacteria in oceanic carbon cycling as a molecular problem. In: Join I (ed) *Molecular Ecology of aquatic microbes*. NATO ASI Series G, No 38. Springer-Verlag, Berlin, p 39-54
- Azam F (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* 280:694-696
- Baines SB, Pace ML (1991) The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: Patterns across marine and freshwater systems. *Limnol Oceanogr* 36:1078-1090
- Banse K (1992) Grazing, temporal changes of phytoplankton concentrations and the microbial loop in the open sea. In: Falkowski PG, Woodhead AD (eds) *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Plenum-Press. New York. p 409-440

- Baretta-Bekker JG, Riemann B, Baretta JW, Rasmussen EK (1994) Testing the microbial loop concept by comparing mesocosm data with results from a dynamical simulation model. *Mar Ecol Prog Ser* 106:187-198
- Barber J, Andersson B (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 17:61-66
- Beardall J, Raven JA (1990) Pathways and mechanisms of respiration in microalgae. *Mar Microb Food Webs* 4:7-30
- Beardall J, Burger-Wiersma T, Rijkeboer M, Sukenik A, Lemoalle J, Dubinsky Z, Fontvielle D (1994) Studies on enhanced post-illumination respiration in microalgae. *J Plankton Res* 16:1401-1410
- Beardall J, Berman T, Markager S, Martínez R, Montecino V (1997) The effects of ultraviolet radiation on respiration and photosynthesis in two species of microalgae. *Can J Fish Aquat Sci* 54:687-696
- Behrenfeld MJ, Lee H II, Small LF (1994) Interactions between nutritional status and long-term responses to ultraviolet-B radiation stress in a marine diatom. *Mar Biol* 118:523-530
- Behrenfeld MJ, Lean DRS, Lee H II (1995) Ultraviolet-B radiation effects on inorganic nitrogen uptake by natural assemblages of oceanic plankton. *J Phycol* 31:25-36
- Bell RT (1993) Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (eds) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, p 495-503
- Bengis-Garber C (1985) Membrane-bound 5'-nucleotidase in marine luminous bacteria: biochemical and immunological properties. *Can J Microbiol* 31:543-548
- Bengis-Garber C, Kushner DJ (1981) Purification and properties of 5'-nucleotidase from the membrane of *Vibrio costicola*, a moderate halophilic bacterium. *J Bacteriol* 146:24-32
- Bengis-Garber C, Kushner DJ (1982) Role of membrane-bound 5'-nucleotidase in nucleotide uptake by the moderate halophile *Vibrio costicola*. *J Bacteriol* 149:808-815
- Benner R, Pakulski JD, McCarthy M, Hedges JI, Hatcher PG (1992) Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science* 255:1561-1564
- Benner R, Biddanda B (1998) Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter: effects on bacterial growth. *Limnol Oceanogr* 43:1373-1378

- 
- Bennett SJ, Sanders RW, Porter KG (1990) Heterotrophic, autotrophic and mixotrophic nanoflagellates: seasonal abundances and bacterivory in a eutrophic lake. *Limnol Oceanogr* 35:1821-1832
- Bergeron M, Vincent WF (1997) Microbial food web response to phosphorus supply and UV radiation in a subarctic lake. *Aquat Microb Ecol* 12:239-249
- Berman R, Holm-Hansen O (1974) Release of photoassimilated carbon as dissolved organic matter by phytoplankton. *Mar Biol* 28:305-310
- Berman T, Kaplan B (1984) Respiration of Lake Kinneret microplankton measured by carbon loss in the dark. *Ergeb Limnol* 19:157-162
- Berman T, Stone L, Yacobi YZ, Kaplan B, Schlichter M, Nishri A, Pollinger U (1995) Primary production and phytoplankton in Lake Kinneret - A long-term record (1972-1993). *Limnol Oceanogr* 40:1064-1076
- Berman-Frank I, Dubinsky Z (1999) Balanced growth in aquatic plants: myth or reality? *BioScience* 49:29-37
- Bern L (1985) Autoradiographic studies of [*methyl*-<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into a cyanobacterium (*Microcystis wesenbergii*) – bacterium association and in selected algae and bacteria. *Appl Environ Microbiol* 49:232
- Bern L (1987) Zooplankton grazing on [methyl-<sup>3</sup>H]thymidine-labelled natural particle assemblages: determination of filtering rates and food selectivity. *Freshwater Biol* 17:151-159
- Berninger UG, Caron DA, Sanders RW (1992) Mixotrophic algae in three ice-covered lakes of the Pocono Mountains, U.S.A. *Freshwat Biol* 28:263-272
- Bertoni R, Callieri C (1999) Effects of UVB radiation on freshwater autotrophic and heterotrophic picoplankton in a subalpine lake. *J Plankton Res* 21:1373-1388
- Bhattacharya D, Medlin L (1995) The phylogeny of plastids: A review based on comparisons of small subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol* 31:489-498
- Biddanda B, Benner R (1997) Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 42:506-518
- Biddanda B, Ogdahl M, Cotner J (2001) Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnol. Oceanogr.* 46:730-739
- Billen G, Servais P, Becquevort S (1990) Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control? *Hydrobiologia* 207:37-42

- Bird DF, Kalff J (1984) Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters. *Can J Fish Aquat Sci* 41:1015-1023
- Bird DF, Kalff J (1986) Bacterial grazing by planktonic lake algae. *Science* 231:493-494
- Bird DF, Kalff J (1987) Algal phagotrophy: regulating factors and importance relative to photosynthesis in *Dinobryon* (Chrysophyceae). *Limnol Oceanogr* 32:277-284
- Bird DF, Kalff J (1989) Phagotrophic sustenance of a metalimnetic phytoplankton peak. *Limnol Oceanogr* 34:155-162
- Bjørnsen PK (1988) Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it? *Limnol Oceanogr* 33:151-154
- Blumthaler M, Ambach W (1990) Indication of increasing solar ultraviolet-B flux in Alpine regions. *Science* 248:206-208
- Blumthaler M, Ambach W, Rehwald W (1992) Solar UV-A and UV-B radiation fluxes at two alpine stations at different altitudes. *Theor Appl Climatol* 46:39-44
- Boavida MJ, Wetzel RG (1998) Inhibition of phosphatase activity by dissolved humic substances and hydrolytic reactivation by natural ultraviolet light. *Freshwater Biol* 40:285-293
- Boelen P, Karin de Boer M, Kraay GW, Veldhuis MJW, Buma AGJ (2000) UVBR-induced DNA damage in natural marine picoplankton assemblages in the tropical Atlantic Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 193:1-9
- Boelen P, Veldhuis MJW, Buma AGJ (2001) Accumulation and removal of UVBR-induced DNA damage in marine tropical plankton subjected to mixed and simulated non-mixed conditions. *Aquat Microb Ecol* 24:265-274
- Booth MG, Hutchinson L, Brumsted M, Aas P, Coffin RB, Downer RC Jr, Kelley CA, Lyons MM, Pakulski JD, Holder-Sandvik SL, Jeffrey WH, Miller RV (2001) Quantification of *recA* gene expression as an indicator of repair potential in marine bacterioplankton communities of Antarctica. *Aquat Microb Ecol* 24:51-59
- Børsheim KY, Bratbak G (1987) Cell volume to carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from seawater. *Mar Ecol Prog Ser* 36:171-175
- Botrell HH, Duncan A, Gliwicz ZM, Grygierek E, Herzig A, Hillbricht-Ilkowska A, Kurasawa H, Larsson P, Weglenska T (1976) A review of some problems in plankton production studies. *Norw J Zool* 24:419-456.
- Bouvy M, Arfi R, Cecchi P, Corbin D, Pagano M, Saint-Jean L, Thomas S (1998) Trophic coupling between bacterial and phytoplanktonic compartments in shallow tropical reservoirs (Ivory Coast, West Africa). *Aquat Microb Ecol* 15:25-37

- 
- Bratbak G (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl Environ Microbiol* 49:1488-1493
- Bratbak G, Thingstad TF (1985) Phytoplankton-bacteria interactions: an apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. *Mar Ecol Prog Ser* 25:23-30
- Bratbak G, Thingstad TF, Heldal M (1994) Viruses and the microbial loop. *Microb Ecol* 28:209-221
- Bühlman B, Bossard P, Uehlinger U (1987) The influence of longwave ultraviolet radiation (UV-A) on the photosynthetic activity ( $^{14}\text{C}$ -assimilation) of phytoplankton. *J Plankton Res* 9:935-943
- Buma AGJ, Hannen EJV, Roza L, Veldhuis MJW, Gieskes WWC (1995) Monitoring ultraviolet-B induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *J Phycol* 31:314-321
- Buma AGJ, Engelen AH, Gieskes WWC (1997) Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 153:91-97
- Butterwick C, Heaney SI, Talling JF (1982) A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. *Br Phycol Z* 17:69-79
- Button D (1986) Affinity of organisms for substrate. *Limnol Oceanogr* 31:453-456
- Button DK, Robertson BR (1993) Use of high-resolution flow cytometry to determine the activity and distribution of aquatic bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (eds) *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*. CRC Press, Florida
- Caldwell MM, Robberecht R, Billings WD (1980) A steep latitudinal gradient of solar ultraviolet-B radiation in the arctic-alpine life zone. *Ecology* 61:600-611
- Callieri C, Morabito G, Huot Y, Neale PJ, Litchman E (2001) Photosynthetic response of pico- and nanoplanktonic algae to UVB, UVA and PAR in a high mountain lake. *Aquat Sci* 63:286-293
- Carlson CA, Ducklow HW (1996) Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic carbon in the Sargasso Sea. *Aquat Microb Ecol* 10:69-85
- Carlson CA, Bates NR, Hansell DA, Ducklow HW (1999) Estimation of bacterial respiration and growth efficiency in the Ross Sea, Antarctica. *Aquat Microb Ecol* 19:229-244
- Carlson DJ, Brann ML, Mague TH, Mayer LM (1985) Molecular weight distribution of dissolved organic matter in seawater determined by ultrafiltration: a reexamination. *Mar Chem* 16:155-171

- Caron DA (1990) Growth of two species of bacterivorous nanoflagellates in batch and continuous culture, and implications for their planktonic existence. *Mar Microb Food Webs* 4:143-159
- Caron DA, Porter KG, Sanders RW (1990) Carbon, nitrogen and phosphorus budgets for the mixotrophic phytoflagellate *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae) during bacterial ingestion. *Limnol Oceanogr* 35:433-443
- Caron DA, Sanders RW, Lim EL, Marrasé C, Amaral LA, Whitney S, Aoki RB, Porter KG (1993) Light-dependent phagotrophy in the freshwater mixotrophic chrysophyte *Dinobryon cylindricum*. *Microb Ecol* 25:93-111
- Carrillo P (1989) Análisis de las interacciones tróficas en el plancton de un sistema oligotrófico. PhD. Thesis. University of Granada: 212 p
- Carrillo P, Cruz-Pizarro L, Sánchez-Castillo P (1990 a) Analysis of phytoplankton-zooplankton relationships in an oligotrophic lake under natural and manipulated conditions. *Hydrobiologia* 200/201:49-58
- Carrillo P, Cruz-Pizarro L, Morales-Baquero R (1990 b) Effects of unpredictable atmospheric allochthonous input on the light climate of an oligotrophic lake. *Int Ver Theor Angew Limnol Verh* 24:97-101
- Carrillo P, Giussani G (1991) Role of zooplankton in phosphorus regeneration in a small eutrophic lake (L. Candia, N. Italy). *Mem Ist Ital Idrobiol* 52:141-155
- Carrillo P, Sánchez-Castillo P, Cruz-Pizarro L (1991 a) Coincident zooplankton and phytoplankton diel migration in an oligotrophic mountain lake (La Caldera, Sierra Nevada, Spain). *Arch Hydrobiol* 122:57-67
- Carrillo P, Cruz-Pizarro L, Sánchez-Castillo P (1991 b) Aportación al conocimiento del ciclo biológico de *Chromulina nevadensis*. *Acta Bot Malac* 16:19-26
- Carrillo P, Reche I, Sánchez-Castillo P, Cruz-Pizarro L (1995) Direct and indirect effects of grazing on the phytoplankton seasonal succession in an oligotrophic lake. *J Plankton Res* 17:1363-1379
- Carrillo P, Reche I, Cruz-Pizarro L (1996 a) Intraspecific stoichiometric variability and the ratio of nitrogen to phosphorus resupplied by zooplankton. *Freshw Biol* 36:363-374
- Carrillo P, Reche I, Cruz-Pizarro L (1996 b) Quantification of the phosphorus released by zooplankton in an oligotrophic lake (La Caldera, Spain) - Regulating factors and adjustment to theoretical-models. *J Plankton Res* 18:1567-1586
- Carrillo P, Villar-Argaiz M, Medina-Sánchez JM (2001) Relationship between N:P ratio and growth rate during the life cycle of calanoid copepods: An *in situ* measurement. *J Plankton Res* 23:537-547



