

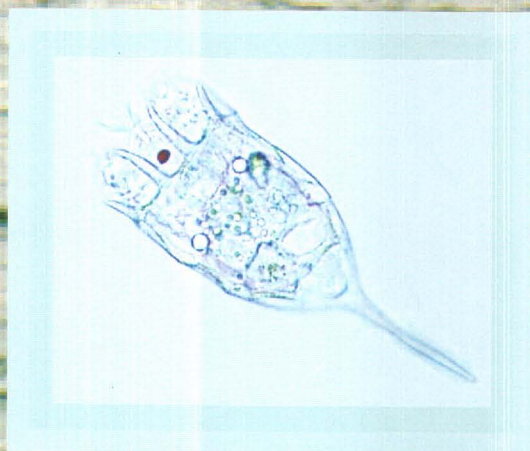
Las interacciones bióticas como reguladoras de las poblaciones de rotíferos: análisis de campo y laboratorio

Tesis Doctoral

2003

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
a 8/01/2003
ADA NUM. 13

UNIVERSIDAD DE GRANADA
16 DIC. 2002
COMISION DE DOCTORADO



Eloísa Ramos Rodríguez



Universidad de Granada

4/74

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL Y ECOLOGÍA



**Las interacciones bióticas como
reguladoras de las poblaciones de rotíferos:
análisis de campo y laboratorio**

TESIS DOCTORAL

ELOÍSA RAMOS RODRÍGUEZ

Granada, 2003

**Las interacciones bióticas como
reguladoras de las poblaciones de rotíferos:
análisis de campo y laboratorio**

Memoria que la Licenciada Eloísa Ramos Rodríguez presenta para
aspirar al Grado de Doctora por la Universidad de Granada

Esta Tesis ha sido realizada bajo la dirección de:
Dr. José M^a Conde Porcuna



Lda. Eloísa Ramos Rodríguez
Aspirante al Grado de
Doctora

Granada, Diciembre de 2002

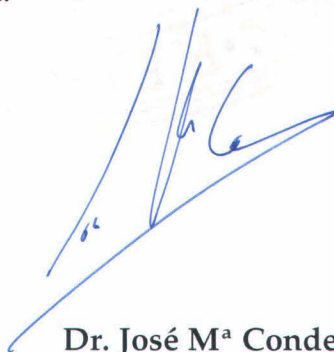
Dr. José M^a Conde Porcuna

Profesor Titular Interino de Ecología de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que los trabajos de investigación desarrollados en la Memoria de Tesis Doctoral: "*Las interacciones bióticas como reguladoras de las poblaciones de rotíferos: análisis de campo y laboratorio*", son aptos para ser presentados por la Lda. Eloísa Ramos Rodríguez ante el Tribunal que en su día se designe, para aspirar al Grado de Doctora por la Universidad de Granada

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendo el presente certificado a 16 de Diciembre de 2002.




Dr. José M^a Conde Porcuna

Durante el tiempo de realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado de una Beca del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador, Subprograma de Formación de Profesorado Universitario (M.E.C.).

Este trabajo estuvo financiado por los Proyectos de Investigación de la Unión Europea LIFE93/UK/3167 y EVK2-CT1999-00046, y el proyecto CICYT REN2001-2840/HID.

La investigación presentada en esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Área de Ecología del Departamento de Biología Animal y Ecología de la Universidad de Granada, y en el Instituto del Agua de la misma Universidad.



Esta Tesis Doctoral es fruto de un largo y duro trabajo en el que he recibido el apoyo de numerosas personas. Anhelaba el momento de escribir esta sección de agradecimientos porque es uno de los últimos apartados que por tradición suele escribirse, señal de que el trabajo de investigación ha culminado. Pero a la vez es también uno de los apartados de la Tesis que más temía escribir, porque enumerar a tantísimas personas que de un modo u otro han intervenido durante el desarrollo de esta Tesis, además de ser difícil por la buena memoria que requiere, podría herir susceptibilidades personales si, lejos de mi intención, dejo a alguien en el tintero. Así pues, sólo quiero aprovechar estas líneas para dar las gracias de todo corazón a todas y cada una de las personas que me han ofrecido generosamente su profesionalidad, sabiduría, confianza, apoyo logístico, comprensión, paciencia y amistad, y que han hecho posible que hoy pueda escribir esta sección de agradecimientos. A todos vosotros os dedico esta Tesis.



A mi familia

A Antonio M^a

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Introducción y consideraciones preliminares

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	7

CAPÍTULO 2. Dinámica poblacional de rotíferos en un embalse meso-eutrófico: variación espacio-temporal de la fecundidad

INTRODUCCIÓN	11
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Análisis estadísticos	15
RESULTADOS	15
Descripción de la comunidad zooplanctónica	15
Análisis de la abundancia y fecundidad de las especies de rotíferos más abundantes	18
Variación espacio-temporal de la abundancia y fecundidad de <i>K. cochlearis</i>	20
DISCUSIÓN	24

CAPÍTULO 3. Influencia de la cantidad de alimento sobre el crecimiento poblacional de *Keratella cochlearis*

INTRODUCCIÓN	29
MATERIAL Y MÉTODOS	32
Cultivo de <i>Cryptomonas</i> sp.	32
Cultivo de <i>Keratella cochlearis</i>	34
Respuesta numérica de <i>K. cochlearis</i>	34
RESULTADOS	38

DISCUSIÓN	40
 CAPÍTULO 4. Calidad del alimento para un rotífero planctónico: consecuencias de la limitación de nutrientes sobre su historia de vida y resistencia al ayuno	
INTRODUCCIÓN	45
MATERIAL Y MÉTODOS	48
Cultivos de <i>Cryptomonas</i> sp.	48
Composición elemental y estudio citoquímico de <i>Cryptomonas</i> sp.	50
Experimentos de tabla de vida	52
Resistencia al ayuno	53
Análisis estadísticos	54
RESULTADOS	54
Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre la composición elemental y bioquímica de <i>Cryptomonas</i> sp.	54
Efecto de la calidad y cantidad del alimento sobre los parámetros de historia de vida de <i>K. cochlearis</i>	60
Efecto de la calidad del alimento sobre la resistencia al ayuno de <i>K. cochlearis</i>	63
DISCUSIÓN	64
Resistencia al ayuno	67
 CAPÍTULO 5. Competencia entre cladóceros y rotíferos: importancia relativa de la competencia explotativa, interferencia mecánica e interferencia química de <i>Daphnia longispina</i> sobre <i>Keratella cochlearis</i>	
INTRODUCCIÓN	69
MATERIAL Y MÉTODOS	72

Diseño experimental	73
Análisis estadísticos	77
RESULTADOS	78
DISCUSIÓN	82
CAPÍTULO 6. Impacto de la depredación por copépodos sobre la fecundidad de <i>Keratella cochlearis</i>	
INTRODUCCIÓN	87
MATERIAL Y MÉTODOS	88
Observaciones directas	89
Efecto de la depredación por copépodos sobre la fecundidad de <i>K. cochlearis</i>	90
Análisis estadísticos	91
RESULTADOS	91
Comportamiento de alimentación de <i>L. alluaudi</i> y <i>A. vernalis</i> sobre hembras ovígeras de <i>K. cochlearis</i>	91
Efecto de la depredación por <i>L. alluaudi</i> y <i>A. vernalis</i> sobre la fecundidad de <i>K. cochlearis</i>	93
DISCUSIÓN	95
CAPÍTULO 7. SÍNTESIS GENERAL	99
CONCLUSIONES	105
REFERENCIAS	107

1

Introducción y consideraciones preliminares

INTRODUCCIÓN GENERAL

En ecología, uno de los aspectos de mayor interés desde siempre ha sido, y sigue siendo, el estudio de los posibles factores que regulan la dinámica y estructura de las comunidades naturales. Inicialmente, en el estudio del zooplancton predominaron aproximaciones autoecológicas interesadas por el análisis de la influencia de los factores físico-químicos del medio sobre los organismos y su sucesión (SCHUURMAN, 1932; PEJLER, 1957), de manera que la sucesión de especies era generalmente considerada como el resultado de la diferente tolerancia ecológica a varios factores ambientales abióticos, tales como la intensidad de la luz y la densidad del agua o la viscosidad (HUTCHINSON, 1967). Pero en décadas más recientes los ecólogos del zooplancton han mostrado un interés creciente en el estudio de las interacciones bióticas, tales como la cantidad y calidad del fitoplancton disponible, la competencia por recursos alimenticios comunes y la depredación por invertebrados, manifestando su importancia en la regulación de las comunidades acuáticas (véase p. ej. DEMOTT, 1989; LAMPERT & SOMMER, 1997; STERNER & SCHULZ, 1998).

A menudo se ha asumido que los rotíferos, los más pequeños de todos los metazoos del plancton de agua dulce, tienen poca importancia en la dinámica trófica de las comunidades acuáticas. Sin embargo, numerosos estudios han mostrado que estos organismos pueden constituir una buena parte de la biomasa total zooplanctónica y contribuir de manera significativa en la productividad de una gran variedad de lagos (SCHINDLER, 1972; HAKKARI, 1978; PACE & ORCUTT, 1981; BOGDAN & GILBERT, 1982; HERZIG, 1987).

Los rotíferos son importantes también en el reciclado de nutrientes en los sistemas acuáticos (MAKAREWICZ & LIKENS, 1979). Estos organismos microscópicos convierten una gran parte del alimento que ingieren en biomasa animal gracias a sus altas tasas de ingestión (igual a diez veces su peso seco por día) y a sus altas eficiencias de asimilación (20-80%) (NOGRADY *et ál.*, 1993). Esta biomasa es entonces transmitida al próximo nivel trófico (STARKWEATHER, 1980, 1987), haciendo de los rotíferos componentes críticos en el flujo de energía y ciclo de nutrientes de muchos ecosistemas acuáticos. Sin embargo, los estudios que han analizado la dinámica poblacional de rotíferos son muy limitados en comparación con la atención prestada a los crustáceos, probablemente debido a que estos últimos a menudo constituyen una mayor proporción en la biomasa total de la comunidad zooplanctónica, y quizás también porque los crustáceos son más fáciles de manipular y observar en el laboratorio que los rotíferos (NOGRADY *et ál.*, 1993).