- 
- Carrillo P, Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M (2002) The interaction of phytoplankton and bacteria in a high mountain lake: importance of the spectral composition of solar radiation. *Limnol Oceanogr* 47:1294-1306
- Carrillo P, Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M (Submitted) Seasonal response of nanoplanktonic community to inorganic P additions at different N:P ratios. *Limnol Oceanogr*
- Chiapello I, Bergametti G, Chatenet B, Bousquet P, Dulac F, Soares ES (1997) Origins of African dust transported over the Northeastern Tropical Atlantic. *J Geophys Res Atmos* 102:13701-13709
- Cho BC, Azam F (1988) Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* 332: 441-443
- Choi JW, Sherr BF, Sherr EB (1999) Dead or alive? A large fraction of ETS-inactive marine bacterioplankton cells, as assessed by reduction of CTC, can become ETS-active with incubation and substrate addition. *Aquat Microb Ecol* 18:105-115
- Chrost RJ (1983) Plankton photosynthesis, extracellular release and bacterial utilization of released dissolved organic carbon (RDOC) in lakes of different trophic. *Acta Microbiol Pol* 32:257-287
- Chróst RJ, Faust MA (1983) Organic carbon release by phytoplankton: its composition and utilization by bacterioplankton. *J Plankton Res* 5:477-493
- Chróst RJ, Faust MA (1999) Consequences of solar radiation on bacterial secondary production and growth rates in subtropical coastal water (Atlantic Coral Reef off Belize, Central America). *Aquat Microb Ecol* 20:39-48
- Chrzanowski TH, Kyle M, Elser JJ, Sterner RW (1996) Element ratios and growth dynamics of bacteria in an oligotrophic Canadian Shield lake. *Aquat Microb Ecol* 11:119-125
- Chrzanowski TH, Grover JP (2001) Effects of mineral nutrients on the growth of bacterio- and phytoplankton in two southern reservoirs. *Limnol Oceanogr* 46:1319-1330
- Clark RB (1992) Plant-like animals and animal-like plants: symbiotic co-evolution of ascoglossan (= sacoglossan) molluscs, their algal prey, and algal plastids. In: Reisser W (ed) *Algae and symbioses*. Biopress, p 515-530
- Cockell CS, Rothschild (1999) The effects of UV radiation A and B on diurnal variation in photosynthesis in three taxonomically and ecologically diverse microbial mats. *Photochem Photobiol* 69:203-210
- Coffin RB, Connolly JP, Harris PS (1993) Availability of dissolved organic carbon to bacterioplankton examined by oxygen utilization. *Mar Ecol Prog Ser* 101:9-22

- Cole JJ (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ann Rev Ecol Syst* 13:291-314
- Cole JJ, Findlay S, Pace ML (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar Ecol Prog Ser* 43:1-10
- Cole JJ, Caraco NF, Likens GE (1990) Short-range atmospheric transport: a significant source of phosphorus to an oligotrophic lake. *Limnol Oceanogr* 35:1230-1237
- Conan P, Turley C, Stutt E, Pujo-Pay M, Van Wambeke F (1999) Relationship between phytoplankton efficiency and the proportion of bacterial production to primary production in the Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol* 17:131-144
- Corzo A, Morillo JA, Rodríguez S (2000) Production of transparent exopolymer particles (TEP) in cultures of *Chaetoceros calcitrans* under nitrogen limitation. *Aquat Microb Ecol* 23:63-72
- Cotner JB, Wetzel RG (1991) 5'-nucleotidase activity in a eutrophic lake and an oligotrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 57:1306-1312
- Cotner JB, Wetzel RG (1992) Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 37:232-243
- Cotner JB, Johengen TH, Biddanda BA (2000) Intense winter heterotrophic production stimulated by benthic resuspension. *Limnol Oceanogr* 45:1672-1676
- Cotner JB, Ogdahl ML, Biddanda BA (2001) Double-stranded DNA measurement in lakes with the fluorescent stain PicoGreen and the application to bacterial bioassays. *Aquat Microb Ecol* 25:65-74
- Cotner JB, Biddanda BA (2002) Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5:105-121
- Cottingham KL, Knight SE, Carpenter SR, Cole JJ, Pace ML, Wagner AE (1997) Response of phytoplankton and bacteria to nutrients and zooplankton: A mesocosm experiment. *J Plankton Res* 19:995-1010
- Coveney MF, Wetzel RG (1988) Experimental evaluation of conversion factors for the [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay of bacterial secondary productivity. *Appl Environ Microbiol* 54:2018-2026
- Coveney MF, Wetzel RG (1992) Effects of nutrients on specific growth rate of bacterioplankton in oligotrophic lake water cultures. *Appl Environ Microbiol* 58:150-156
- Coveney MF, Wetzel RG (1995) Biomass, production, and specific growth rate of bacterioplankton and coupling to phytoplankton in an oligotrophic lake. *Limnol Oceanogr* 40:1187-1200

- 
- Criscuolo CM, Dubinsky Z, Aaronson S (1981) Skeleton shedding in *Peridinium cinctum* from Lake Kinneret – a unique phytoplankton response to nutrient imbalance. In: Shoval H (ed) Developments in arid zone ecology and environmental quality. Balaban Press. Philadelphia, p 169-176
- Crutzen P (1992) Ultraviolet radiation on the increase. *Nature* 356:104-105
- Cruz-Pizarro L (1978) Comparative vertical zonation and diurnal migration among Crustacea and Rotífera in the small high mountain lake La Caldera (Granada, Spain). *Verh int Ver Limnol* 20:1026-1032
- Cruz-Pizarro L (1981 a) Estudio de la comunidad zooplanctónica de un lago de alta montaña (La Caldera, Sierra Nevada, Granada). PhD. University of Granada. 186 p
- Cruz-Pizarro L (1981 b) Biomasa y producción de *Mixodiatomus laciniatus* (Copepoda, Calanoida) en el lago de La Caldera (Sierra Nevada, Granada). In: Prat N (ed) *Actas del Primer Congreso Español de Limnología*, p115-124
- Cruz-Pizarro L, Reche I, Carrillo P (1994) Plankton dynamics in a high-mountain lake (Las-Yeguas, Sierra-Nevada, Spain) - indirect evidence of ciliates as food source of zooplankton. *Hydrobiologia* 274:29-35
- Cuhel RL, Ortner PB, Lean DRS (1984) Night synthesis of protein by algae. *Limnol Oceanogr* 29:731-744
- Cullen JJ, Lewis MR (1988) The kinetics of algal photoadaptation in the context of vertical mixing. *J Plankton Res* 10:1039-1063
- Cullen JJ, Lesser MP (1991) Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as a function of dose and dosage rate: results for a marine diatom. *Mar Biol* 111:183-190
- Cullen JJ, Neale PJ, Lesser MP (1992) Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science* 258:646-649
- Cullen JJ, Neale PJ (1994) Ultraviolet radiation, ozone depletion, and marine photosynthesis. *Photosynth Res* 39:303-320
- Currie DJ, Kalff J (1984) The relative importance of phytoplankton and bacterioplankton in phosphorus uptake in freshwater. *Limnol Oceanogr* 29:311-321
- Currie DJ, Bentzen E, Kalff J (1986) Does algal-bacterial phosphorus partitioning vary among lakes? A comparative study of orthophosphate uptake and alkaline phosphatase activity in freshwater. *Can J Fish Aquat Sci* 43:311-318
- Currie DJ (1990) Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton and phosphorus. *Limnol Oceanogr* 35:1437-1455

- Dancer J, Veith R, Feil R, Komor E, Stitt M (1990) Independent changes of inorganic pyrophosphate and the ATP/ADP or UTP/UDP ratios in plant cell suspension cultures. *Plant Sci* 66:59-63
- Davidson AT, Marchant HJ, de la Mare WK (1996) Natural UVB exposure changes the species composition of Antarctic phytoplankton in mixed culture. *Aquat Microb Ecol* 10:299-305.
- Davidson AT, van der Heijden A (2000) Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 21:257-264
- Davison IR (1991) Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J Phycol* 27:2-8
- De Hoyos C, Aldasoro JJ, Toro M, Comín FA (1998) Specific composition and ecology of chrysophyte flagellates in Lake Sanabria (NW Spain). *Hydrobiologia* 369/370:287-295
- DeBiase AE, Sanders RW, Porter KG (1990) Relative nutritional value of ciliate protozoa and algae as food for *Daphnia*. *Microb Ecol* 19:199-210
- Del Giorgio PA, Gasol JM (1995) Biomass distribution in freshwater plankton communities. *Am Nat* 146:135-152
- Del Giorgio PA, Cole JJ (1998) Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annu Rev Ecol Syst* 29:503-541
- Del Giorgio PA, Cole JJ, Cimleris A (1997) Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature* 385:148-151
- Del Giorgio PA, Peters RH (1993) Balance between phytoplankton production and plankton respiration in lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 50:282-289
- Del Giorgio PA, Peters RH (1994) Patterns in planktonic P:R ratios in lakes: influence of lake trophy and dissolved organic carbon. *Limnol Oceanogr* 39:772-787
- Delille D, Cahet G (1997) Determination of conversion factors for estimation of subantarctic marine bacterial production measured by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation methodology. *Aquat Microb Ecol* 13:121-125
- Döhler G (1988) Effect of UV-B (280-320 nm) radiation on the <sup>15</sup>N-nitrate assimilation of some algae. *Plant Physiol* 7:79-84
- Döhler G (1992) Impact of UV-B radiation on uptake of <sup>15</sup>N-ammonia and <sup>15</sup>N-nitrate by phytoplankton of the Wadden Sea. *Mar Biol* 112:485-489
- Döhler G (1994) UV-effects on the nitrogen metabolism of marine phytoplankton and adaptation to UV radiation. In: Biggs RH, Joyner MEB (eds) *Stratospheric ozone*

- depletion / UV-B radiation in the Biosphere. NATO ASI Series I, Vol 18. Springer-Verlag, Berlin, p 163-174
- Döhler G (1997) Effect of UVB radiation on utilization of inorganic nitrogen by Antarctic microalgae. *Photochem Photobiol* 66:831-836
- Döhler G (1998) Effect of ultraviolet radiation on pigmentation and nitrogen metabolism of Antarctic phytoplankton and ice algae. *J Plant Physiol* 153:603-609
- Donahue WF, Schindler DW, Page SJ, Staiton MP (1998) Acid-induced changes in DOC quality in an experimental whole-lake manipulation. *Environ Sci Tech* 32:2954-2960
- Duarte C, Agustí S, Gasol JM, Vaqué D, Vázquez-Domínguez E (2000) Effects of nutrient supply on the biomass structure on planktonic communities: an experimental test on an Mediterranean coast community. *Mar Ecol Prog Ser* 206:87-95
- Dubinsky Z, Berman T (1979) Seasonal changes in the spectral composition of downwelling irradiance in Lake Kinneret (Israel). *Limnol Oceanogr* 24:652-663
- Dubinsky Z, Polna M (1976) Pigment composition during a *Peridinium* bloom in Lake Kinneret (Israel). *Hydrobiologia* 51:234-243
- Dubinsky Z, Berman-Frank I (2001) Uncoupling primary production from population growth in photosynthesising organisms in aquatic ecosystems. *Aquat Sci* 63:4-17
- Ducklow HW, Purdie DA, Williams PJ LeB, Davies JM (1986) Bacterioplankton: a sink for carbon in a coastal marine plankton community. *Science* 232:865-867
- Ducklow HW (1992) Factors regulating bottom-up control of bacteria biomass in open ocean plankton communities. *Arch Hydrobiol Beih* 37:207-217
- Ducklow HW, Carlson CA (1992) Oceanic bacterial production. *Adv Microb Ecol* 12:113-181
- Ducklow HW, Kirchman DL, Quinby HL (1992) Determination of bacterioplankton growth rates during the North Atlantic spring phytoplankton bloom: cell growth and macromolecular synthesis in seawater cultures. *Microb Ecol* 24:125-144
- Ducklow HW (1994) Modeling the microbial food web. *Microb Ecol* 28:303-319
- Ducklow HW (1999) The bacterial content of the ocean euphotic zone. *FEMS Microbiol Ecol* 30:1-10
- Dufour P, Torrétón JP (1996) Bottom-up and top-down control of bacterioplankton from eutrophic to oligotrophic sites in the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res I* 43:1305-1320
- Dugdale RC, Goering J (1967) Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol Oceanogr* 12:196-206