Hoy en día parece ampliamente aceptado que las poblaciones naturales de rotíferos pueden estar controladas tanto por la cantidad y calidad del alimento (*control bottom-up* o ascendente) como por sus depredadores (*control top-down* o descendente) (véase p. ej. PAUL & SCHINDLER, 1994; PLAßMANN *et ál.* 1997; CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998; OOMS *et ál.*, 1999; MERRIMAN & KIRK, 2000; YOSHIDA *et ál.*, 2000; CORDOVA *et ál.* 2001; DIEGUEZ & GILBERT, 2002). El éxito de una especie dependerá de su habilidad para utilizar los recursos alimenticios disponibles, que varían en tamaño, concentración y contenido en nutrientes, y de la estrategia de historia de vida que adopte para enfrentarse a las diferentes limitaciones en la distribución de los recursos (WALZ, 1995). Por estrategia de historia de vida se entiende el producto de un conflicto entre las diferentes demandas metabólicas de un organismo y las condiciones bióticas y abióticas del ambiente que le rodea WALZ (1995).

Esta Tesis se centra en las interacciones bióticas como reguladoras de las poblaciones de rotíferos, concretamente, en las interacciones rotíferos-fitoplancton (**cantidad** y **calidad de alimento** disponible) y en las interacciones rotíferos-crustáceos (**competencia** y **depredación**). Sin embargo, hay que hacer también mención a que son las condiciones abióticas, principalmente la temperatura del agua, la concentración de oxígeno disuelto y el pH, las que determinan la presencia o no de determinadas especies de rotíferos en

determinados hábitats (HOFMANN, 1977; MAY, 1983; RADWAN, 1984), ya que cada especie de rotífero tiene un requisito o necesidad abiótica específica para sobrevivir y reproducirse. Las condiciones abióticas, además, aunque puedan no tener un efecto regulador importante sobre las poblaciones de rotíferos, sí tienen una gran influencia sobre muchas funciones metabólicas de estos organismos (WALZ, 1993).

La **cantidad de alimento** ejerce una gran influencia sobre el crecimiento y reproducción de los organismos zooplanctónicos, y por tanto, sobre la tasa de nacimiento y abundancia potencial de una población (LAMPERT, 1985). Distintos periodos del ciclo de vida de estos organismos (p. ej. el periodo juvenil y el periodo reproductivo de individuos adultos), así como distintos parámetros de gran importancia ecológica tales como la duración del desarrollo embrionario y la fecundidad, pueden verse afectados por condiciones limitantes de alimento (véase p. ej. DUNCAN, 1989).

En los sistemas naturales, el zooplancton herbívoro se enfrenta con una gran variabilidad temporal en la abundancia de sus recursos alimenticios (GONZÁLEZ & FROST, 1992; MÜLLER-NAVARRA & LAMPERT, 1996; MERRIMAN & KIRK, 2000; CORDOVA *et ál.* 2001). Muchos autores han sugerido que esta variabilidad en la disponibilidad de los recursos puede influir de manera importante sobre el resultado de la competencia entre especies zooplanctónicas (p. ej. THRELKED, 1976; STEMBERGER & GILBERT, 1985; DEMOTT, 1989; SCHULZE *et ál.*, 1995), e incluso permitir la coexistencia y, en consecuencia, aumentar la diversidad de especies (p. ej. KIRK, 1997; CIROS *et ál.* 2001). En este sentido, el concepto de concentración de alimento umbral (*threshold food level*) (LAMPERT, 1977), ha sido sugerido por numerosos investigadores como un parámetro de crecimiento poblacional fundamental que puede tener grandes implicaciones ecológicas sobre el resultado de la competencia entre especies y la estructura de las comunidades zooplanctónicas (p. ej. LAMPERT & SCHOBER, 1980; STEMBERGER & GILBERT, 1985; STELZER, 1998; KREUTZER & LAMPERT, 1999; CIROS-PÉREZ *et ál.*, 2001). LAMPERT & SCHOBER (1980) distinguieron entre un umbral a nivel individual, donde la ingestión de alimento cubre las pérdidas metabólicas de un organismo (el organismo puede mantener su masa corporal pero no crecer), y un umbral a nivel poblacional, donde la disponibilidad de alimento es suficiente como para que una población produzca descendencia compensando las pérdidas por mortalidad

natural (concentración de alimento en la que la tasa de crecimiento neto de una población es cero). De acuerdo con la "hipótesis del umbral" (LAMPERT & SCHOBER, 1980), la especie competitivamente superior en un ambiente limitado en recursos será la que necesite menos concentración de alimento para mantener su crecimiento poblacional.

El efecto de la **calidad del alimento** sobre el crecimiento y reproducción del zooplancton ha sido una área de investigación en ecología acuática muy activa en los últimos años (véase p. ej. revisiones por GULATI & DEMOTT (1997) y STERNER & SCHULZ (1998)). La calidad nutricional de una especie algal como alimento para el zooplancton herbívoro depende de su tamaño (BURNS, 1968; ROTHHAUPT, 1990b), características morfológicas (DEMOTT, 1995; VAN DONK *et ál.*, 1997), y de su composición bioquímica (YÚFERA *et ál.*, 1983; ALHGREN *et ál.*, 1990; GIANI, 1991; MÜLLER-NAVARRA, 1995a,b). Numerosos autores han sugerido que las criptofíceas son, en general, el mejor alimento para muchos organismos zooplanctónicos (p. ej. STEMBERGER, 1981; MAY, 1987; INFANTE & LITT, 1995), asociándose esta mayor calidad nutricional de este grupo taxonómico a su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados (BEACH *et ál.*, 1970; AHLGREN *et ál.*, 1990, 1992; WEERS & GULATI, 1997a; VON ELERT & STAMPFL, 2000). Sin embargo, la calidad nutricional no está solamente determinada por la composición taxonómica del fitoplancton, sino que también depende de las condiciones de crecimiento (SMITH, 1991). Los elementos nitrógeno (N) y fósforo (P), nutrientes esenciales para el crecimiento del fitoplancton, pueden mostrar una gran variabilidad en los sistemas acuáticos, limitando así la producción de estos sistemas (STERNER & HESSEN, 1994). Son muchos los estudios experimentales que han mostrado que la composición elemental y/o bioquímica de algunas especies algales puede variar dependiendo del grado y tipo de limitación de estos nutrientes en el medio, y en consecuencia, estas diferencias en la calidad del alimento pueden ocasionar importantes efectos sobre el crecimiento y reproducción de cladóceros y copépodos (p. ej. STERNER, 1993; MÜLLER-NAVARRA, 1995a; LÜRLING & VAN DONK, 1997; DEMOTT *et ál.*, 1998; BOERSMA, 2000; PLATH & BOERSMA, 2001; VILLAR-ARGAIZ & STERNER, 2002). Sin embargo, realmente se ha investigado muy poco sobre los efectos de la limitación de nutrientes sobre el crecimiento de rotíferos (ROTHHAUPT, 1995; CONDE-PORCUNA, 2000).

Por otro lado, el éxito de una especie en un ambiente donde la abundancia y calidad de sus recursos alimenticios puede variar drásticamente en el tiempo, depende en parte de su habilidad para almacenar energía y controlar su distribución durante periodos de extrema limitación de alimento (KIRK, 1997; KIRK *et ál.*, 1999; STELZER, 2001). En este sentido, KIRK (1997) sugería que, aunque los animales planctónicos no pueden encontrarse nunca con condiciones de ausencia total de alimento en la naturaleza, el tiempo que una especie puede sobrevivir en condiciones de ayuno es un buen índice de la habilidad que tiene para existir cuando la tasa de asimilación de energía es inferior a la tasa de consumo de la misma. Por tanto, diferentes tiempos de resistencia al ayuno pueden ser críticos también en determinar el resultado de las interacciones competitivas en ambientes donde haya una gran variabilidad en la abundancia y calidad de los recursos.

La **competencia** entre organismos que explotan recursos alimenticios comunes puede ejercer una gran influencia sobre la dinámica de las poblaciones zooplanctónicas y, en consecuencia, afectar a la estructura de las comunidades acuáticas (DEMOTT, 1989; SOMMER, 1989). En los sistemas naturales hay generalmente una relación inversa entre la presencia de grandes cladóceros (~ 1.2 mm) y la abundancia y diversidad de rotíferos (GILBERT, 1988a; LAMPERT & ROTHHAUPT, 1991). Estos taxones se solapan espacial y temporalmente en la columna de agua (NEILL, 1984), y además tienen nichos de alimento similares (BOGDAN & GILBERT, 1984, 1987), incluso aunque los rotíferos, generalmente con longitudes comprendidas entre 50-150 μm , sean mucho más pequeños que los cladóceros que pueden llegar a medir hasta 3 mm. De este modo, los rotíferos no pueden evitar la *competencia explotativa* con *Daphnia* cuando los recursos alimenticios llegan a ser limitantes. Cuando tal competencia tiene lugar, los rotíferos generalmente están en desventaja, pero no siempre tiene que ser este el caso. No es posible hacer una generalización estricta acerca de la habilidad explotativa de *Daphnia* y de todas las especies de rotíferos considerándolas como un grupo (GILBERT, 1988a). Especies diferentes dentro de estos taxones pueden tener concentraciones de alimento umbral muy diferentes (GOULDEN *et ál.*, 1982; STEMBERGER & GILBERT, 1985, 1987b; GLIWICZ, 1990; KREUTZER & LAMPERT, 1999), y además, la frecuencia y concentración en la que el alimento es suministrado a estos organismos puede modificar su habilidad para competir por los recursos (MACISSAC & GILBERT, 1991a).

Por otro lado, además de la *competencia explotativa* como mecanismo de interacción indirecta entre especies que explotan recursos comunes, una especie también puede verse dañada o perjudicada directamente como consecuencia de la intervención física o química de su especie competidora. Este tipo de competencia es denominada *competencia por interferencia*, y abarca un gran número de interacciones tales como la competencia por encuentro, la territorialidad y la interferencia química (véase revisión por SCHOENER, 1983). Particularmente, en el zooplancton, algunos estudios han mostrado que los cladóceros pueden también inhibir directamente el crecimiento poblacional de los rotíferos por *interferencia mecánica* (GILBERT & STEMBERGER, 1985; BURNS & GILBERT, 1986a, 1986b; GILBERT, 1988b; SCHNEIDER, 1990), incluso cuando los recursos son abundantes, y por *interferencia química* (CONDE-PORCUNA, 1998).