- Duthie HC, Hart CJ (1987) The phytoplankton of the subarctic Canadian Great Lakes. *Arch Hydrobiol Beih* 25:1-9
- Eloranta P (1989) Scaled chrysophytes (Chrysophyceae and Synurophyceae) from national park lakes in southern and central Finland. *Nord J Bot* 8:671-681
- Eloranta P (1995) Phytoplankton of the national park lakes in central and southern Finland. *Ann Bot Fenn* 32:193-209
- Echevarría F, Carrillo P, Jiménez F, Sánchez-Castillo P, Cruz-Pizarro L, Rodríguez J (1990) The size abundance distribution and taxonomic composition of plankton in an oligotrophic, high mountain lake (La Caldera, Sierra Nevada, Spain). *J Plankton Res* 12:415-422
- Elser JJ, Goldman CR (1991) Zooplankton effects on phytoplankton in lakes of contrasting trophic status. *Limnol Oceanogr* 36:64-90
- Elser JJ, Dobberfuhl DR, Mackay NA, Schampel JH (1996) Organism size, life-history, and N-P stoichiometry. *BioScience* 46:674-684
- Elser JJ, Chrzanowski TH, Sterner RW, Schampel JH, Foster DK (1995 a) Elemental ratios and the uptake and release of nutrients by phytoplankton and bacteria in three lakes of the Canadian Shield. *Microb Ecol* 29:145-162
- Elser JJ, Lubnow FS, Marzolf ER, Brett MT, Dion G, Goldman CR (1995 b) Factors associated with interannual and intraannual variation in nutrient limitation of phytoplankton growth in Castle Lake, California. *Can J Fish Aquat Sci* 52:93-104
- Engel A (2000) The role of transparent exopolymer particles (TEP) in the increase in apparent particles stickness ( $\alpha$ ) during the decline of a diatom bloom. *J Plankton Res* 22:485-497
- Engel A, Goldthwait S, Passow U, Alldredge A (2002) Temporal decoupling of carbon and nitrogen dynamics in a mesocosm diatom bloom. *Limnol Oceanogr* 47:753-761
- Engel A, Passow U (2001) The carbon and nitrogen content of transparent exopolymer particles (TEP) in relation to their Alcian Blue adsorption. *Mar Ecol Prog Ser* 219:1-10
- Eppley RW, Sharp JM (1975) Photosynthetic measurements in the central North Pacific: the dark loss of carbon in 24 h incubations. *Limnol Oceanogr* 20:981-987
- Epstein SS, Rossel J (1995) Methodology of *in situ* grazing experiments: evaluation of a new vital dye for preparation of fluorescently labeled bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 128:143-150

- Fagerbakke KM, Heldal M, Norland S (1996) Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquat Microb Ecol* 10:15-27
- Falkowski PG, Dubinsky Z, Santostefano G (1985) Light-enhanced dark respiration in phytoplankton. *Int Ver Theor Angew Limnol Verh* 22:2830-2833
- Falkowski PG, Raven JA (1997) *Aquatic photosynthesis*. Malden (MA): Blackwell Science
- Felip M, Pace ML, Cole JJ (1996) Regulation of planktonic bacterial growth rates: the effects of temperature and resources. *Microb Ecol* 31:15-28
- Felip M, Camarero L, Catalan J (1999) Temporal changes of microbial assemblages in the ice and snow cover of a high mountain lake. *Limnol Oceanogr* 44:973-987
- Fenchel T, Blackburn TH (1979) *Bacterial and mineral cycling*. Academic Press, New York
- Fenchel T (1982) Ecology of heterotrophic nanoflagellates. II. Bioenergetics and growth. *Mar Ecol Prog Ser* 8:225-231
- Fenchel T (1991) Flagellate design and function. In: Patterson DJ, Larsen J (eds) *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. The Systematics Association, Spec Vol No 45, Clarendon Press, Oxford, p 7-19
- Feudalle M, Dufour PH, Feuillade J, Pelletier JP (1986) Excrétion de carbone organique par le phytoplancton lémanique. *Schweiz Z Hydrol* 48:18-33
- Figueroa FL, Salles S, Aguilera J, Jiménez C, Mercado J, Vinegla B, Flores-Moya A, Altamirano M (1997 a) Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar Ecol Prog Ser* 151:81-90
- Figueroa FL, Niell FX, Figueiras FG, Villarino ML (1997 b) Diel migration of phytoplankton and spectral light field in the Ria de Vigo (NW Spain). *Mar Biol* 130:491-499
- Figueroa FL, Gómez I (2001) Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: A review. *J Appl Phycol* 13:233-245
- Fischer RS, Bonner CA, Theodorou ME, Plaxton WC, Hrazdina G, Jensen RA (1993) Response of aromatic pathway enzymes of plant suspension cells to phosphate limitation. *Biol Med Chem Lett* 3:1415-1420
- Flores-Moya A, Gómez I, Vinegla B, Altamirano M, Pérez-Rodríguez E, Maestre C, Caballero RM, Figueroa FL (1998) Effects of solar radiation on the endemic Mediterranean red alga *Rissoella verruculosa*: photosynthetic performance,

- pigment content and the activities of enzymes related to nutrient uptake. *New Phytol* 139:673-683
- Flynn KJ, Öpik H, Syrett PJ (1986) Localization of the alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase activities of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J Gen Microbiol* 132:289-298
- Folt CL, Chen CY, Moore MV, Burnaford J (1999) Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol Oceanogr* 44:864-877
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995) DNA repair and mutagenesis. AMS Press, Washington, DC
- Friso G, Spetea C, Giacometti GM, Vass I, Barbato R (1994) Degradation of photosystem II reaction center D1-protein induced by UVB radiation in isolated thylacoids. Identification and characterization of C- and N-terminal breakdown products. *Biochim Biophys Acta* 1184:78-84
- Fuhrman JA, Azam F (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar Biol* 66:109-120
- Fuhrman JA, Eppley RW, Hagström A, Azam F (1985) Diel variations in bacterioplankton, phytoplankton, and related parameters in the Southern California Bight. *Mar Ecol Prog Ser* 27:9-20
- García-Álvaro MA, Martínez-Abaigar J, Núñez-Olivera E, Beaucourt N (2000) Element concentrations and enrichment ratios in the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides* along the River Iregua (La Rioja, Northern Spain). *Bryologist* 103:518-533
- García-Pichel F (1994) A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol Oceanogr* 39:1704-1717
- Gasol JM, Vaqué D (1993) Lack of coupling between heterotrophic nanoflagellates and bacteria: a general phenomenon across aquatic systems? *Limnol Oceanogr* 38:657-665
- Gasol JM, García-Cantizano J, Massana R, Guerrero R, Pedrós-Alió R (1993) Physiological ecology of a metalimnetic *Cryptomonas* population: relationship to light, sulfide and nutrients. *J Plankton Res* 15:255-275
- Gasol JM, del Giorgio PA, Duarte CM (1997) Biomass distribution in marine planktonic communities. *Limnol Oceanogr* 42:1353-1363



- Geider RJ (1992) Respiration: Taxation without representation. In: Falkowski PG, Woodhead AD (eds) Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. Plenum Press, New York, p 333-360
- Gifford DJ (1991) The protozoan-metazoan trophic link in pelagic ecosystems. J Protozool 38:81-86
- Gliwicz ZM (1985) Predation of food limitation: an ultimate reason for extinction of planktonic cladoceran species. Arch Hydrobiol 21:419-430
- Goes J, Handa N, Taguchi S, Hama T, Saito H (1996) Metabolism of neutral monosaccharide constituents of storage and structural carbohydrates in natural assemblages of marine phytoplankton exposed to ultraviolet radiation. Limnol Oceanogr 41:1478-1489
- Goldman JC (1984) Conceptual role for microaggregates in pelagic waters. Bull Mar Sci 35:462-476
- Gómez I, Figueroa FL, Sousa-Pinto I, Vinegla B, Pérez-Rodríguez E, Maestre C, Coelho S, Felga A, Pereira R (2001) Effects of UV radiation and temperature on photosynthesis as measured by PAM fluorescence in the red alga *Gelidium pulchellum* (Turner) Kuetzing. Bot Mar 44:9-16
- González JM, Sherr EB, Barry BF (1990) Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. Appl Environ Microbiol 56:583-589
- González JM, Sherr EB, Sherr BF (1993) Differential feeding by marine flagellates on growing versus starving, and on motile versus nonmotile, bacterial prey. Mar Ecol Prog Ser 102:257-267
- González JM (1996) Efficient size-selective bacterivory by phagotrophic nanoflagellates in aquatic ecosystems. Mar Biol 126:785-789
- Grossart HP, Simon M, Logan BE (1997) Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: the significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton, and zooplankton. Limnol Oceanogr 42:1651-1659
- Güde H (1985) Influence of phagotrophic processes on the regeneration of nutrients in two-stage continuous culture systems. Microb Ecol 11:193-204
- Güde H (1988) Direct and indirect influences of crustacean zooplankton on bacterioplankton of Lake Constance. Hydrobiologia 159:63-73
- Guerzoni S, Molinaroli E, Chester R (1997) Saharan dust inputs to the Western Mediterranean Sea – depositional patterns, geochemistry and sedimentological implications. Deep-Sea Res II 44:631-654

- Guieu C, Thomas AJ (1996) Saharan aerosols: from the soil to the ocean. In: Guerzoni S, Chester R (eds) *The impact of desert dust across the Mediterranean*. Kluwer, p 207-216
- Gurung TB, Urabe J, Nakanishi M (1999) Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. *Aquat Microb Ecol* 17:27-35
- Häder DP, Worrest RC (1991) Effects of enhanced solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Photochem Photobiol* 53:717-725
- Häder DP, Worrest RC (1997) Consequences of the effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. In: Häder DP (ed) *The effects of ozone depletion on aquatic ecosystems*. Academic Press, RG Landes Company, U.S.A, p 11-25
- Häder, DP (ed) (1997) *The effects of ozone depletion on aquatic ecosystems*. Academic Press, RG Landes Company, U.S.A
- Halac S, Felip M, Camarero L, Sommaruga-Wögrath S, Psenner R, Catalan J, Sommaruga R (1997) An *in situ* enclosure experiment to test the solar UVB impact on plankton in a high-altitude mountain lake. I. Lack of effect on phytoplankton species composition and growth. *J Plankton Res* 19:1671-1686
- Hall JA, Barrett DP, James MR (1993) The importance of phytoflagellate, heterotrophic flagellate and ciliate grazing on bacteria and picophytoplankton sized prey in a coastal marine environment. *J Plankton Res* 15:1075-1086
- Hansell DA, Carlson CA (1998) Deep-ocean gradients in the concentration of dissolved organic carbon. *Nature* 395:263-266
- Havskum H, Riemann B (1996) Ecological importance of bacterivorous, pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Mar Ecol Prog Ser* 137:251-263
- Healey FP, Hendzel LL (1980) Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Can J Fish Aquat Sci* 37:442-453
- Heber U, Viil J, Neimanis S, Mimura T, Ditz KJ (1989) Photoinhibitory damage to chloroplasts under phosphate deficiency and alleviation of deficiency and damage by photorespiratory reactions. *Z Naturforsch* 44:524-536
- Heichel GH (1970) Prior illumination and the respiration of maize leaves in the dark. *Plant Physiol* 46:359-362
- Helbling EW, Villafañe VE, Ferrario M, Holm-Hansen O (1992) Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar Ecol Prog Ser* 80:89-100

- 
- Helbling EW, Marguet ER, Villafaña VE, Holm-Hansen O (1995) Bacterioplankton viability in Antarctic waters as affected by solar ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 126:293-298
- Helbling EW, Buma AGJ, de Boer MK, Villafaña VE (2001) In situ impact of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and DNA in temperate marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 211:43-49
- Hellebust JA (1965) Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 10:192-206
- Hellebust JA (1974) Extracellular products. In: Steward WDP (ed) *Algal physiology and biochemistry*, Blackwell, Oxford, p 838-863
- Herndl GJ, Müller-Niklas G, Frick J (1993) Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. *Nature* 361:717-719
- Herndl GJ (1997) Role of ultraviolet radiation on bacterioplankton activity. In: *The effects of ozone depletion on aquatic ecosystems* (Ed Häder D.P.), pp 143-150. Academic Press, California.
- Hessen DO, Van Donk E, Andersen T (1995) Growth responses, P-uptake and loss of flagella in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to UV-B. *J Plankton Res* 17:17-27
- Hessen DO, De Lange HJ, Van Donk E (1997) UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshw Biol* 38:513-524
- Hitchman RB, Jones HLJ (2000) The role of mixotrophic protists in the population dynamics of the microbial food web in a small artificial pond. *Freshw Biol* 43:231-241
- Hoch MP, Kirchman DL (1993) Seasonal and interannual variability in bacterial production and biomass in a temperate estuary. *Mar Ecol Prog Ser* 98:283-295
- Holen DA (1999) Effects of prey abundance and light intensity on the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis* from a mesotrophic lake. *Freshw Biol* 42:445-455
- Holm-Hansen O, Helbling EW, Lubin D (1993) Ultraviolet radiation in Antarctica: inhibition of primary production. *Photochem Photobiol* 58:567-570
- Horne AJ, Goldman CR (1994) *Limnology*. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, New York
- Houghton JT, Meira-Filho LG, Callander BA, Harris N, Kattenberg A, Maskell K (1996) IPCC [Intergovernmental Panel of Climate Change]. *Climate Change 1995. The Science of Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, p 572

- Hygum BH, Petersen JW, Søndergaard M (1997) Dissolved organic carbon released by zooplankton grazing activity – a high-quality substrate pool for bacteria. *J Plankton Res* 19:97-111
- Ignatiades L, Fogg GE (1973) Studies on the factors affecting the release of dissolved organic matter by *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve in culture. *J Mar Biol Ass UK* 53:937-956
- Isaksson A (1998) Phagotrophic phytoflagellates in lakes – a literature review. *Arch Hydrobiol* 51:63-90
- Isaksson A, Bergström AK, Blomqvist P, Jansson M (1999) Bacterial grazing by phagotrophic phytoflagellates in a deep humic lake in northern Sweden. *J Plankton Res* 21:247-268
- Iturriaga R, Zsolnay A (1983) Heterotrophic uptake and transformation of phytoplankton extracellular products. *Bot Mar* 26: 375-381.
- Jahnke RA, Craven DB (1995) Quantifying the role of heterotrophic bacteria in the carbon cycle: a need for respiration rate measurements. *Limnol Oceanogr* 40: 436-441
- Jansson M, Blomqvist P, Jonsson A, Bergström AK (1996) Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Öträsket. *Limnol Ocenogr* 41:1552-1559
- Jeffrey WH, Paul JH, Cazares LH, DeFlaun MF, David AW (1990) Correlation of nonspecific macromolecular labelling with environmental parameters during [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation in the waters of southwest Florida. *Microb Ecol* 20:21-35
- Jeffrey WH, Pledger RJ, Aas P, Hager S, Coffin RB, Von Haven R, Mitchell DL (1996a) Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser* 137:283-291
- Jeffrey WH, Aas P, Lyons MM, Coffin RB, Pledger RJ, Mitchell DL (1996b) Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. *Photochem Photobiol* 64:419-427
- Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen* 167:191-194
- Jensen LM (1983) Phytoplankton release of extracellular organic carbon, and bacterial assimilation. *Mar Ecol Prog Ser* 11:39-48
- Jeppesen E, Erlandsen M, Søndergaard M (1997) Can simple empirical equations describe the seasonal dynamics of bacterioplankton in lakes?: An eight-year study

- in shallow hypertrophic and biologically highly dynamic Lake Søbygard, Denmark. *Microb Ecol* 34:11-26
- Jiménez C, Figueroa FL, Salles S, Aguilera J, Mercado J, Vinegla B, Flores-Moya A, Lebert M, Haeder DP (1998) Effects of solar radiation on photosynthesis and photoinhibition in red macrophytes from an intertidal system of Southern Spain. *Bot Mar* 41:329-338
- Jones JC (1979) A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in freshwater. *FBA Scientific Publication N° 39*
- Jones HLJ (1997) A classification of mixotrophic protists based on their behavior. *Freshw Biol* 37:35-43.
- Jumars PA, Penry DL, Baross JA, Perry MJ, Frost BW (1989) Closing the microbial loop: dissolved carbon pathway to heterotrophic bacteria from incomplete ingestion, digestion and absorption in animals. *Deep-Sea Res* 36: 483-495
- Jürgens K (1992) Is there plenty of food for bacterivorous flagellates in eutrophic waters? *Arch Hydrobiol Beih* 37:195-205
- Jürgens K, Gude H (1994) The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar Ecol Prog Ser* 112:169-188
- Jürgens K, Arndt H, Rothhaupt KO (1994) Zooplankton-mediated changes of bacterial community structure. *Microbial Ecol* 27:27-42
- Kaiser E, Herndl GJ (1997) Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. *Appl Environ Microbiol* 63:4026-4031
- Kaltenböck E, Herndl JG (1992) Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the Northern Adriatic Sea. IV. Dissolved nutrients and the autotrophic community associated with marine snow. *Mar Ecol Prog Ser* 87:147-159
- Karentz D, Bothwell ML, Coffin RB, Hanson A, Herndl GJ, Kilham SS, Lesser MP, Lindell M, Moeller RE, Morris DP, Neale PJ, Sanders RW, Weiler CS, Wetzel RG (1994) Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of the working group on bacteria and phytoplankton. *Arch Hydrobiol Beih* 43:31-69
- Karentz D, Cleaver JE, Mitchell DL (1991) Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J Phycol* 27:326-341
- Karner M, Fuhrman JA (1997) Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleotid staining. *Appl Environ Microbiol* 63:1208-1213

- Keller MD, Shapiro LP, Haugen EM, Cucci TL, Sherr EB, Sherr BF (1994) Phagotrophy of fluorescently labeled bacteria by an oceanic phytoplankter. *Microb Ecol* 28:39-52
- Kim DS, Watanabe Y (1993) The effect of long wave ultraviolet radiation (UV-A) on the photosynthetic activity of natural populations of freshwater phytoplankton. *Ecol Res* 8:225-234
- Kim ST, Sancar A (1993) Photochemistry, photophysics, and mechanisms of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Photochem Photobiol* 57:895-904
- Kirchman DL, K'Neas E, Hodson R (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl Environ Microbiol* 49:599-607
- Kirchman DL (1990) Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter in the subarctic pacific. *Mar Ecol Prog Ser* 62:47-54
- Kirchman DL, Suzuki Y, Garside C, Ducklow HW (1991) High turnover rates of dissolved organic carbon during a spring phytoplankton bloom. *Nature* 352:612-614
- Kirchman DL (1992) Incorporation of thymidine and leucine in the subarctic Pacific: application to estimating bacterial production. *Mar Ecol Prog Ser* 82:301-309
- Kirchman DL, Ducklow H (1993) Estimating conversion factors for the thymidine and leucine methods for measuring bacterial production. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (eds) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, p 513-517
- Kirchman DL, Keil RG, Simon M, Welschmeyer NA (1993) Biomass and production of heterotrophic bacterioplankton in the oceanic subarctic Pacific. *Deep-Sea Res* 40:967-988
- Kirchman DL (1994) The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microb Ecol* 28:255-271
- Kisand V, Noges T, Zingel P (1998) Diel dynamics of bacterioplankton activity in eutrophic shallow Lake Vortsjärv, Estonia. *Hydrobiologia* 380:93-102
- Klemer AR, Cullen JJ, Mageau MT, Hanson KM, Sundell RA (1996) Cyanobacterial buoyancy regulation: The paradoxical roles of carbon. *J Phycol* 32:47-55
- Lampert W (1978) Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. *Limnol Oceanogr* 23:831-834
- Lancelot C (1984) Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the southern Bight of the North Sea. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 18:65-77

- 
- Landry MR, Lehner-Fournier JM, Sundstrom JA, Fagerness VL, Selph KE (1991) Discrimination between living and head-killed prey by a marine zooflagellate, *Paraphysomonas vestita* (Stokes). *J Exp Mar Biol Ecol* 146: 139-151.
- Larsson U, Hagström A (1982) Fractionated phytoplankton primary production. Exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar Biol* 16:55-70
- Laurion I, Vincent WF (1998) Cell size versus taxonomic composition as determinants of UV-sensitivity in natural phytoplankton communities. *Limnol Oceanogr* 43:1774-1779
- Laurion I, Lean DRS, Vincent WF (1998) UVB effects on a plankton community: results from a large-scale enclosure assay. *Aquat Microb Ecol* 16:189-198
- Laurion I, Ventura M, Catalan J, Psenner R & Sommaruga R (2000) Attenuation of ultraviolet radiation in mountain lakes: Factors controlling the among- and within-lake variability. *Limnol Oceanogr* 45:1274-1288
- Le J, Wehr JD, Campbell L (1994) Uncoupling of bacterioplankton and phytoplankton production in fresh waters is affected by inorganic nutrient limitation. *Appl Environ Microb* 60:2086-2093
- Lee S, Fuhrman JA (1987) Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 53:1298-1303
- Lepistö L, Rosenström U (1998) The most typical phytoplankton taxa in four types of boreal lakes. In: Alvarez-Cobelas M, Reynolds CS, Sánchez-Castillo P, Kristiansen J (eds) *Phytoplankton and trophic gradients*. *Hydrobiologia* 369/370: 89-97.
- Lesser MP, Cullen JJ, Neale PJ (1994) Carbon uptake in a marine diatom during acute exposure to ultraviolet B radiation: relative importance of damage and repair. *J Phycol* 30:183-192
- Lewitus AJ, Caron DA (1991) Physiological responses of phytoflagellates to dissolved organic substrate additions. 1. Dominant role of heterotrophic nutrition in *Poerioochromnas malhamensis* (Chrysophyceae). *Plant Cell Physiol* 32:671-680
- Li AS, Stoecker DK, Adolf JE (1999) Feeding, pigmentation, photosynthesis and growth of the mixotrophic dinoflagellate *Gyrodinium galatheanum*. *Aquat Microb Ecol* 19:163-176.
- Li AS, Stoecker DK, Coats DW (2000) Mixotrophy in *Gyrodinium galatheanum* (Dinophyceae): Grazing responses to light intensity and inorganic nutrients. *J Phycol* 36:33-45