Por último, en los sistemas acuáticos la **depredación** por invertebrados es también una interacción ecológica que puede modificar de manera muy importante las comunidades zooplanctónicas (véase p. ej. LAMPERT & SOMMER, 1997). Los principales depredadores de los rotíferos herbívoros son otros rotíferos depredadores tales como *Asplanchna* y *Ploesoma* (GUISET, 1977; HOFMANN, 1983; WALZ *et ál.*, 1987; URABE, 1992; CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998), el insecto *Chaoborus* (HAVENS, 1990) y copépodos ciclópodos y calanoides (p. ej. ANDERSON, 1980; WILLIAMSON & GILBERT, 1980; STEMBERGER & EVANS, 1984; WILLIAMSON & BUTLER, 1986; ROCHE, 1990b). La habilidad de estos depredadores invertebrados para regular las comunidades de rotíferos planctónicos está siendo muy discutida en la actualidad. Aunque numerosos estudios han llegado a mostrar que la depredación es un factor regulador muy importante de las poblaciones de rotíferos (HOFMANN, 1983; ARNOTT & VANNI, 1993; WILLIAMSON, 1993; LEBLANC *et ál.*, 1997; CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998; YOSHIDA *et ál.*, 2000; GREEN, 2001; DIEGUEZ & GILBERT, 2002), otros estudios, en cambio, han señalado que a pesar de que la depredación de rotíferos pueda ser muy selectiva, su efecto sobre la estructura y tamaño de una comunidad zooplanctónica puede ser poco importante gracias a las altas tasas de reproducción que presentan estos organismos (HAVENS, 1990). YAN *et ál.* (1991) sugirieron también que la importancia de la depredación por copépodos depredadores sobre las poblaciones de rotíferos era dependiente de la producción de los mismos. De este modo, estos depredadores invertebrados podrían sólo controlar la abundancia de los rotíferos siempre y cuando su reproducción

estuviese limitada por la cantidad de alimento. Sin embargo, se ha observado, a concentraciones elevadas de alimento, que la reproducción de estos organismos podría estar limitada por la depredación de *Asplanchna* debido a una depredación selectiva sobre hembras ovígeras de rotíferos (CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998). En cualquier caso, el impacto que la depredación por copépodos podría ejercer sobre la fecundidad de los rotíferos apenas ha sido considerado en los estudios que han analizado el efecto de la depredación sobre la dinámica de las poblaciones naturales de estos organismos (LEBLANC *et ál.*, 1997).

En resumen, existe una multiplicidad de interacciones bióticas que pueden controlar las poblaciones de rotíferos en los sistemas naturales de forma independiente o de manera conjunta, algunas de las cuales están siendo muy discutidas en la actualidad. Por esta razón, uno de los principales problemas con los que se enfrenta la ecología es evaluar la interacción que existe entre los distintos factores que regulan las comunidades naturales y cuantificar su importancia relativa (DEVETTER, 1998). Es evidente que los estudios *in situ* son necesarios, pero los estudios de campo frecuentemente no son capaces por sí solos de identificar ciertos procesos críticos que pueden ocurrir dentro de una comunidad. Así pues, la realización paralela de experiencias de laboratorio con organismos procedentes del medio natural sin duda ayudan a esclarecer los procesos que tienen lugar en un determinado sistema, permitiendo probar hipótesis y dilucidar mecanismos de control. Como señalan CROWDER *et ál.* (1988), sólo la integración de trabajos de larga duración en medios naturales, con experimentos de laboratorio y mesocosmos de campo, junto con las predicciones de modelos, permitirá conocer de manera más precisa determinados procesos que tiene lugar en los ecosistemas acuáticos.

OBJETIVOS Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

El objetivo general de esta Tesis es evaluar la importancia de las múltiples interacciones bióticas que pueden regular la dinámica de las poblaciones de rotíferos en los sistemas acuáticos, mediante observaciones de campo en un sistema natural y el desarrollo paralelo de experiencias de laboratorio.

De acuerdo con este objetivo general, esta Tesis se estructura en los siguientes capítulos:

En el capítulo 2 se presenta un estudio de campo realizado en el embalse de Iznájar (Córdoba), realizando una campaña de muestreo intensiva, con el objetivo de evaluar la influencia de factores abióticos (p. ej. la temperatura), y bióticos (disponibilidad de alimento, competencia con cladóceros y depredación por copépodos), sobre la variación espacio-temporal de la abundancia y fecundidad de rotíferos.

En el capítulo 3 se analiza cómo la **cantidad de alimento** afecta al crecimiento de la especie de rotífero más abundante en el embalse de Iznájar: *Keratella cochlearis*. Se estudia la respuesta numérica de *K. cochlearis* alimentada con una especie algal flagelada (*Cryptomonas* sp.), ambas aisladas del embalse de Iznájar, con el objetivo de determinar parámetros de crecimiento poblacional de esta especie de rotífero en relación con la cantidad de alimento. Este estudio permitirá conocer los requerimientos alimenticios del rotífero y diseñar las distintas experiencias de laboratorio que se describen en los siguientes capítulos de esta Tesis.

En el capítulo 4 se analiza cómo la **calidad del alimento** afecta al rotífero *K. cochlearis*. Se analiza cómo la disponibilidad de nutrientes (nitrógeno y fósforo) afecta al crecimiento y composición elemental del alga flagelada *Cryptomonas* sp., y cómo su diferente calidad nutricional influye sobre diferentes parámetros de historia de vida del rotífero *K. cochlearis*, a baja y alta concentración de alimento. Además se estudia la resistencia al ayuno de esta especie de rotífero cuando se alimenta con células de *Cryptomonas* de diferente calidad nutricional.

En el capítulo 5 se estudia la **competencia** por *Daphnia* sobre *K. cochlearis*. Se evalúa la importancia relativa de la interferencia química entre *Daphnia longispina* y *Keratella cochlearis* respecto a los mecanismos de interacción más conocidos entre cladóceros y rotíferos, la competencia explotativa y la interferencia mecánica. Además se hace una primera caracterización del peso molecular de las sustancias exudadas por el cladóceros responsables de esta interferencia química.

En el capítulo 6 se analiza si la **depredación** por copépodos puede reducir directamente la fecundidad de *K. cochlearis*. Para ello se observa directamente el comportamiento de alimentación de las dos especies de copépodos más importantes en el embalse de Iznájar, *Lovenula alluaudi* (Calanoida) y *Acanthocyclops vernalis* (Cyclopoida), sobre hembras ovígeras de *K. cochlearis*.

Finalmente, en el capítulo 7 se presenta una síntesis general de los resultados obtenidos en esta Tesis discutiéndose de manera global, seguida por las conclusiones más relevantes obtenidas en este estudio.



2

Dinámica poblacional de rotíferos en un embalse meso-eutrófico: variación espacio-temporal de la fecundidad

INTRODUCCIÓN

La dinámica de las poblaciones de rotíferos en los sistemas naturales está controlada por diversos factores entre los que destacan la cantidad de alimento y la temperatura (EDMONSON, 1965; MAY, 1983; ARMENGOL *et ál.*, 1998; OOMS-WILMS *et ál.*, 1999; MERRIMAN & KIRK, 2000; CORDOVA *et ál.*, 2001). Numerosos estudios han mostrado también que las poblaciones de rotíferos pueden estar controladas a través de la competencia explotativa y la interferencia mecánica con grandes dáfnidos (>1.2 mm) (GILBERT, 1988a; LAMPERT & ROTHHAUPT, 1991; JACK & GILBERT, 1994; FRADKIN, 1995; SARNELLE, 1997; CONDE-PORCUNA *et ál.*, 1994), así como por la depredación por copépodos y rotíferos carnívoros (*Asplanchna*) (STEMBERGER & EVANS, 1984; WILLIAMSON, 1987; PLAßMANN *et ál.*, 1997; CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998; YOSHIDA *et ál.*, 2000; GREEN, 2001; DIEGUEZ & GILBERT, 2002).

YAN *et ál.* (1991) establecieron que la importancia de la depredación por invertebrados sobre el control de las poblaciones de rotíferos es dependiente de la producción de rotíferos. De este modo, los depredadores podrían ser capaces de controlar la abundancia de rotíferos si sus tasas de reproducción estuvieran limitadas por la cantidad de alimento. En este sentido, PAUL & SCHINDLER (1994) observaron que la baja disponibilidad de alimento en los lagos alpinos oligotróficos podría reducir las tasas reproductivas de los rotíferos lo suficiente

como para permitir el control de estas poblaciones por depredadores invertebrados (copépodos del género *Hesperodiptomus*). Sin embargo, CONDE-PORCUNA & DECLERCK (1998) sugirieron que las poblaciones de rotíferos podrían estar reguladas por depredadores en sistemas eutróficos, sin limitación alguna de alimento.

Los copépodos ciclópidos y calanoides depredan selectivamente sobre diferentes especies de rotíferos. Algunos estudios han mostrado que la vulnerabilidad de las distintas especies de rotíferos a ser depredados por copépodos depende más de las características morfológicas y respuestas de comportamiento de las presas que del tamaño de las mismas (JUDITH & HIRAM, 1979; WILLIAMSON, 1983; WILLIAMSON & BUTLER, 1986; WILLIAMSON, 1987; PLAßMANN *et ál.*, 1997). Estos estudios han señalado que las especies de cuerpo blando (p. ej. *Synchaeta*, *Polyarthra* y *Filinia*) son particularmente más vulnerables a la depredación por copépodos que las especies con tamaño similar provistas de una lóriga dura (p. ej. *Brachionus angularis*, *Keratella americana*, *Keratella cochlearis*). *Polyarthra*, a pesar del característico comportamiento evasivo que presenta al impulsarse rápidamente con sus apéndices laterales, es una presa muy preferida por copépodos ciclópidos (ADRIAN & FROST, 1992; DIEGUEZ & GILBERT, 2002). Sin embargo, aunque la presencia de una lóriga dura en algunas especies de rotíferos les proteja de la depredación por copépodos, los huevos de estos rotíferos lorigados no están protegidos por sus lórigas y, hasta el momento, se ha investigado muy poco sobre la interacción entre rotíferos grávidos y copépodos depredadores, y sus consecuencias sobre la fecundidad de los rotíferos. Sólo algunos estudios experimentales han señalado que los copépodos y *Asplanchna* pueden reducir la fecundidad del rotífero lorigado *Keratella cochlearis*, al consumir selectivamente sus huevos y/o hembras ovígeras de esta especie de rotífero (WILLIAMSON & BUTLER, 1986; CONDE-PORCUNA & SARMA, 1995; LEBLANC *et ál.*, 1997; CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998).

FROST *et ál.* (1988) consideran que cada investigación sobre una comunidad ecológica es el estudio de una versión muy resumida y simplificada de esa comunidad y, para compensar esta deficiencia, hay que procurar ser tan acertado como sea posible en la elección de las escalas apropiadas a los fines que persigue cada estudio. La elección de una escala concreta en la investigación de los ecosistemas acuáticos puede influir notablemente en la interpretación de los

procesos y de los patrones que ocurren dentro de una comunidad (véase p. ej. BERNER-FANKHAUSER, 1987). Así pues, para el estudio detallado de la dinámica del zooplancton en medios naturales, los intervalos de muestreo tienen que depender de los tiempos de generación de los organismos predominantes en el medio y, de este modo, si lo que se pretende estudiar es la dinámica poblacional de las especies de rotíferos presentes en un sistema, los muestreos deberían realizarse cada pocos días (BOTTRELL *et ál.*, 1976; BERNER-FANKHAUSER, 1987).

El objetivo de este capítulo es evaluar, mediante una intensa campaña de muestreo realizada en el embalse de Iznájar (Córdoba), la influencia de factores abióticos (p. ej. la temperatura) y bióticos (disponibilidad de alimento, competencia con grandes cladóceros y depredación por copépodos adultos), sobre la variación espacio-temporal de la abundancia y fecundidad de las especies de rotíferos más abundantes en este sistema.

MATERIAL Y MÉTODOS

El embalse de Iznájar (2500 Ha de área superficial y $980 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ de capacidad) está situado en el curso del río Genil, un afluente del río Guadalquivir, en el sur de España. Este embalse, según la concentración media anual estimada en superficie de clorofila-*a* total ($20.02 \mu\text{g L}^{-1}$) y de fósforo total ($49.63 \mu\text{g L}^{-1}$), junto con los valores medios de visibilidad del disco de Secchi (3.43 m) (CRUZ-PIZARRO *et ál.*, datos no publicados), podría catalogarse como meso-eutrófico (OCDE, 1982).

El periodo de estudio comprendió desde el 5 de abril hasta el 1 de junio de 1997, realizándose muestreos cada tres días entre las 12:00 y 14:00 horas locales. El punto de muestreo (profundidad aprox. 40 m) se situó en las proximidades de la presa en un ambiente de características esencialmente pelágicas y una boya señaló su posición durante el estudio. Durante este tiempo, las concentraciones de fósforo soluble reactivo (SRP) en la superficie del embalse fueron extremadamente bajas ($<1.45 \mu\text{g L}^{-1}$), con razones de nitrógeno total (NT) : fósforo total (PT) oscilando entre 996 y 224 (CRUZ-PIZARRO *et ál.*, datos no publicados).

Se recogieron muestras a tres profundidades (superficie, 4 y 10 metros) con una botella Niskin (8 litros), para cuantificar la concentración de clorofila-*a* correspondiente a la fracción algal <40 µm (fracción algal comestible por el zooplancton), y para caracterizar la comunidad zooplanctónica. También se midió la temperatura del agua *in situ* en cada una de las profundidades seleccionadas con una sonda "Windermer Profiler". El contenido en clorofila-*a* se determinó a partir de extractos metanólicos analizados según el método espectrofotométrico propuesto por TALLING & DRIVER (1961). La biomasa algal (mg C L⁻¹) se estimó multiplicando el contenido en clorofila-*a* (µg L⁻¹) por un factor de 0.03, asumiendo que la clorofila-*a* constituye, como media, un 3% del contenido en carbono de la materia orgánica de las algas (RIEMANN *et ál.*, 1989).

Las muestras de zooplancton (8 L de agua filtrados por una malla de 40 µm) se fijaron con formol (4%) azucarado para prevenir la pérdida de huevos de los organismos (HANEY & HALL, 1973), y posteriormente fueron cuantificadas en un microscopio invertido (Leitz Labovet). En la sistemática y taxonomía del zooplancton se han utilizado las claves de RUTTNER-KOLISKO (1974), KOSTE (1978) y SHIEL & KOSTE (1993) para los rotíferos, la de ALONSO (1996) para los cladóceros, y las de DUSSART (1967) y EINSLE (1993) para los copépodos. Después de cuantificar la abundancia de las diferentes especies zooplanctónicas se tomaron medidas de la longitud del cuerpo de cladóceros y copépodos (10-100 individuos por muestra) y de rotíferos (10-60 individuos por muestra) con un micrómetro ocular calibrado.

La biomasa de cladóceros y copépodos adultos se estimaron a partir de las densidades y del peso seco medio individual obtenido a partir de las siguientes fórmulas descritas por BOTTRELL *et ál.* (1976):

- ❖ *Daphnia longispina*: $\ln W = 1.37 + 2.5567 \times \ln L$
- ❖ *Bosmina longirostris*: $\ln W = 3.28 + 3.13 \times \ln L$
- ❖ Copépodos: $\ln W = 1.9526 + 2.3990 \times \ln L$

donde W es el peso seco medio individual (µg) y L es la longitud del cuerpo (mm). El peso seco de las diferentes especies de rotíferos se estimó a partir del volumen medio individual obtenido con las fórmulas descritas por POURRIOT & ROUGIER (1991) y BOTTRELL *et ál.* (1976), asumiendo una densidad de 1 (*i.e.*

$1 \mu\text{m}^3=10^{-6} \mu\text{g}$) y una relación peso seco/peso fresco de 0.039 para *Asplanchna priodonta* y de 0.1 para las demás especies de rotíferos (DOOHAN, 1973; DUMONT et ál., 1975).

En cada una de las muestras se enumeró también el número de huevos de las especies de rotíferos más abundantes en este sistema con el fin de estimar su fecundidad como la razón entre el número de huevos y el número de individuos.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa STATISTICA (StatSoft). Para evaluar el grado de asociación entre la abundancia y fecundidad de las especies de rotíferos más abundantes en el embalse, y la concentración de alimento disponible, la temperatura y la biomasa de grandes crustáceos (copépodos adultos y *Daphnia* ≥ 1.2 mm), se realizaron análisis de correlación de Pearson, transformándose previamente las variables logarímicamente para lograr una distribución normal de todas ellas. La normalidad de las variables se analizó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar valores medios de distintas variables entre dos periodos de tiempo se usaron pruebas *t* de Student, habiéndose comprobado previamente la normalidad de las variables y la homogeneidad de varianzas mediante una prueba de Bartlett (SOKAL & ROHLF, 1995). Y por último, para comparar valores medios de las variables entre dos profundidades se realizaron pruebas *t* de Student para muestras pareadas (SOKAL & ROHLF, 1995).

RESULTADOS

Descripción de la comunidad zooplanctónica

La comunidad zooplanctónica en el embalse de Iznájar durante la primavera de 1997 estuvo dominada, en términos de densidad, principalmente por rotíferos (Tabla 2.1.), si bien en términos de biomasa dominaron los crustáceos ($104.07 \pm 56.27 \mu\text{g L}^{-1}$ [desviación estándar]) sobre los rotíferos ($17.89 \pm 14.32 \mu\text{g L}^{-1}$). Las especies de rotíferos herbívoros más abundantes fueron *Keratella cochlearis* (con espina posterior), *Polyarthra vulgaris-dolichoptera* y *Synchaeta oblonga*. Entre los

crustáceos, se hicieron presentes sólo dos especies de cladóceros (*Daphnia longispina* y *Bosmina longirostris*), y tres especies de copépodos, dos ciclópodos (*Acanthocyclops vernalis* y *Tropocyclops prasinus*) y un calanoide (*Lovenula alluaudi*).

Tabla 2.1. Densidad media y máxima de las especies de zooplancton presentes en el embalse de Iznájar durante la primavera de 1997 (n=60).

	Media \pm D.E. (ind L ⁻¹)	Máxima (ind L ⁻¹)
Rotíferos		
<i>Keratella cochlearis</i> (con espina posterior)	84.75 \pm 92.05	457
<i>Polyarthra vulgaris-dolichoptera</i>	42.98 \pm 71.11	415
<i>Synchaeta oblonga</i>	25.78 \pm 67.29	331
<i>Asplanchna priodonta</i>	20.56 \pm 32.12	140
<i>Ascomorpha</i>	9.99 \pm 29.25	190
<i>Keratella cochlearis</i> (sin espina posterior)	4.14 \pm 9.69	56
<i>Phompholix</i>	3.95 \pm 4.62	17
<i>Keratella quadrata</i>	3.45 \pm 7.59	50
<i>Synchaeta pectinata</i>	3.02 \pm 3.79	16
<i>Polyarthra euryptera</i>	1.67 \pm 4.62	31
<i>Polyarthra major</i>	1.40 \pm 2.98	18
Cladóceros		
<i>Daphnia longispina</i>	9.54 \pm 9.85	38.63
<i>Bosmina longirostris</i>	2.86 \pm 5.12	23.00
Copépodos		
<i>Acanthocyclops vernalis</i>	16.34 \pm 17.71	81.90
<i>Lovenula alluaudi</i>	4.47 \pm 7.22	37.00
<i>Tropocyclops prasinus</i>	3.06 \pm 6.39	40.31

D.E.:desviación estándar.

La comunidad fitoplanctónica en este periodo estuvo dominada por algas verdes, criptofíceas y diatomeas (PÉREZ-MARTÍNEZ & SÁNCHEZ-CASTILLO, datos no publicados).

De las tres especies de rotíferos herbívoros más abundantes en el embalse de Iznájar, sólo *P. vulgaris-dolichoptera* y *K. cochlearis* estuvieron presentes durante

todo el periodo de estudio. *S. oblonga* alcanzó sólo densidades importantes durante la tercera semana de estudio, estando prácticamente ausente el resto del tiempo (Figura 2.1.). En cuanto a los crustáceos, las especies más importantes fueron *Daphnia* y los copépodos *Lovenula* y *Acanthocyclops*. Las otras especies, *Bosmina* y *Tropocyclops* no llegaron a tener repercusión destacable en la biomasa (Figura 2.2.).

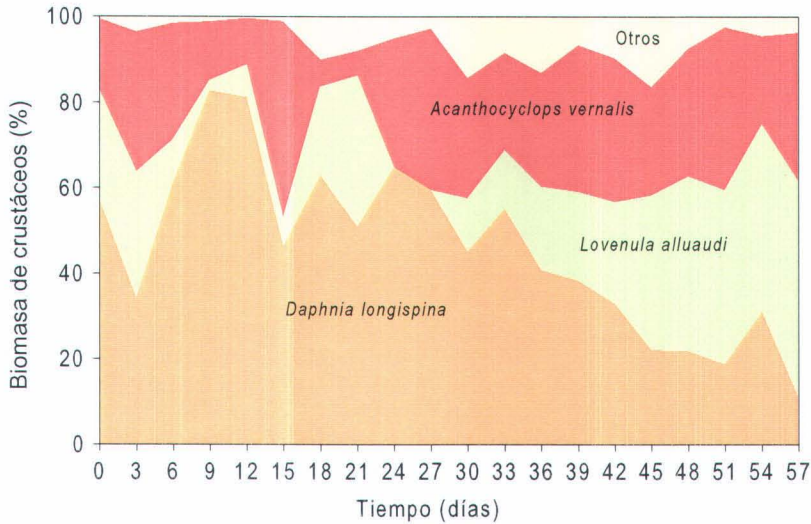


Figura 2.2. Contribución relativa de cladóceros y copépodos a la biomasa total de crustáceos durante la primavera de 1997 en el embalse de Iznájar.