- Lignell R (1990a) Excretion of organic carbon by phytoplankton: its relation to algal biomass, primary productivity and bacterial secondary productivity in the Baltic Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 68:85-99
- Lignell R (1990b) Algal exudation and its relation to bacterial production during vernal phytoplankton blooms. *Arch Hydrobiol* 34:53-59
- Lignell R (1992) Problems in filtration fractionation of  $^{14}\text{C}$  primary productivity samples. *Limnol Oceanogr* 37:172-178
- Lindell MJ, Granéli W, Tranvik LJ (1995) Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 40:195-199
- Logan BE, Passow U, Alldredge AL, Grossart HP, Simon M (1995) Rapid formation and sedimentation of large aggregates is predictable from coagulation rates (half-lives) of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Res II* 42:203-214
- Löye-Pilot MD, Martin JM, Morelli J (1986) Influence of Saharan dust on the rain acidity and atmospheric input to the Mediterranean. *Nature* 321:427-428
- Mague TH, Friberg E, Hughes DJ, Morris I (1980) Extracellular release of carbon by marine phytoplankton: a physiological approach. *Limnol Oceanogr* 25:262-279
- Malinsky-Rushansky NZ, Legrand C (1996) Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. *Mar Ecol Prog Ser* 132:249-255
- Margalef R (1969) Counting. In: Vollenweider R (ed.). *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*. I.B.P. No 12. Blackwell. Oxford, p 213
- Margalef R (1995) *Ecología*. Omega. 8ª Edición. Barcelona. España.
- Mari X, Kjørboe T (1996) Abundance, size distribution and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) during spring in the Kattegat. *J Plankton Res* 18:969-986
- Markager S, Hansen B, Søndergaard M (1994) Pelagic carbon metabolism in a eutrophic lake during a clear-water phase. *J Plankton Res* 16:1247-1267
- Markager S, Vincent WF, Tang EPY (1999) Carbon fixation by phytoplankton in high Arctic lakes: Implications of low temperature for photosynthesis. *Limnol Oceanogr* 44:597-607
- Marsh P, Lesack LFW (1996) The hydrologic regime of perched lakes in the Mackenzie Delta: potential responses to climate change. *Limnol Oceanogr* 41:849-856
- Martínez R (1977) Phytoplankton species, biomass, and diversity in lake La Caldera (S. Nevada). *Acta Hydrobiol* 19:95-107



- 
- Massana R, García-Cantizano J, Pedrós-Alió C (1996) Components, structure and fluxes of the microbial food web in a small, stratified lake. *Aquat Microb Ecol* 11:279-288
- Maurin N, Amblard C, Bourdier G (1997) Phytoplanktonic excretion and bacterial reassimilation in an oligomesotrophic lake: molecular weight fractionation. *J Plankton Res* 19:1045-1068
- McManus GB, Fuhrman JA (1986) Bacterivory in seawater studied with the use of inert fluorescent particles. *Limnol Oceanogr* 31:420-426
- McManus GB, Okubo A (1991) On the use of surrogate food particles to measure protistan ingestion. *Limnol Oceanogr* 36:613-617
- Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M, Sánchez-Castillo P, Cruz-Pizarro L, Carrillo P (1999) Structure changes in a planktonic food web: biotic and abiotic controls. *J Limnol* 58:213-222
- Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M, Carrillo P (2002) Modulation of the bacterial response to spectral solar radiation by algae and limiting nutrients. *Freshw Biol* (en prensa)
- Meyer-Reil LA (1978) Autoradiography and epifluorescence microscopy combined for the determination of number and spectrum of actively metabolizing bacteria in natural waters. *Appl Environ Microbiol* 36: 506-512
- Migon C, Sandroni V (1999) Phosphorus in rainwater: partitioning inputs and impact on the surface coastal ocean. *Limnol Oceanogr* 44:1160-1165
- Miller RV, Kojohn TA (1990) General microbiology of *recA*: environmental and evolutionary significance. *Annu Rev Microbiol* 44:365-394
- Miller RV (2000) *recA*: the gene and its protein product. In: Luria S (ed) *Encyclopedia of microbiology*, 2<sup>nd</sup> edn, Vol 4. Academic Press, San Diego, p 43-45
- Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49:805-819
- Miyazaki T, Suyama H, Uotani H (1987) Diel changes of uptake of inorganic carbon and nitrogen by phytoplankton, and the relationship between inorganic carbon and nitrogen uptake in Lake Nakanuma, Japan. *J Plankton Res* 9:513-524
- Moeller RE (1994) Contribution of ultraviolet radiation (UV-A, UV-B) to photoinhibition of epilimnetic phytoplankton in lakes of differing UV transparency. *Arch. Hydrobiol* 43:157-170
- Möller H, Geller W (1993) Maximum growth rates of aquatic ciliated protozoa: the dependence on body size and temperature reconsidered. *Arch Hydrobiol* 126:315-327

- Monger BC, Landry MR (1992) Size-selective grazing by heterotrophic nanoflagellates: an analysis using live-stained bacteria and dual-beam flow cytometry. *Arch Hydrobiol Beih* 37:173-185
- Monod J (1950) La technique de culture continue. Theorie et application. *Ann Inst Pasteur* 79:390-410
- Mopper K, Zhou X (1990) Hydroxyl radical photoproduction in the sea and its potential impact on marine processes. *Science* 250:661-664
- Morales-Baquero R, Carrillo P, Reche I, Sánchez-Castillo P (1999) Nitrogen-phosphorus relationship in high mountain lakes: effects of the size of catchment basins. *Can J Fish Aquat Sci* 56:1809-1817
- Moran MA, Zepp RG (1997) Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 42:1307-1316
- Moriarty DJW (1990) Techniques for estimating bacterial growth rates and production of biomass in aquatic environments. In: Grigorova R, Norris JR (eds) *Methods in microbiology*. Academic Press, London. Volume 22
- Morris DP, Lewis WM Jr (1988) Phytoplankton nutrient limitation in Colorado mountain lakes. *Freshw Biol* 20:315-327
- Morris DP, Lewis Jr WM (1992) Nutrient limitation of bacteria and phytoplankton growth in Lake Dillon, Colorado. *Limnol Oceanogr* 37:1179-1192
- Morris DP, Zagarese H, Williamson CE, Balseiro EG, Hargreaves BR, Modenutti B, Moeller R, Queimalinos C (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol Oceanogr* 40:1381-1391
- Moulin C, Guillard F, Dulac F, Lambert CE (1997 a) Long-term daily monitoring of Saharan dust load over ocean using Meteosat Isccp-B2 data. 1. Methodology and preliminary results for 1983-1994 in the Mediterranean. *J Geophys Res Atmos* 102:16947-16958
- Moulin C, Lambert CE, Dulac F, Dayan U. (1997 b) Control of atmospheric export of dust from North-Africa by the North-Atlantic oscillation. *Nature* 387:691-694
- Müller-Niklas G, Heissenberger A, Puskaric S, Herndl GJ (1995) Ultraviolet-B radiation and bacterial metabolism in coastal waters. *Aquat Microb Ecol* 9:111-116
- Murphy J, Riley JP (1962) A modified single solution methods for the determination of phosphate in natural waters. *Annal Chim Acta* 27:31-36
- Murray AG (1995) Phytoplankton exudation: exploitation of the microbial loop as a defense against algal viruses. *J Plankton Res* 17:1079-1094

- Murray RE, Hodson RE (1985) Annual cycle of bacterial secondary production in five aquatic habitats of the Okefenokee Swamp ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 49:650-655
- Myklestad S (1977) Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N:P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J Exp Mar Ecol* 29:161-179
- Nagata T (1986) Carbon and nitrogen content of natural planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 52:28-32
- Nalewajko C, Schindler DW (1976) Primary production, extracellular release, and heterotrophy in two lakes in the ELA, Northwestern Ontario. *J Fish Res Bd Can* 33:219-226.
- Natr L (1992) Mineral nutrients – a ubiquitous stress factor for photosynthesis. *Photosynthetica* 27:271-294
- Neale PJ, Richerson PJ (1987) Photoinhibition and the diurnal variation of phytoplankton photosynthesis. I. Development of a photosynthesis – irradiance model from studies of in situ responses. *J Plankton Res* 9:166-193
- Neale PJ, Cullen JJ, Lesser MP, Melis A (1993) Physiological bases for detecting and predicting photoinhibition of aquatic photosynthesis by PAR and UV radiation. In: Yamamoto HY, Smith CM (eds) *Photosynthetic Responses to the Environment*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, p 61-77
- Neale PJ, Litchman E, Sobrino C, Callieri C, Morabito G, Montecino V, Huot Y, Bossard P, Lehmann C, Steiner D (2001) Quantifying the response of phytoplankton photosynthesis to ultraviolet radiation: Biological weighting functions versus *in situ* measurements in two Swiss lakes. *Aquat Sci* 63:265-285
- Neill WE (1988) Complex interactions in oligotrophic lake food webs: responses to nutrient enrichment. In: Carpenter SR (ed.) *Complex interactions in lake communities*. Springer-Verlag. New York
- Nielsen T, Bjorn LO, Ekelund NGA (1995) Impact of natural and artificial UVB radiation on motility and growth-rate of marine dinoflagellates. *J Photochem Photobiol B-Biol* 27:73-79
- Norland S (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (eds) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, p 303-307

- Núñez-Olivera E, García-Álvaro MA, Beaucourt N, Martínez-Abaigar J (2001) Changes in element concentrations in aquatic bryophytes over an annual cycle. *Archiv für Hydrobiologie* 152:253-277
- Nygaard K, Børsheim KY, Thingstad TF (1988) Grazing rates on bacteria by marine heterotrophic microflagellates compared to uptake rates of bacterial-sized monodisperse fluorescent latex beads. *Mar Ecol Prog Ser* 44:159-165
- Nygaard K, Tobiesen A (1993) Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol Oceanogr* 38:273-279
- Obernosterer I, Herndl GJ (1995) Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. *Mar Ecol Prog Ser* 116:247-257
- Obernosterer I, Reitner B, Herndl GJ (1999) Contrasting effects of solar radiation on dissolved organic matter and its bioavailability to marine bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 44:1645-1654
- Obernosterer I, Herndl GJ (2000) Differences in optical and biological reactivity of the humic and nonhumic dissolved organic carbon component in two contrasting coastal marine environments. *Limnol Oceanogr* 45:1120-1129
- Obernosterer I, Sempéré R, Herndl GJ (2001) Ultraviolet radiation induces reversal of the bioavailability of DOM to marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 24:61-68
- Ochs CA, Cole JJ, Likens GE. 1995. Population-dynamics of bacterioplankton in an oligotrophic lake. *J Plankton Res* 17:365-391
- Olsen LM, Reinertsen H, Vadstein O (2002) Can phosphorus limitation inhibit dissolved organic carbon consumption in aquatic microbial food webs? A study of three food web structures in microcosms. *Microb Ecol* 43:353-366
- Pace ML, Porter KG, Feig YS (1983) Species- and age-specific differences in bacterial resource utilization by two co-occurring cladocerans. *Ecology* 64:1145-1156
- Pace ML, Cole JJ (1994 a) Primary and bacterial production in lakes: are they coupled over depth? *J Plankton Res* 16:661-672
- Pace ML, Cole JJ (1994 b) Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microb Ecol* 28:181-193
- Packard TT (1985) Measurements of electron transport activity of microplankton. *Adv Aquat Microbiol* 3:207-261
- Palmer JD, Delwiche (1996) Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc Natl Acad Sci* 93:7423-7435
- Passow U (2000) Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material. *Mar Ecol Prog Ser* 192:1-11