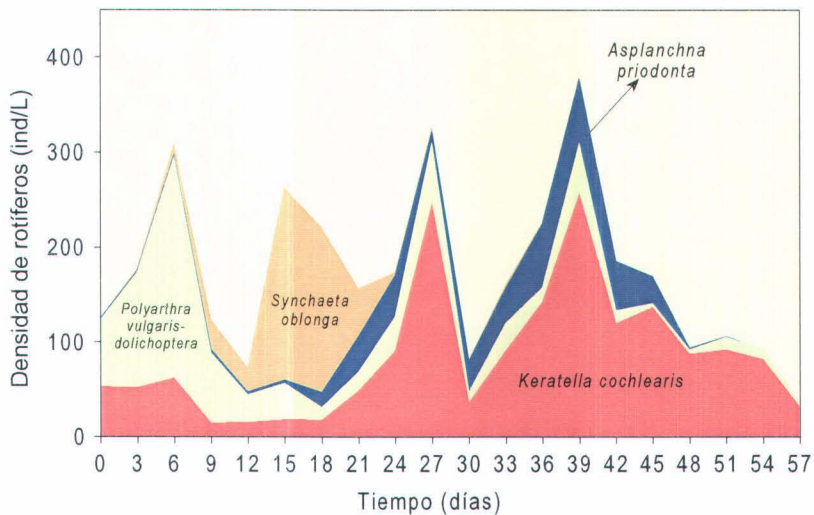


Figura 2.1. Abundancia media de las principales especies de rotíferos durante la primavera de 1997 en el embalse de Iznájar.

Análisis de la abundancia y fecundidad de las especies de rotíferos más abundantes

La abundancia de *K. cochlearis* mostró una correlación positiva significativa con la concentración de clorofila-*a* (<40 µm) y la temperatura del agua en este sistema (Tabla 2.2.). No se observaron correlaciones significativas entre la abundancia de esta especie de rotífero ni con la biomasa de los estadios adultos de los copépodos *Lovenula alluaudi* y *Acanthocyclops vernalis*, ni con la biomasa de grandes dáfhnidos. La abundancia de *Polyarthra vulgaris-dolichoptera* y de *Synchaeta oblonga* no correlacionaron con ninguna de las variables bióticas analizadas, ni tampoco con la temperatura (Tabla 2.2.).

Tabla 2.2. Correlaciones de Pearson entre las abundancias y fecundidades de rotíferos (*Keratella cochlearis*, *Polyarthra vulgaris-dolichoptera* y *Synchaeta oblonga*) y la concentración de clorofila-*a* (<40 µm), la temperatura, la biomasa de los estadios adultos de los copépodos *Lovenula alluaudi* y *Acanthocyclops vernalis* y la biomasa de los individuos de *Daphnia* >=1.2 mm, en el embalse de Iznájar.

	Ln Clorofila- <i>a</i> (n=60)	Temperatura (n=60)	Ln (Biomasa Copépodos) (n=33)	Ln (Biomasa <i>Daphnia</i>) (n=45)
Densidad de rotíferos				
Ln <i>Keratella</i>	0.51 *** (n=60)	0.60 *** (n=60)	0.33 ns (n=33)	0.12 ns (n=45)
Ln (<i>Polyarthra</i> + 1)	0.12 ns (n=59)	0.05 ns (n=59)	0.03 ns (n=32)	-0.16 ns (n=44)
Ln (<i>Synchaeta</i> + 1)	-0.09 ns (n=43)	-0.22 ns (n=43)	-0.22 ns (n=20)	-0.33 ns (n=34)
Fecundidad de rotíferos				
Ln (<i>Keratella</i> + 1)	0.10 ns (n=40)	-0.20 ns (n=40)	0.18 ns (n=21)	0.23 ns (n=26)
Ln (<i>Polyarthra</i> + 1)	0.36 ns (n=22)	0.17 (n=22)	-0.13 (n=10)	0.35 (n=15)

*** $p < 0.0001$; ns = no significativo, $p > 0.05$. Los análisis de correlación con las abundancias de rotíferos se restringieron a aquellos casos en que la densidad de individuos de cada especie era superior a cero, y las correlaciones con la fecundidad de rotíferos se restringieron a aquellos casos en que la densidad de individuos era superior a 30 ind L⁻¹. Además, las correlaciones con la biomasa de copépodos adultos y con la biomasa de *Daphnia* >=1.2 mm se restringieron también a los casos en que estas variables eran superiores a cero.

Por otro lado, las fecundidades de *Keratella* y de *Polyarthra* no mostraron correlaciones significativas ni con la concentración de clorofila-*a*, ni con la biomasa de los copépodos adultos y de los mayores individuos de *Daphnia*, ni tampoco con la temperatura (Tabla 2.2.). Estas correlaciones se restringieron a los casos en que la densidad de *Keratella* y *Polyarthra* eran superiores a 30 ind L⁻¹, para evitar posibles errores en la estima de sus fecundidades por baja densidad de individuos (CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998). En este estudio, la fecundidad de *Synchaeta oblonga* no se estimó porque esta especie de rotífero libera sus huevos en el agua, hundiéndose hacia capas más profundas, de manera que la estima de su fecundidad podría resultar errónea (STEMBERGER & GILBERT, 1987a).

Sin embargo, analizando más en detalle los valores de fecundidad de las especies de rotíferos, se observó que la correlación entre la fecundidad de *K. cochlearis* y la biomasa algal (<40 µm) podría ser dependiente de la abundancia de copépodos adultos. Dicha correlación era positiva para aquellos casos en que la biomasa de los estadios adultos de los copépodos era inferior a 5 µg L⁻¹ (Figura 2.3.). Cuando la biomasa de estos copépodos adultos alcanzaba valores superiores a 5 µg L⁻¹ la relación entre la fecundidad del rotífero y la biomasa algal dejaba de ser significativa ($r=-0.40$; $p>0.05$; Figura 2.3.). Estas correlaciones se

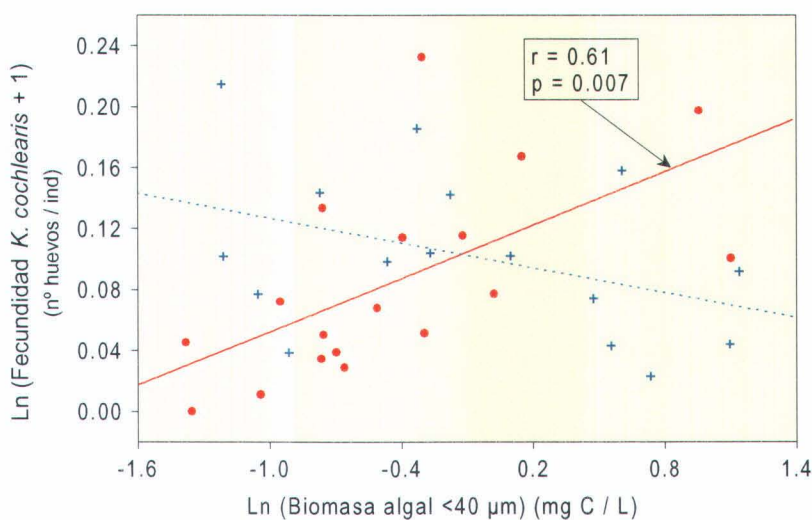


Figura 2.3. Correlaciones de Pearson entre la fecundidad de *K. cochlearis* y la biomasa algal (<40 µm) para valores de biomasa de copépodos adultos <5 µg L⁻¹ (círculos rojos) y > 5 µg L⁻¹ (cruces azules). Las correlaciones se restringieron a los casos en que la densidad de *Keratella* era superior a 30 ind L⁻¹ y la biomasa algal superior a 0.25 mg C L⁻¹.

restringieron a los casos en que la densidad de *K. cochlearis* era superior a 30 ind L⁻¹. En cualquier caso, se obtuvieron resultados similares cuando se consideraron todas las densidades de *K. cochlearis* para biomasa de copépodos inferior a 5 µg L⁻¹ (n=26; r=0.52; p=0.006) y superior a 5 µg L⁻¹ (n=25; r=-0.28; p>0.05). Además, todas estas correlaciones se restringieron también a aquellos momentos del periodo de estudio en que la biomasa algal comestible por el zooplancton era superior a 0.25 mg C L⁻¹. Esta concentración de alimento podría ser lo suficientemente elevada como para que la población de *K. cochlearis* no esté limitada por la cantidad de alimento en este sistema, ya que una concentración de 0.44 µg peso seco ml⁻¹ (i.e. ~0.22 mg C L⁻¹, asumiendo que el contenido de carbono en las algas de agua dulce es aproximadamente el 50% de su peso seco [REYNOLDS, 1984]) permite tasas de crecimiento máximas muy altas (~0.30 ind d⁻¹) para *Keratella cochlearis* (véase KIRK & GILBERT, 1990).

En cuanto a la fecundidad de *Polyarthra*, no se observó ninguna correlación significativa entre esta y la biomasa algal, ni cuando la biomasa de copépodos adultos era inferior a 5 µg L⁻¹ (r=0.34; p>0.05; n=12), ni cuando era superior a 5 µg L⁻¹ (r=0.33; p>0.05; n=10). Estas correlaciones también se restringieron a los casos en que la densidad de *Polyarthra* era superior a 30 ind L⁻¹.

Variación espacio-temporal de la abundancia y fecundidad de *K. cochlearis*

Debido a que la población de *Polyarthra vulgaris-dolichoptera* alcanzó sólo densidades importantes durante la primera semana de estudio (Figura 2.1.) y, dada la ausencia de relación entre su fecundidad y la cantidad de alimento, este trabajo se centrará en *K. cochlearis* para analizar la distribución espacio-temporal de su abundancia y fecundidad en relación con la disponibilidad de alimento, la temperatura y la presencia de grandes crustáceos (copépodos adultos y *Daphnia* >=1.2 mm), por ser la especie de rotífero más abundante y persistente durante el periodo de estudio en el embalse de Iznájar.

Los valores medios de clorofila-a y biomasa de copépodos adultos de *Lovenula* y *Acanthocyclops* mostraron valores más altos al final del estudio, sugiriendo la existencia de dos periodos diferentes (Figura 2.4.). Una prueba *t* de Student

(Tabla 2.3.) reflejó que la concentración de clorofila-*a*, la biomasa de estos copépodos adultos y la temperatura fueron significativamente más altas en el periodo comprendido entre los días 39-57 de este estudio (periodo 2) que en el periodo comprendido entre los días 0-36 (periodo 1). La fecundidad de *Keratella* y la biomasa de los individuos de *Daphnia* ≥ 1.2 mm no mostraron diferencias significativas entre ambos periodos (Tabla 2.3.).