- Pausz C, Herndl GJ (1999) Role of ultraviolet radiation on phytoplankton extracellular release and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 18:85-93
- Peak MJ, Peak GJ (1989) Solar-ultraviolet induced damage to DNA. *Photodermatology* 6:1-15
- Pedrés-Alió C, Brock TD (1983) The impact of zooplankton feeding on the epilimnetic bacteria of a eutrophic lake. *Freshwater Biol* 13:227-239
- Pedrés-Alió C, Newell SY (1989) Microautoradiographic study of thymidine uptake in brackish waters around Sapelo Island, Georgia, USA. *Mar Ecol Prog Ser* 55:83-94
- Pedrés-Alió C, Calderón-Paz JI, Guixa-Boixereu N, Estrada M, Gasol JM (1999) Bacterioplankton and phytoplankton biomass and production during summer stratification in the northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res I* 46:985-1019
- Peduzzi P, Herndl GJ (1992) Zooplankton activity fueling the microbial loop - differential growth-response of bacteria from oligotrophic and eutrophic waters. *Limnol Oceanogr* 37:1087-1092
- Pérez-Martínez C, Cruz-Pizarro L (1995) Species-specific phytoplankton responses to nutrients and zooplankton manipulations in enclosure experiments. *Freshw Biol* 33:193-203
- Pérez-Martínez C, Sánchez-Castillo P (2001) Temporal occurrence of *Ceratium hirundinella* in Spanish reservoirs. *Hydrobiologia* 452:101-107
- Pérez-Martínez C, Sánchez-Castillo P (2002) Winter population of *Ceratium hirundinella* in a south yemperate reservoir. *J. Plankton Res* (in press)
- Pernthaler J, Sattler B, Simek K, Schwarzenbacher A, Psenner R (1996) Top-down effects on the size-biomass distribution of a fresh-water bacterioplankton community. *Aquat Microb Ecol* 10:255-263
- Perry KD, Cahill TA, Eldred RA, Dutcher DD, Gill TE (1997) Long-range transport of North-African dust to the Eastern United-States. *J Geophys Res Atmos* 102:11225-11238
- Peterson BJ, Hobbie JE, Haney JF (1978) Daphnia grazing on natural bacteria. *Limnol Oceanogr* 23:1039-1044
- Petit M, Alves GP, Lavandier P (1999) Phytoplanktonic exudation, bacterial reassimilation and production for three diel cycles in different trophic conditions. *Arch Hydrobiol* 146:285-309
- Plaxton WC (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:185-214

- Plaxton WC, Carswell MC (1999) Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. In: Lerner HR (ed.) Plant responses to environmental stresses. Marcel Dekker, Inc. New York, p 349-372
- Pomeroy LR (1974) The ocean's food web: a changing paradigm *BioScience* 24: 499-504
- Porter KG, Pace ML, Battey JF (1979) Ciliate protozoans as links in freshwater planktonic food chains. *Nature* 277:563-565
- Porter KG, Feig YS (1980) Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25:943-948
- Porter KG (1988) Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia* 159:89-97
- Porter KG (1996) Integrating the microbial loop and the classic food chain into a realistic planktonic food web. In: Polis GA, Winemiller KO (eds) Food webs, interaction of patterns and dynamics. Chapman & Hall, New York, p 72-80
- Psenner R (1990) From image analysis to chemical analysis of bacteria: a long-term study? *Limnol Oceanogr* 35:234-237
- Psenner R, Zapf F (1990) High mountain lakes in the Alps: peculiarities and biology. In: Johannessen M, Mosello R, Barth H (eds) Acidification processes in remote mountain lakes. Air pollution research report 20. Commission of the European Communities, Brussels, p 22-37
- Psenner R, Sommaruga R (1992) Are rapid changes in bacterial biomass caused by shifts from top-down to bottom-up control? *Limnol Oceanogr* 37:1092-1100
- Psenner R (1999) Living in a dusty world – Airborne dust as a key factor for Alpine Lakes. *Water Air Soil Poll* 112:217-227
- Putt M, Stoecker DK (1989) An experimentally determined carbon:volume ratio for marine “oligotrichous” ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnol Oceanogr* 34:1097-1103
- Quesada A, Mouget JL, Vincent WF (1995) Growth of Antarctic cyanobacteria under ultraviolet radiation: UVA counteracts UVB inhibition. *J Phycol* 31:242-248
- Quesada A, Vincent WF (1997) Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *Eur J Phycol* 32:335-342
- Quesada A, Vincent WF, Lean DRS (1999) Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds. *FEMS Microbiol Ecol* 28:315-323
- Raven JA (1984) Energetics and transport in aquatic plants. Alan R. Liss, New York

- 
- Raven JA (1995) Comparative aspects of chrysophyte nutrition with emphasis on carbon, phosphorus and nitrogen. In: Sandgren CD et al. (eds) Chrysophyte algae: ecology, phylogeny and development. Cambridge, p 95-118
- Raven JA (1997) Phagotrophy in phototrophs. *Limnol Oceanogr* 42:198-205
- Reche I, Sánchez-Castillo P, Carrillo P (1994) The principal regulating mechanism on the structure of the phytoplankton community in a high-mountain lake. *Arch Hydrobiol* 130:163-178
- Reche I (1995) Análisis de las conexiones entre el flujo de carbono y el reciclado de nutrientes en un sistema oligotrófico. PhD Thesis, University of Granada, Spain, 186 p
- Reche I, Pugnetti A, Cruz-Pizarro L, Carrillo P (1996) Relationship between bacteria and phytoplankton in a high-mountain lake: Importance of the organic carbon released by pelagic algae for bacterioplankton. *Arch Hydrobiol* 48:31-38
- Reche I, Carrillo P, Cruz-Pizarro L (1997) Influence of metazooplankton on interactions of bacteria and phytoplankton in an oligotrophic lake. *J Plankton Res* 19:631-646
- Reche I, Pace ML, Cole JJ (1998) Interactions of photobleaching and inorganic nutrients in determining bacterial growth on coloured dissolved organic carbon. *Microb Ecol* 36:270-280
- Reche I, Pulido-Villena E, Conde-Porcuna JM, Carrillo P (2001) Photoreactivity of dissolved organic matter from high mountain lakes of Sierra Nevada (Spain). *Arct Antarct Alp Res* 33:426-434
- Redfield AC (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *Am Sci* 46:205-221
- Redfield AC, Ketchum BH, Richard FA (1963) The influence of organisms on the composition of sea-water. In: Hill MN (ed) *The Sea*. Wiley Interscience, New York, p 26-77
- Reichardt W, Overbeck J, Steubing L (1967) Free dissolved enzymes in lake waters. *Nature* 216:1345-1347
- Renger G, Völker M, Eckert HJ, Fromme R, Hohm-Veit S, Graber P (1989) On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B irradiation. *Photochem Photobiol* 49:97-105
- Reynolds CS (1984) *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge, 384 p
- Reynolds CS (1989) Physical determinants of phytoplankton succession. In: Sommer U (ed) *Plankton Ecology. Succession in plankton communities*. Springer-Verlag

- Reynolds CS (1990) Temporal scales of variability in pelagic environments and the responses of phytoplankton. *Freshwater Biol* 23: 25-53
- Reynolds CS (1992) Eutrophication and the management of planktonic algae: what Vollenweider couldn't tell us. In: Sutcliffe DW, Jones JG (eds) *Eutrophication: research and application to water supply*. Freshwater Biological Association, Ambleside, pp 4-29
- Reynolds CS (1998) What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status. In: Alvarez-Cobelas M, Reynolds CS, Sánchez-Castillo P, Kristiansen J (eds) *Phytoplankton and trophic gradients*. *Hydrobiologia* 369/370:11-26
- Reynolds CS, Bellinger EG (1992) Patterns of abundance and dominance of the phytoplankton of Rostherne Mere, England - evidence from an 18-year data set. *Aquat Sci* 54:10-36
- Rheinheimer G (1992) *Aquatic microbiology*, 4<sup>th</sup> ed. Wiley
- Riemann B, Søndergaard M (1984) Measurements of diel rates of bacterial secondary production in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 47:632-638
- Riemann B, Bjørsen PK, Newell S, Fallon R (1987) Calculation of cell production of coastal marine bacteria based on measured incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine. *Limnol Oceanogr* 32:471-476
- Riemann B, Bell RT (1990) Advances in estimating bacterial biomass and growth in aquatic systems. *Arch Hydrobiol* 118:385-422
- Rivkin RB, Anderson MR, Lajzerovicz C (1996) Microbial processes in cold oceans. I. Relationship between temperature and bacterial growth rate. *Aquat Microb Ecol* 10:243-254
- Rivkin RB, Anderson MR (1997) Inorganic nutrient limitation of oceanic bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 42:730-740
- Roberts RD, Wicks RJ, Sephton LM (1986) Spatial and temporal variations in bacterial macromolecule labelling with (methyl-<sup>3</sup>H) thymidine in a hypertrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 52:1368-1373
- Roberts EC, Laybourn-Parry J (1999) Mixotrophic cryptophytes and their predators in the Dry Valley lakes of Antarctica. *Freshw Biol* 41:737-746
- Rocha O, Duncan A (1985) The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplankton studies. *J Plankton Res* 7:279-294
- Rodier J (1981) *Análisis de las aguas*. Omega. Barcelona, 1047 p



- 
- Rodríguez GG, Phipps D, Ishiguro K, Ridgway HF (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58:1801-1808
- Rodríguez J, Blanco JM, Jiménez-Gómez F, Echevarría F, Gil J, Rodríguez V, Ruiz J, Bautista B, Guerrero F (1998) Patterns in the size structure of the phytoplankton community in the deep fluorescence maximum of the Alboran Sea (southwestern Mediterranean). *Deep Sea Res I* 45:1577-1593
- Rodríguez J, Tintoré J, Allen JT, Blanco JM, Gomis D, Reul A, Ruiz J, Rodríguez V, Echevarría F, Jiménez-Gómez F (2001) Mesoscale vertical motion and the size structure of phytoplankton in the ocean. *Nature* 410:360-363
- Rosenstein BS, Mitchell DL (1987) Action spectra for the induction of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol* 45:775-781
- Rothhaupt KO (1990) Population growth rates of two closely related rotifer species: effects of food quantity, particle size, and nutritional quality. *Freshw Biol* 23:561-570
- Rothhaupt KO (1992) Stimulation of phosphorus-limited phytoplankton by bacterivorous flagellates in laboratory experiments. *Limnol Oceanogr* 37:750-759
- Rothhaupt KO (1996a) Utilization of substitutable carbon and phosphorus sources by the mixotrophic chrysofite *Ochromonas* sp. *Ecology* 77:706-715
- Rothhaupt KO (1996b) Laboratory experiments with a mixotrophic chrysophyte and obligately phagotrophic and phototrophic competitors. *Ecology* 77:716-724
- Rothhaupt KO (1997) Nutrient turnover by freshwater bacterivorous flagellates: differences between a heterotrophic and a mixotrophic chrysophyte. *Aquat Microb Ecol* 12:65-70
- Rott E (1981) Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz Z Hydrol* 43:34-62
- Rott E (1984) Phytoplankton as biological parameter for the trophic characterization of lakes. *Verh Int Ver Limnol* 22:1078-1085
- Ruggiu D, Morabito G, Panzani P, Pugnetti A (1998) Trends and relations among basic phytoplankton characteristics in the course of the long-term oligotrophication of Lake Maggiore (Italy). In: Álvarez-Cobelas M, Reynolds CS, Sánchez-Castillo P, Kristiansen J (eds) *Phytoplankton and trophic gradients*. *Hydrobiologia* 369/370: 243-257.

- Ruttner-Kolisko A (1977) Suggestion for biomass calculations of plankton rotifers. *Arch Hydrobiol* 8:71–76
- Salonen K, Jokinen S (1988) Flagellate grazing on bacteria in a small dystrophic lake. *Hydrobiologia* 161:203-209
- Sancar A, Sancar GB (1988) DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 57:29-67
- Sánchez-Castillo P, Cruz-Pizarro L, Carrillo P (1989) Caracterización del fitoplancton de las lagunas de alta montaña de Sierra Nevada (Granada, Spain) en relación con las características físico-químicas del medio. *Limnetica* 5:37–50
- Sanders RW, Porter K (1988) Phagotrophic phytoflagellates. *Adv Microb Ecol* 10:167-192
- Sanders RW, Porter KG, Caron DA (1990) relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. *Microb Ecol* 19:97-109
- Sanders RW, Caron DA, Berninger UG (1992) Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Mar Ecol Prog Ser* 86:1-14
- Sanders RW, Caron DA, Davidson JM, Dennett MR, Moran DM (2001) Nutrient acquisition and population growth of a mixotrophic alga in axenic and bacterized cultures. *Microb Ecol* 42:513-523
- Sandgren CD, Robinson JV (1984) A stratified sampling approach to compensating for non-random sedimentation of phytoplankton cells in inverted microscope settling chamber. *Br Phycol J* 19:67-72
- Sarnelle O (1993) Herbivore effects on phytoplankton succession in a eutrophic lake. *Ecol Monogr* 63:129-149
- Schindler DW (1977) Evolution of phosphorus limitation in lake ecosystems. *Science* 195:260-262
- Schmid I, Schmid P, Giorgi JV (1988) Conversion of logarithmic channel numbers into relative linear fluorescence intensity. *Cytometry* 9:533–538
- Schofield O, Kroon BMA, Prézelin BB (1995) Impact of ultraviolet-B radiation on photosystem II activity and its relationship to the inhibition of carbon fixation rates for Antarctic ice algae communities. *J Phycol* 31:703-715
- Schwikowski M, Novo A, Baltensperger U, Delmas R, Gaggeler HW, Kasper A, Kuhn M, Nikus U, Preunkert S, Puxbaum H, Rossi GC, Schonher W, Wagenbach D (1997) Intercomparison of snow sampling and analysis within the alpine-wide snowpack investigation. *Water Air Soil Poll* 93:67-91

- 
- Scully NM, Lean DRS (1994) The attenuation of ultraviolet radiation in temperate lakes. *Arch Hydrobiol Beih* 43:135-144
- Scully NM, Lean DRS, McQueen DJ, Cooper WJ (1995) Photochemical formation of hydrogen peroxide in lakes: effects of dissolved organic carbon and ultraviolet radiation. *Can J Fish Aquat Sci* 52:2675-2681
- Scully NM, McQueen DJ, Lean DRS, Cooper WJ (1996) Hydrogen peroxide formation: the interaction of ultraviolet radiation and dissolved organic carbon in lake waters along a 43-75° N gradient. *Limnol Oceanogr* 41:540-548
- Sell AF, Overbeck J (1992) Exudates: phytoplankton-bacterioplankton interactions in Plußsee. *J Plankton Res* 14:1199-1215
- Servais P, Martínez J, Billen G, Vives-Rego J (1987) Determining [3H]thymidine incorporation into bacterioplankton DNA: Improvement of the method by DNase treatment. *Appl Environ Microbiol* 53:1977-1979
- Sherr BF, Sherr EB, Fallon RD (1987) Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl Environ Microbiol* 53:958-965
- Sherr BF, Sherr EB, Hopkinson C (1988) Trophic interactions within pelagic microbial communities: indications of feed-back regulation of carbon flow. *Hydrobiologia* 159:19-26
- Sherr BF, Sherr EB, McDaniel J (1992) Effects of protistan grazing on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages. *Appl Environ Microbiol* 58:2381-2385
- Sherr EB, Sherr BF (1994) Bacterivory and herbivory: key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microb Ecol* 28:223-235
- Sherr BF, del Giorgio P, Sherr EB (1999 a) Estimating abundance and single-cell characteristics of actively respiring bacteria via the redox dye, CTC. *Aquat Microb Ecol* 18:117-131
- Sherr BE, Sherr BF, Sigmon CT (1999 b) Activity of marine bacteria under incubated and in situ conditions. *Aquat Microb Ecol* 20:213-223
- Shiah FK, Ducklow HW (1994a) Temperature regulation of heterotrophic bacterioplankton abundance, production, and specific growth rate in Chesapeake Bay. *Limnol Oceanogr* 39:1243-1258
- Shiah FK, Ducklow HW (1994b) Temperature and substrate regulation of the bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, USA. *Mar Ecol Prog Ser* 103:297-308

- Shiah FK (1999) Diel cycles of heterotrophic bacterioplankton abundance and production in the ocean surface waters
- Shiah FK, Chen TY, Gong GC, Chen CC, Chiang KP, Hung JJ (2001) Differential coupling of bacterial and primary production in mesotrophic and oligotrophic systems of the East China Sea. *Aquat Microb Ecol* 23:273-282
- Shinn JA (1941) A practical handbook of seawater analysis. *Fish Res Bd Can Bull*, 167 p
- Sickman JO, Melack JM (1992) Photosynthetic activity of phytoplankton in a high altitude lake (Emerald, Sierra Nevada, California). *Hydrobiologia* 230:37-48
- Sieburth J, Smetacek V, Lenz J (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol Oceanogr* 23:1256-1263
- Sieracki ME, Sieburth JM (1986) Sunlight-induced growth delay of planktonic marine bacteria in filtered seawater. *Mar Ecol Prog Ser* 33:19-27
- Simon M, Cho BC, Azam F (1992) Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean: comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar Ecol Prog Ser* 86:103-110
- Simon M, Wunsch C (1998) Temperature control of bacterioplankton growth in a temperate large lake. *Aquat Microb Ecol* 16:119-130
- Skerratt JH, Davidson AD, Nichols PD, McMeekin TA (1998) Effect of UV-B on lipid content of three Antarctic marine phytoplankton. *Phytochemistry* 49:999-1007
- Skovgaard A (1996) Mixotrophy in *Fragilidium subglobosum* (Dinophyceae): growth and grazing responses as functions of light intensity. *Mar Ecol Prog Ser* 143:247-253
- Smith DC, Douglas AE (1987) The biology of symbiosis. *Arnold*
- Smith DC, Azam F (1992) A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using <sup>3</sup>H-leucine. *Mar Microb Food Webs* 6:107-114
- Smith RC, Prezelin BB, Baker KS, Bidigare RR, Boucher NP, Coley T, Karentz D, MacIntyre S, Matlick HA, Menzies D, Ondrusek M, Wan Z, Waters KJ (1992) Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255:952-959
- Smith REH, Furgal JA, Lean DRS (1998) The short-term effects of solar ultraviolet radiation on phytoplankton photosynthesis and photosynthate allocation under contrasting mixing regimes in Lake Ontario. *J Great Lakes Res* 24:427-441
- Smith VH (1985) Predictive models for the biomass of blue-green algae in lakes. *Water Resour Bull* 21:433-439

- 
- Smith WO (1977) Respiration of photosynthetic carbon in the euphotic areas of the ocean. *J Mar Res* 35:557-565
- Sommaruga R, Psenner R (1995) Permanent presence of grazing-resistant bacteria in a hypertrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 61:3457-3459
- Sommaruga R, Psenner R (1997) Ultraviolet radiation in a high mountain lake of the Austrian Alps: air and underwater measurements. *Photochem Photobiol* 65:957-963
- Sommaruga R, Obernosterer I, Herndl GJ, Psenner R (1997) Inhibitory effects of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 63:4178-4184
- Sommaruga R, García-Pichel F (1999) UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Arch Hydrobiol* 144:255-269
- Søndergaard M, Schierup HH (1982) Release of extracellular organic carbon during a diatom bloom in lake Mosso: molecular weight fractionation. *Freshw Biol* 12:313-320
- StatSoft Inc (1997) *Statistica for Windows*. Release 5.1. Tulsa. USA.
- Steele JH (1974) *The structure of marine ecosystems*. Harvard University Press, Cambridge
- Steemann-Nielsen E (1952) The use of radioactive carbon ( $C^{14}$ ) for measuring organic production in the sea. *J Cons Int Explor Mer* 18:117-140
- Stegmann P, Peinert R (1984) Interrelations between herbivorous zooplankton and phytoplankton and their effect on production and sedimentation of organic matter in Kiel Bight. *Limnologica* 15:487-495
- Sterner RW (1995) Elemental stoichiometry of species in ecosystems. In: Jones C, Lawton J (eds.) *Linking species and ecosystems*. Chapman and Hall, New York, pp 240-252
- Sterner RW, Chrzanowski TH, Elser JJ, George NB (1995) Sources of nitrogen and phosphorus supporting the growth of bacterioplankton and phytoplankton in an oligotrophic Canadian Shield Lake. *Limnol Oceanogr* 40:242-249
- Sterner RW, Elser JJ, Fee EJ, Guildford SJ, Chrzanowski TH (1997) The light:nutrient ratio in lakes: the balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *Am Nat* 150:663-684
- Sterner RW, Elser JJ (2002) *Ecological Stoichiometry*. Princeton University Press
- Stitt M (1990) Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41:153-185

- Stoecker DK, Capuzzo JM (1990) Predation on protozoa: its importance to zooplankton. *J Plankton Res* 12:891-908
- Stone L (1990) Phytoplankton-bacteria-protozoa interactions: a qualitative model portraying indirect effects. *Mar Ecol Prog Ser* 64:137-145
- Straile D (2000) Meteorological forcing of plankton dynamics in a large and deep continental European Lake. *Oecologia* 122:44-50
- Straskrabová V, Callieri C, Carrillo P, Cruz-Pizarro L, Fott J, Hartman P, Macek M, Medina-Sánchez JM, Nedoma J, Simek K (1999 a) Investigations on pelagic food webs in mountain lakes – aims and methods. *J Limnol* 58:77-87
- Straskrabová V, Callieri C, Fott J. (eds) (1999 b) Pelagic food webs in mountain lakes – MOUNTAIN LAKES RESEARCH PROGRAM *J Limnol* 58
- Sundh I (1989) Characterization of phytoplankton extracellular products (PDOC) and their subsequent uptake by heterotrophic organisms in a mesotrophic forest lake. *J Plankton Res* 11:463-486
- Sundh I (1992) Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microb* 58:2938-2947
- Sundh I, Bell RT (1992) Extracellular dissolved organic carbon released from phytoplankton as a source of carbon for heterotrophic bacteria in lakes of different humic content. *Hydrobiologia* 229:93-106
- Suttle CA, Stockner JG, Harrison PJ (1987) Effects of nutrient pulses on community structure and cell size of a freshwater phytoplankton assemblage in culture. *Can J Fish Aquat Sci* 44:1768-1774
- Suttle CA, Stockner JG, Shortreed KS, Harrison PJ (1988) Time-courses of size-fractionated phosphate uptake: are larger cells better competitors for pulses of phosphate than smaller cells? *Oecologia* 74:571-576
- Suttle CA, Fuhrman JA, Capone DG (1990) Rapid ammonium cycling and concentration-dependent partitioning of ammonium and phosphate: implications for carbon transfer in planktonic communities. *Limnol Oceanogr* 35:424-432
- Taiz L, Zeiger E (1998) *Plant physiology*, 2<sup>nd</sup> edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Takahashi A, Takeda K, Ohnishi T (1991) Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaura cyanus* cells in culture. *Plant Cell Physiol* 32:541-547

- Tamminen T (1989) Dissolved organic phosphorus regeneration by bacterioplankton: 5'-nucleotidase activity and subsequent phosphate uptake in a mesocosm enrichment experiment. *Mar Ecol Prog Ser* 58:89-100
- Tarapchak SJ, Moll RA (1990) Phosphorus sources for phytoplankton and bacteria in Lake Michigan. *J Plankton Res* 12:743-758
- Taylor JS, Lu HF, Kotyk JJ (1990) Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem Photobiol* 51:161-167
- Taylor WD (1984) Phosphorus flux through epilimnetic zooplankton from lake Ontario: relationship with body size and significance to phytoplankton. *Can J Fish Aquat Sci* 41:1702-1712
- Theodorou ME, Elrifi IR, Turpin DH, Plaxton WC (1991) Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol* 95:1089-1095
- Thingstad TF, Skjoldal EF, Bohne RA (1993) Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandsfjord, western Norway. *Mar Ecol Prog Ser* 99:239-259
- Thingstad TF, Rassoulzadegan F (1995) Nutrient limitations, microbial food webs, and 'biological C-pumps' suggested interactions in a P-limited Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser* 117:299-306
- Thingstad TF (1996) On the strategy of "eating your competitor": a mathematical analysis of algal mixotrophy. *Ecology* 77:2108-2118
- Thingstad TF, Perez M, Pelegri S, Dolan J, Rassoulzadegan F (1999) Trophic control of bacterial growth in microcosms containing a natural community from northwest Mediterranean surface waters. *Aquat Microb Ecol* 18:145-156
- Thomas JP (1971) Release of dissolved organic matter from natural populations of marine phytoplankton. *Mar Biol* 11:317-323
- Thomas WH, Cho BC, Azam F (1991a) Phytoplankton and bacterial production and biomass in sub-alpine Eastern Brook Lake, Sierra-Nevada, California. 1. Seasonal interrelationships between the 2 biotic groups. *Arctic Alp Res* 23:287-295
- Thomas WH, Cho BC, Azam F (1991b) Phytoplankton and bacterial production and biomass in sub-alpine Eastern Brook Lake, Sierra-Nevada, California. 2. Comparison with other high-elevation lakes. *Arctic Alp Res* 23:296-302
- Thompson LMM, MacLeod RA (1974) Biochemical localization of alkaline phosphatase in a marine pseudomonad. *J Bact* 117:819-825