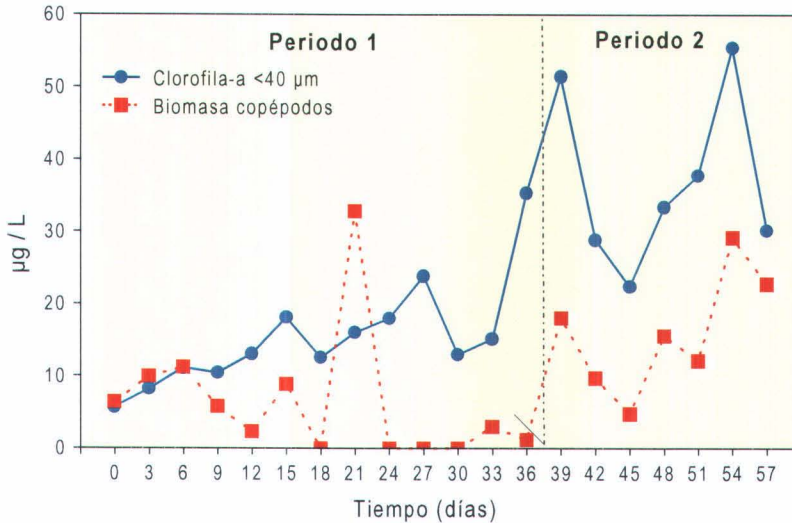


Figura 2.4. Variación temporal de los valores medios de clorofila-*a* (<40µm) y biomasa de copépodos adultos (*Lovenula alluaudi* y *Acanthocyclops vernalis*) durante la primavera de 1997 en el embalse de Iznájar.

Tabla 2.3. Valores medios \pm desviación estándar de la fecundidad de *K. cochlearis* (nº huevos ind⁻¹), concentración de clorofila-*a* <40 µm (µg L⁻¹), biomasa de copépodos adultos (µg L⁻¹), biomasa de individuos de *Daphnia* ≥ 1.2 mm (µg L⁻¹) y temperatura (°C), para cada periodo considerado. Los valores medios entre periodos se compararon mediante pruebas *t* de Student.

	Periodo 1 (n=13)	Periodo 2 (n=7)	<i>t</i>	g.l.	<i>p</i>
Fecundidad de <i>Keratella</i>	0.12 \pm 0.06	0.11 \pm 0.05	0.24	18	ns
Clorofila-<i>a</i> <40 µm	15.45 \pm 7.59	37.08 \pm 12.18	-4.93	18	<0.001
Biomasa de copépodos	6.29 \pm 8.95	16.04 \pm 8.21	-2.39	18	<0.05
Biomasa de <i>Daphnia</i>	20.60 \pm 9.82	16.32 \pm 17.29	0.71	18	ns
Temperatura	17.13 \pm 0.93	19.03 \pm 0.57	-4.88	18	<0.001

ns: no significativo, $p > 0.05$. g.l.: grados de libertad.

La composición taxonómica de la comunidad fitoplanctónica también mostró diferencias entre ambos periodos. En el periodo 1 predominaron algas verdes (*Oocystis* sp. y *Coelastrum* sp.), mientras que en el periodo 2 las algas verdes perdieron relevancia en favor de diatomeas (*Cyclotella* sp., *Melosira* sp. y *Fragilaria* sp.), criptofíceas (*Cryptomonas* sp. y *Rhodomonas minuta*) y otros grupos algales (PÉREZ-MARTÍNEZ & SÁNCHEZ-CASTILLO, datos no publicados).

Las diferencias significativas descritas para la concentración de clorofila-*a*, la temperatura y la biomasa de copépodos adultos entre los dos periodos considerados, además del cambio en la composición taxonómica de la comunidad algal, podrían determinar cambios en la dinámica poblacional de *K. cochlearis* en este sistema entre uno y otro periodo. Por esta razón, se analiza en detalle la posible influencia de la disponibilidad de alimento y la presencia de copépodos depredadores sobre la distribución espacio-temporal de la fecundidad de *Keratella* en cada uno de estos periodos.

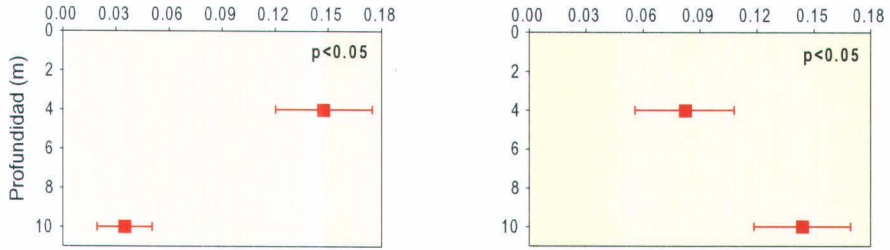
Para aquellos momentos en que la biomasa algal $<40 \mu\text{m}$ era superior a 0.25 mg C L^{-1} , la fecundidad de *K. cochlearis* no mostró diferencias significativas entre superficie y 4 m de profundidad, ni durante el periodo 1 (0 m: 0.129 ± 0.031 [error estándar]; 4 m: 0.133 ± 0.025 ; $t=-0.10$, g.l.=11, $p=0.09$), ni durante el periodo 2 (0 m: 0.099 ± 0.026 ; 4 m: 0.113 ± 0.028 ; $t=-0.77$, g.l.=6, $p=0.47$). Sin embargo, la fecundidad de *Keratella* sí mostró diferencias significativas entre 4 m y 10 m, tanto en el periodo 1 como en el periodo 2, aunque con un patrón de distribución diferente entre ambos periodos (Fig. 2.5a.).

Con el objetivo de analizar la posible influencia de la depredación por copépodos y de la competencia con grandes dáfñidos sobre la distribución vertical de la fecundidad de *K. cochlearis* en este sistema, en aquellos momentos en que la biomasa algal no era limitante para el crecimiento del rotífero, se realizaron análisis pareados entre profundidades. Ya que el número de casos comparables entre superficie y 4 m y, entre 4 m y 10 m no coincidieron, para simplificar los análisis estadísticos y su interpretación, este estudio se centrará en intentar explicar las diferencias de fecundidad existentes entre 4 m y 10 m de profundidad en ambos periodos.

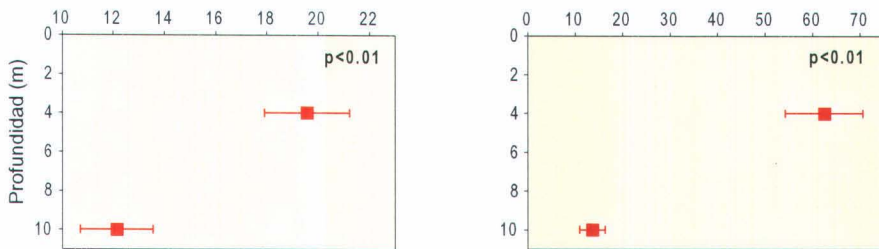
PERIODO 1

PERIODO 2

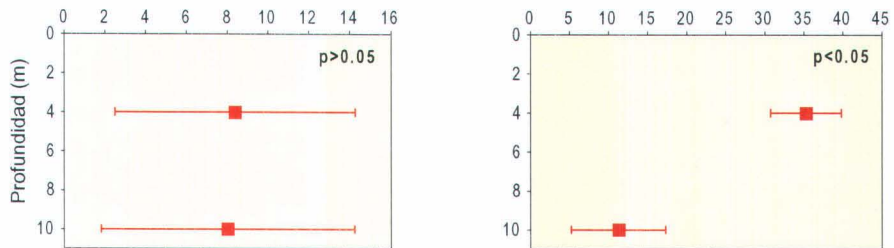
a) Fecundidad de *K. cochlearis* (nº huevos/ind)



b) Clorofila-a <40 µm (µg/L)



c) Biomasa de copépodos adultos (µg/L)



d) Ln (Densidad de *K. cochlearis*) (ind/L)

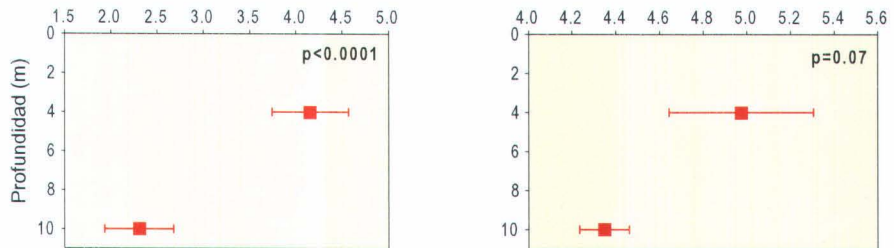


Figura 2.5. Valores medios (\pm error estándar) para cada periodo de la fecundidad de *K. cochlearis* (a), concentración de clorofila-a <40µm (b), biomasa de copépodos adultos (c), y densidad de *K. cochlearis* (d), a 4 m y 10 m de profundidad. Las diferencias entre profundidades se analizaron mediante una prueba t de Student para muestras pareadas. Los análisis eran restringidos para valores de biomasa algal (< 40 µm) superiores a 0.25 mg C L⁻¹ (periodo 1, n=8; periodo 2, n=5).

En el periodo 1, la fecundidad de *Keratella* fue significativamente más alta a 4 m que a 10 m (Figura 2.5a.), donde a su vez era más alta la concentración de clorofila-*a* (Figura 2.5b.) y la temperatura (17.7°C vs. 16.2°C; $p < 0.05$). Ni la biomasa de copépodos adultos (Figura 2.5c.), ni la biomasa de los individuos de *Daphnia* con longitud ≥ 1.2 mm, mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre 4 m y 10 m en este periodo. De hecho la fecundidad de *Keratella* estuvo correlacionada con la concentración de clorofila-*a* en el periodo 1 ($n=26$; $r=0.41$; $p < 0.05$), pero no así en el periodo 2 ($p > 0.05$). La fecundidad de *Keratella* no estuvo correlacionada con la temperatura en ningún periodo ($p > 0.05$).