- Tibbles BJ (1997) Effects of temperature on the relative incorporation of leucine and thymidine by bacterioplankton and bacterial isolates. *Aquat Microb Ecol* 11:239-250
- Tobiesen A (1990) Temperature dependent filtration rates and size selection in some heterotrophic microflagellates and one dinoflagellate. *Ergeb Limnol* 34:293-304
- Todo T, Takemori H, Ryo H, Ihara M, Matsunaga O, Nikaïdo O, Sato K, Nomura T (1993) A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature* 361:371-374
- Toolan T, Wehr JD, Findlay S (1991) Inorganic phosphorus stimulation of bacterioplankton production in a mesoeutrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 57:2074-2078
- Torreton JP, Bouvy M (1991) Estimating bacterial DNA synthesis from <sup>3</sup>H-thymidine incorporation: Discrepancies among macromolecular extraction procedures. *Limnol Oceanogr* 36:299-306
- Torreton JP, Dufour P (1996) Temporal and spatial stability of bacterioplankton biomass and productivity in an atoll lagoon. *Aquat Microb Ecol* 11:251-261
- Touratier F, Legendre L, Vezina A (1999) Model of bacterial growth influenced by substrate C:N ratio and concentrations. *Aquat Microb Ecol* 19:105-118
- Tranvik LJ, Porter KG, Sieburth JMcN (1989) Occurrence of bacterivory in *Cryptomonas*, a common freshwater phytoplankter. *Oecologia* 78:473-476
- Tranvik LJ, Kokalj S (1998) Decreased biodegradability of algal DOC due to interactive effects of UV radiation and humic matter. *Aquat Microb Ecol* 14:301-307
- Turpin DH (1991) Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J Phycol* 27:14-20
- Uthermöl H (1958) Zur wemlkommung der quantitative phytoplankton methidik. *Mitt Int Ver Limnol* 9:1-38
- Urabe J, Gurung TB, Yoshida T (1999) Effects of phosphorus supply on phagotrophy by the mixotrophic alga *Uroglena americana* (Chrysophyceae). *Aquat Microb Ecol* 18:77-83
- Urabe J, Gurung TB, Yoshida T, Sekino T, Nakanishi M, Maruo M, Nakayama E (2000) Diel changes in phagotrophy by *Cryptomonas* in Lake Biwa. 45:1558-1563
- Vadstein O, Harkjerr BO, Jensen A, Olsen Y, Reinertsen H (1989) Cycling of organic carbon in the photic zone of a eutrophic lake with special reference to the heterotrophic bacteria. *Limnol Oceanogr* 34:840-855
- Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM (1995) *Algae. An introduction to phycology.* Cambridge



- Van Donk E, Hessen DO (1995) Reduced digestibility of UV-B stressed and nutrient-limited algae by *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 307:147-151
- Van Wambeke F, Christaki U, Giannakourou A, Moutin T, Souvemerzoglou K (2002 a) Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 43:119-133
- Van Wambeke F, Heussner S, Diaz F, Raimbault P, Conan P (2002 b) Small-scale variability in the coupling/uncoupling of bacteria, phytoplankton, and organic carbon fluxes along the continental margin of the Gulf of Lions, Northwestern Mediterranean Sea. *J Mar Syst* 33-34:411-429
- Villar-Argaiz M (1999) Redes tróficas pelágicas: una perspectiva estequiométrica. PhD Thesis, University of Granada, Spain, 242 p
- Villar-Argaiz M, Medina-Sánchez JM, Cruz-Pizarro L, Carrillo P (2000) Life history implication of Calanoid *Mixodiatomus laciniatus* in C:N:P stoichiometry. *Verh Int Verein Limnol* 27:527-531
- Villar-Argaiz M, Medina-Sánchez JM, Carrillo P (2001) Inter- and intra-annual variability in the phytoplankton community of a high mountain lake: the influence of external (atmospheric) and internal (recycled) sources of P. *Freshw Biol* 46: 1017-1034.
- Villar-Argaiz M, Medina-Sánchez JM, Carrillo P (2002 a) Interannual changes in the C:N:P ratios of seston and zooplankton of a high mountain lake in Sierra Nevada, Spain. *Water Air Soil Pollut Focus* 2:359-378
- Villar-Argaiz M, Medina-Sánchez JM, Carrillo P (2002 b) Microbial plankton response to contrasting climatic conditions: insights from community structure, productivity and fraction stoichiometry. *Aquat Microb Ecol* (en prensa)
- Villar-Argaiz M, Medina-Sánchez JM, Carrillo P (2002 c) Linking life history strategies and ontogeny in crustacean zooplankton: Implications for homeostasis. *Ecology* 83:1899-1914
- Vincent WF, Roy S (1993). Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environ Rev* 1:1-12
- Vinebrooke RD, Leavitt PR (1996) Effects of ultraviolet radiation on periphyton in an alpine lake. *Limnol Oceanogr* 41:1035-1040
- Vinebrooke RD, Leavitt PR (1999) Differential responses of littoral communities to ultraviolet radiation in an alpine lake. *Ecology* 80:223-237
- Visser PM, Snelder E, Kop AJ, Boelen P, Buma AGJ, van Duyl FC (1999) Effects of UV radiation on DNA photodamage and production in bacterioplankton in the coastal Caribbean Sea. *Aquat Microb Ecol* 20:49-58

- Vrede K, Vrede T, Isaksson A, Karlsson A (1999) Effects of nutrients (phosphorus, nitrogen, and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton – a seasonal study. *Limnol Oceanogr* 44:1616-1624
- Wängberg SA, Garde K, Gustavson K, Selmer JS (1999) Effects of UVB radiation on marine phytoplankton communities. *J Plankton Res* 21:147-166
- Watanabe Y (1980) A study of the excretion and extracellular products of natural phytoplankton in Lake Nakanuma, Japan. *Int Revue Ges Hydrobiol* 65:809-834
- Weiler CS, Penhale PA (eds) (1994) Ultraviolet radiation and biological research in Antarctica. Antarctica Series 62. American Geophysical Union, Washington, DC
- Weinbauer MG, Wilhelm SW, Suttle CA, Garza DR (1997) Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine virus communities. *Appl Environ Microbiol* 63:2200-2205
- Wetherbee R, Andersen RA (1992) Flagella of a chrysoficean alga play an active role in prey capture and selection. Direct observation on *Epipyxis pulchra* using image enhanced video microscopy. *Protoplasma* 166:1-7
- Wetzel RG (1982) *Limnology*. Saunders Publishing, Philadelphia
- Wetzel RG, Hatcher PG, Bianchi TS (1995) Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrate for rapid bacterial metabolism. *Limnol Oceanogr* 40:1369-1380
- White PA, Klaff J, Rasmussen JB, Gasol JM (1991) The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microb Ecol* 21:99-118
- Wiencke C, Gómez I, Pakker H, Flores-Moya A, Altamirano M, Hanelt D, Bischof K, Figueroa FL (2000) Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: Implications for depth zonation. *Mar Ecol Prog Ser* 197:217-229
- Willen E (1976) A simplified method of phytoplankton counting. *Br Phycol J* 11:265-278.
- Williams PJ LeB (1981) Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch Sonderh* 5:1-28
- Williams PJ LeB (1995) Evidence for the seasonal accumulation of carbon-rich dissolved organic matter, its scale in comparison with changes in particulate material and consequential effect on net C/N assimilation ratios. *Mar Chem* 51:17-29
- Williamson CE, Stremberger RS, Morris DP, Frost TM, Paulsen SG (1996) Ultraviolet radiation in North American lakes: Attenuation estimates from DOC

- measurements and implications for plankton communities. *Limnol Oceanogr* 41:1024-1034
- Williamson CE, Morris DP, Pace ML, Olson OG (1999) Dissolved organic carbon and nutrients as regulators of lake ecosystems: resurrection of a more integrated paradigm. *Limnol Oceanogr* 44:795-803
- Wilson MI, Ghosh S, Gerhardt KE, Holland N, Sudhakar-Babu T, Edelman M, Dumbroff EB, Greenberg BM (1995) *In vivo* photomodification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase holoenzyme by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol* 109:221-229
- Wood AM, Van Valen LM (1990) Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. *Mar Microb Food Webs* 4:103-116
- Xenopoulos MA, Bird DF (1997) Effect of acute exposure to hydrogen peroxide on the production of phytoplankton and bacterioplankton in a mesohumic lake. *Photochem Photobiol* 66:471-478
- Xenopoulos MA, Frost PC, Elser JJ (2002) Joint effects of UV radiation and phosphorus supply on algal growth rate and elemental composition. *Ecology* 83:423-435
- Yaalon DH (1997) Comments of the source, transport and deposition scenario of Saharan dust to Southern Europe. *J Arid Environ* 36:193-196
- Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W (eds) (1993) *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, London
- Zepp RG, Callaghan TV, Erickson DJ (1995) Effects of increased solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. *Ambio* 24:181-187
- Zlotnik I, Sukenik A, Dubinsky Z (1993) Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *J Phycol* 29:463-469
- Zubkov MV, Sleigh MA (1995 a) Bacterivory by starved marine heterotrophic nanoflagellates of two species which feed differently, estimated by uptake of dual radioactive-labeled bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 17:57-66
- Zubkov MV, Sleigh MA (1995 b) Ingestion and assimilation by marine protists fed on bacteria labeled with radioactive thymidine and leucine estimated without separating predator and prey. *Microb Ecol* 30:157-170

**ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ADNasa I</b>	Desoxirribonucleasa I
<b>AT</b>	Actividad total
<b>BIO</b>	Comunidad biológica total planctónica
<b>CARB</b>	Requerimientos bacterianos de carbono de origen algal
<b>CIL</b>	Ciliados
<b>%CUEb</b>	Eficiencia de uso de carbono fotosintético por las bacterias
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DIN</b>	Nitrógeno inorgánico disuelto
<b>DOC</b>	Carbono orgánico disuelto < 0.2 $\mu\text{m}$
<b>DOM</b>	Materia orgánica disuelta
<b>D<sub>s</sub></b>	Disco de Secchi
<b>EE</b>	Error estándar
<b>EOC</b>	Excreción de carbono orgánico
<b>%EOC</b>	% de excreción de carbono orgánico con respecto al producido
<b>HNF</b>	Nanoflagelados heterotróficos
<b>IT</b>	Tasa de incorporación de timidina
<b>NDT</b>	Nitrógeno disuelto total
<b>NP<sub>a</sub></b>	Nitrógeno particulado
<b>N:P<sub>b,f</sub></b>	Razón N:P de la fracción bacteriana o fitoplanctónica
<b>NT</b>	Nitrógeno total
<b>PAR</b>	Radiación fotosintéticamente activa
<b>PB</b>	Producción bacteriana
<b>PdB</b>	Productividad bacteriana
<b>PdP</b>	Productividad primaria
<b>PDT</b>	Fósforo disuelto total
<b>%PEA</b>	Eficiencia de asimilación de C fotosintético por las bacterias
<b>POC<sub>1</sub></b>	Carbono orgánico particulado $\geq 2 \mu\text{m}$
<b>POC<sub>2</sub></b>	Carbono orgánico particulado 0.2-1.0 $\mu\text{m}$
<b>PP</b>	Producción primaria
<b>PP<sub>a</sub></b>	Fósforo particulado
<b>PT</b>	Fósforo total
<b>RuBisCo</b>	Ribulosa bis-fosfato carboxilasa
<b>SRP</b>	Fósforo reactivo soluble
<b>TdR</b>	Timidina etiquetada
<b>TOC</b>	Carbono orgánico total
<b>UVA</b>	Radiación ultravioleta A
<b>UVB</b>	Radiación ultravioleta B
<b>UVR</b>	Radiación ultravioleta