En el periodo 2, la fecundidad de *Keratella* invirtió su máximo de profundidad, siendo significativamente más baja a 4m que a 10 m (Figura 2.5a.). Sin embargo, la concentración de clorofila-*a* (Figura 2.5b.) y la temperatura (19.2°C vs. 17.9°C; $p < 0.01$) seguían siendo significativamente más altas a 4 m que a 10 m. Por el contrario, la biomasa de copépodos adultos fue, en este caso, significativamente más alta a 4 m que a 10 m (Figura 2.5c.). Por su parte, la biomasa de los individuos de *Daphnia* con longitud ≥ 1.2 mm resultó ser significativamente más alta a 10 m en este periodo ($p < 0.05$). La distribución vertical de la población de *Keratella* no cambió de forma apreciable entre ambos periodos (Figura 2.5d.).

DISCUSIÓN

Las correlaciones observadas entre la fecundidad de *Keratella* y la biomasa algal (Figura 2.3.) sugieren, que en este sistema, la importancia relativa del alimento sobre la fecundidad de *Keratella* podría verse reducida en los momentos en que la biomasa de los estadios adultos de los copépodos depredadores (*Lovenula alluaudi* y *Acanthocyclops vernalis*) alcanza valores más altos, incluso cuando la biomasa algal no está en concentraciones limitantes para el crecimiento de *Keratella*. No obstante, sería necesario corroborar si una concentración de alimento de 0.25 mg C L^{-1} es lo suficientemente elevada como para que una población de *K. cochlearis* procedente del embalse de Iznájar pueda alcanzar elevadas tasas de crecimiento poblacional.

Las interacciones entre poblaciones están fuertemente influenciadas por la distribución espacial de las especies, de forma que las interacciones de competencia y depredación de crustáceos sobre rotíferos pueden intensificarse como consecuencia de un solapamiento espacial en la columna de agua entre los distintos taxones (SIH, 1987; MACISAAC & GILBERT, 1990; WILLIAMSON, 1993; GONZÁLEZ, 1998). En este sentido, el solapamiento espacial observado entre la población de *Keratella* y los copépodos adultos en el periodo 2 podría haber intensificado el efecto de la depredación selectiva sobre hembras reproductivas de *K. cochlearis*, o bien sobre los huevos de estas hembras, y por tanto, la importancia de la concentración de alimento y la temperatura sobre el patrón de distribución vertical de la fecundidad de esta especie de rotífero podría haber disminuido. Varios estudios experimentales han puesto de manifiesto que especies de copépodos ciclópodos y calanoides (*Diacyclops thomasi* y *Diatomus pallidus*) depredan selectivamente los huevos de *Keratella cochlearis* sin consumir a las hembras que portan esos huevos (WILLIAMSON & BUTLER, 1986; LEBLANC *et al.*, 1997). CONDE-PORCUNA & SARMA (1995) también mostraron, en un estudio de laboratorio, que el rotífero carnívoro *Asplanchna girodi* se alimentaba selectivamente sobre hembras reproductivas de *K. cochlearis*. En situaciones naturales también se ha observado que *Asplanchna brightwelli* depredaba selectivamente sobre hembras reproductivas de *K. cochlearis* en un sistema eutrófico, reduciendo así la fecundidad del rotífero (CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998). En consecuencia, estos depredadores invertebrados podrían reducir la densidad poblacional de los rotíferos, directamente, al aumentar las tasas de mortalidad, e indirectamente, al reducir las tasas de natalidad de estos organismos (CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998).

Por otro lado, la migración vertical diaria puede representar un mecanismo efectivo que minimice el riesgo de depredación por depredadores visuales y táctiles (STICH & LAMPERT, 1981; GLIWICZ, 1986; LAMPERT, 1989). Estos movimientos verticales pueden variar entre especies de rotíferos (STEWART & GEORGE, 1987; GONZÁLEZ, 1998; ARMENGOL & MIRACLE, 2000). Algunos estudios han mostrado que *K. cochlearis* carece de este comportamiento de migración vertical en lagos profundos (RUTTNER-KOLISKO, 1975; BEGG, 1976; PIVODA, 1977; GONZÁLEZ, 1998). Sin embargo, otros estudios han señalado que esta especie de rotífero puede migrar verticalmente en lagos someros (CRUZ-PIZARRO, 1978; WILLIAMSON & MAGNIEN, 1982). STEWART & GEORGE (1987) mostraron que

la amplitud de migración para *K. cochlearis* era muy baja (0.48-1.49 m). GALKOVSKAYA & MITYANINA (1989) también señalaron que los movimientos migratorios de *K. cochlearis* son muy pequeños. De acuerdo con esto, en este estudio, la migración de esta especie de rotífero entre 4 m y 10 m de profundidad podría considerarse despreciable.

Las concentraciones extremadamente bajas de SRP registradas en la superficie del embalse de Iznájar ($<1.45 \mu\text{g L}^{-1}$), junto con las elevadas razones NT:PT estimadas también en la superficie del embalse sugieren que, durante el tiempo en que se llevó a cabo esta investigación, este sistema estaba limitado en P. Estas condiciones limitantes de P, además del cambio observado en la composición taxonómica de la comunidad algal en el periodo 2, podrían llevar asociado un cambio en la calidad nutricional del fitoplancton que podría haber influido sobre la dinámica de las poblaciones de rotíferos, con independencia de la depredación por copépodos. Sin embargo, en este estudio desgraciadamente no se disponen de datos suficientes de disponibilidad de nutrientes que permitan evaluar la posible influencia de la calidad de los recursos alimenticios sobre la dinámica de las poblaciones de rotíferos en este sistema. CONDE-PORCUNA *et ál.* (2002) han sugerido que *K. cochlearis* es una especie muy susceptible a la limitación de P en un embalse mesotrófico donde la concentración de alimento parece tener una influencia menor sobre dicha especie. Sin embargo, recientemente SELIG *et ál.* (2002) han señalado que la concentración de SRP puede no ser adecuada para describir la disponibilidad real de P para el crecimiento algal en un sistema natural debido a que la determinación de la concentración de fosfato inorgánico como fosfato reactivo al azul de molibdeno (SRP), sobreestima el contenido en ortofosfato realmente disponible para las algas al incluir también fósforo orgánico disuelto y polifosfato inorgánico que son hidrolizados a fosfato reactivo durante el procedimiento analítico (BURTON, 1973). SELIG *et ál.* (2002) ponen de manifiesto que puede ser muy difícil determinar cómo la limitación de nutrientes influye en el crecimiento del fitoplancton en sistemas naturales. De este modo, resultará también difícil evaluar cómo la diferente calidad nutricional de las algas puede influir sobre la dinámica de las poblaciones zooplanctónicas en dichos sistemas naturales, siendo necesario, por tanto, realizar estudios experimentales para clarificar estos aspectos.

En resumen, en este capítulo se muestra que en el embalse de Iznájar la distribución vertical de los valores de fecundidad de *Keratella* podría estar regulada no sólo por la disponibilidad de alimento, sino que también podría estar controlada por depredadores invertebrados. Además, se ha observado que la depredación por copépodos parece reducir la fecundidad de *Keratella* pero no la densidad de dicho rotífero, al menos de forma aparente. Esto sugiere que los copépodos podrían tender a consumir los huevos de *Keratella* y no a las propias hembras que transportan estos huevos. La competencia y/o interferencia por grandes cladóceros parece no tener importancia sobre la distribución vertical de la fecundidad de *Keratella* en este embalse. Los estudios experimentales realizados en los siguientes capítulos con organismos aislados del embalse de Iznájar permitirán corroborar o matizar todas las observaciones obtenidas en el campo.



3

Influencia de la cantidad de alimento sobre el crecimiento poblacional de *Keratella cochlearis*

INTRODUCCIÓN

Las respuestas numéricas de rotíferos en cultivos de laboratorio generalmente se caracterizan por un aumento curvilíneo con la concentración de alimento que se aproxima asintóticamente a una tasa máxima de crecimiento poblacional. Este tipo de relación es similar a una respuesta funcional ecológica de tipo II de Holling (HOLLING, 1959). MONOD (1950) aplicó una función idéntica para describir el crecimiento bacteriano sobre un sustrato. Se ha puesto de manifiesto que diferentes funciones matemáticas, que relacionan el consumo con la concentración de alimento en ecología, tienen una expresión equivalente a la que describe el crecimiento bacteriano. En este sentido, el crecimiento de las poblaciones de rotíferos en cultivos se ha descrito utilizando una forma modificada de la función de Monod antes mencionada, introduciendo el parámetro de concentración umbral (ROTHHAUPT, 1990b, 1993). Esta concentración de alimento umbral, definida como la concentración de alimento en la que la tasa de crecimiento neto de una población es cero, es un parámetro de crecimiento poblacional fundamental ya puede tener grandes implicaciones ecológicas sobre el resultado de la competencia entre especies que explotan recursos comunes, y en consecuencia, sobre la estructura de las comunidades zooplanctónicas (LAMPERT & SCHÖBER, 1980; STEMBERGER & GILBERT, 1985; STELZER, 1998; CIROS-PÉREZ *et ál.*, 2001).

En rotíferos, el primer estudio comparativo sobre la relación entre la concentración de alimento umbral y el tamaño del cuerpo de estos organismos fue realizado por STEMBERGER & GILBERT (1985). Estos autores determinaron que el nivel de alimento umbral variaba por un factor de 17 entre ocho especies de rotíferos estudiadas, y observaron que existía una relación positiva entre la concentración de alimento umbral y la masa del cuerpo de los rotíferos, en contraposición con la relación negativa que se predice de acuerdo con las asunciones de la "hipótesis del tamaño-eficiencia" (BROOKS & DODSON, 1965; HALL *et ál.* 1976; THRELKED, 1976; GERRITSEN, 1984). Una de las principales asunciones de esta hipótesis es que la ganancia de energía neta, es decir, la diferencia entre ingestión de energía y metabolismo, aumenta de forma desproporcionada al aumentar el tamaño del cuerpo. En consecuencia, las especies más grandes deberían tener una ventaja competitiva sobre las más pequeñas y deberían dominar cuando los recursos alimenticios son escasos, siempre y cuando no estuviesen sometidas a una depredación selectiva. Este argumento se ha usado en muchas ocasiones para explicar porqué los rotíferos y pequeños cladóceros dominan las comunidades zooplanctónicas cuando los grandes herbívoros como *Daphnia* son depredados selectivamente por peces. STEMBERGER & GILBERT (1987b) mostraron evidencias de que esta relación positiva entre la concentración de alimento umbral y la masa del cuerpo en rotíferos podría ser explicada por una menor velocidad de natación específica de la masa (distancia desplazada por unidad de tiempo y por unidad de masa) al aumentar el tamaño del cuerpo de estos organismos. En consecuencia, las especies de rotíferos más pequeñas deberían tener, por unidad de masa, tasas máximas de aclaramiento más altas, y por tanto, mayores tasas de ingestión de energía que las especies de rotíferos más grandes, de manera que la ganancia de energía neta decrece al aumentar el tamaño del cuerpo de estos organismos a bajas concentraciones de alimento.

En el estudio de STEMBERGER & GILBERT (1985) *Keratella cochlearis* se caracterizó por presentar el nivel de alimento umbral más bajo de las ocho especies de rotíferos estudiadas ($0.06 \mu\text{g}$ peso seco ml^{-1} de *Rhodomonas minuta*). Sin embargo, los niveles umbrales no son constantes específicas de especie y pueden cambiar a lo largo de varios gradientes ambientales. Por ejemplo, ROTHHAUPT (1990a, 1990b) encontró que la eficiencia de alimentación de especies de *Brachionus* depende del tamaño de partícula, y en consecuencia los

umbrales varían con el tamaño del alimento. Además, la diferente calidad nutricional entre taxones algales afecta a la tasa de crecimiento poblacional de los rotíferos (STEMBERGER & GILBERT, 1985; ROTHHAUPT, 1990b, 1990c; CIROS-PÉREZ *et ál.*, 2001). También se ha visto que la presencia de material arcilloso, la temperatura, y diferencias entre clones de la misma especie pueden determinar cambios en las tasas de crecimiento de rotíferos, y por tanto en las concentraciones de alimento umbral (véase p. ej. KIRK & GILBERT, 1990; STELZER, 1998).

Se ha descrito que *Keratella cochlearis* es una especie generalista pudiendo ingerir eficientemente bacterias, detritus y pequeñas algas no flageladas (GILBERT & BOGDAN, 1981, 1984). Sin embargo, varios estudios han mostrado que las algas flageladas, especialmente *Cryptomonas* y *Rhodomonas*, parecen ser de mayor calidad para el crecimiento de esta especie de rotífero (POURRIOT, 1963, 1977; LINDSTROM & PEJLER, 1975; PEJLER, 1977; STEMBERGER, 1981; STEMBERGER & GILBERT, 1985; MERRIMAN & KIRK, 2000). De hecho, en sistemas naturales se han observado correlaciones positivas entre la natalidad de poblaciones de *Keratella cochlearis* y la abundancia de varias especies de criptofíceas y crisofíceas (EDMONSON, 1965; ZIMMERMANN, 1974). POURRIOT (1963) observó como *K. cochlearis* capturaba células de *Cryptomonas* cogiéndolas por el flagelo, sugiriendo que este organelo podría facilitar la captura de estas células, y permitir a *Keratella* ingerir grandes *Cryptomonas*.

El objetivo de este capítulo es analizar la influencia de la cantidad de alimento (*Cryptomonas* sp.) sobre el crecimiento poblacional de un clon de *Keratella cochlearis*, utilizado en todos los experimentos de laboratorio que aborda esta Tesis, con el fin de estimar los siguientes parámetros de crecimiento poblacional: concentración de alimento umbral (C_0) y tasa máxima de crecimiento poblacional (r_{max}). Rotífero y alga fueron aislados del mismo sistema (embalse de Iznájar).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de *Cryptomonas*

La criptofícea *Cryptomonas* sp. ($777 \mu\text{m}^3$; $16 \mu\text{m} \times 9.5 \mu\text{m}$), aislada del embalse de Iznájar, se cultivó en continuo con medio Z8 estándar (SKULBERG & SKULBERG, 1990), y ha sido utilizada como fuente de alimento para *Keratella cochlearis* en todas las experiencias de laboratorio que aborda esta Tesis.

El cultivo de *Cryptomonas* (Figura 3.1.) se mantuvo en una habitación aislada a $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$, con una radiación fotosintéticamente activa de $\sim 90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y con un ciclo luz:oscuridad de 14:10 h. Para homogenizar la entrada de medio de cultivo fresco, el cultivo se agitaba con un agitador magnético (Heidolph MR 3000) a 100 rpm, durante 15 min, cada 6 horas. No se podía someter a una agitación continua ya que observaciones preliminares mostraron que una agitación constante no era favorable para el crecimiento de esta cepa de *Cryptomonas*. OJALA (1993) observó también que algunas especies de *Cryptomonas* no pueden crecer bien bajo una agitación continua. La aireación del cultivo era por tanto superficial, sin crear burbujeo.

El cultivo de *Cryptomonas* era unialgal pero no axénico. Se ha descrito que las especies de criptofíceas no toleran los antibióticos (p. ej. estreptomycin sulfato, penicilina G, cloranfenicol, kanamicin sulfato, gentamicina), incluso durante periodos cortos, en concentraciones que son tóxicas para las bacterias (GUILLARD, 1973; HOSHAW & ROSOWSKI, 1973; LINDL & BAUER, 1994). Así pues, para concentrar las células de *Cryptomonas*, y poder reducir a su vez la biomasa de bacterias, se aprovechó el comportamiento fototáctico positivo observado en el cultivo, pues estas células algales no sobrevivían después de centrifugar ($12\ 000 \times g$ durante 5 min.). La fototaxis es característica en algunas especies de agua dulce de algas flageladas como *Cryptomonas* (RHIEL *et ál.*, 1988a, 1988b). Después de cosechar del cultivo en botes estériles, éstos se dejaban en reposo con una fuente de luz próxima, de tal forma que después de 1-2 h se podía observar una mancha oscura bien diferenciada, donde las células de *Cryptomonas* se habían concentrado. Las células concentradas de manera natural se cogían con una pipeta estéril, y posteriormente se diluían en agua mineral.

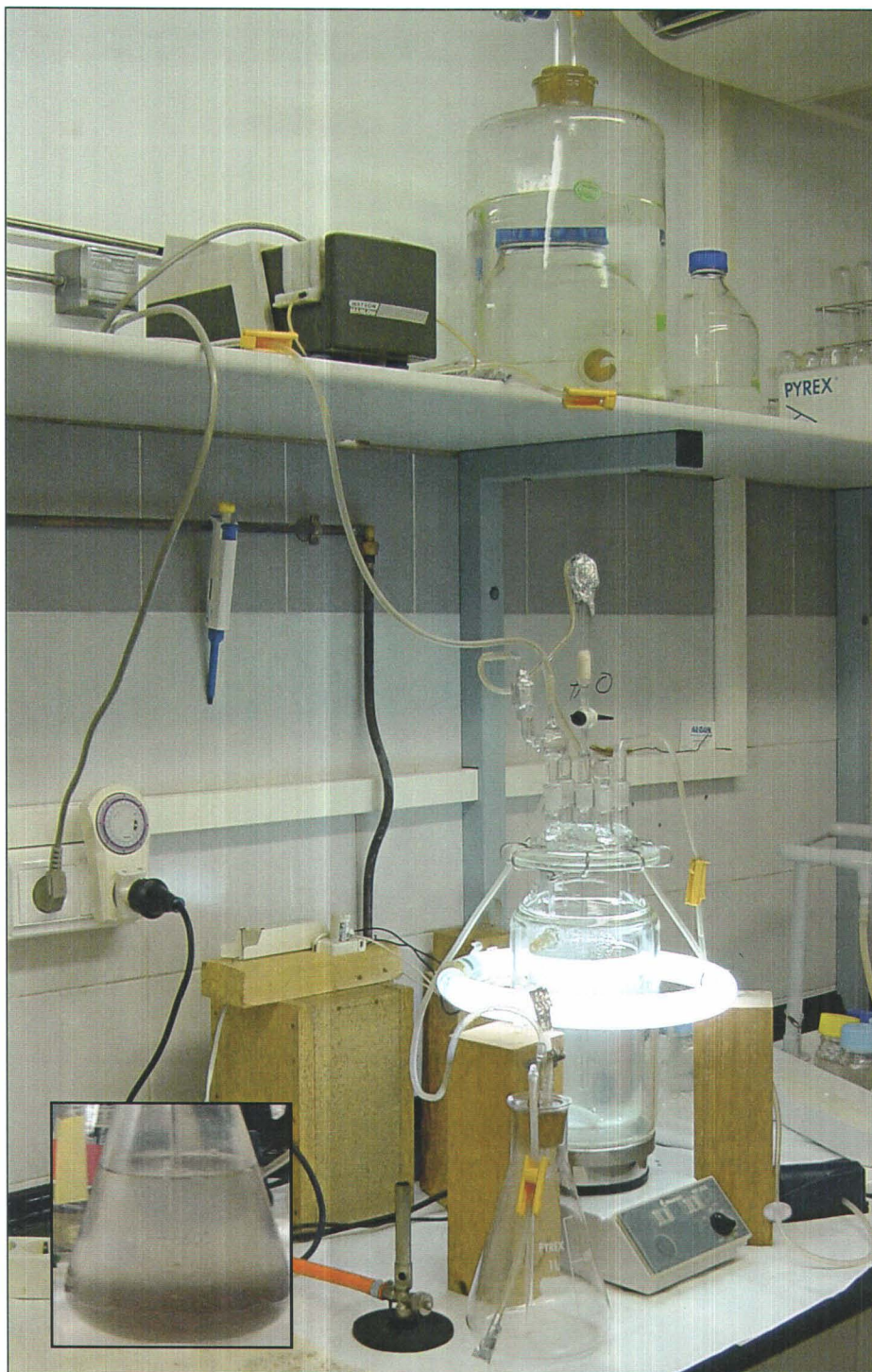


Figura 3.1. Cultivo continuo de *Cryptomonas* sp. en medio Z8 estándar en su primer día de funcionamiento. A la izquierda se muestra un detalle de la densidad celular alcanzada en fase estacionaria ($\sim 100\ 000\ \text{cel}\ \text{ml}^{-1}$). Sala de cultivos del Instituto del Agua (Universidad de Granada).

El contenido en carbono de las células de *Cryptomonas* se estimó con un analizador elemental (2400 CHN, Perkin Elmer). Para ello, se filtró un volumen con una densidad celular conocida sobre filtros de fibra de vidrio (Wathman GF/C) precombustionados (2 h a 550°C). El análisis se llevó a cabo por duplicado y los filtros se almacenaron a -20°C hasta su análisis. El contenido en carbono de las células de *Cryptomonas* cultivadas en continuo con medio Z8 estándar fue de 261 ± 22 (desviación estándar) $\mu\text{g C cel}^{-1}$.

También se estimó directamente el peso seco de *Cryptomonas* filtrando un volumen de cultivo, con densidad celular conocida, sobre filtros de fibra de vidrio (Wathman GF/C) previamente lavados con agua Milli-Q, secados en una estufa a 60°C durante 24 horas y pesados con una microbalanza (METTLER UMT2). Después de la filtración, los filtros se secaron de nuevo a 60°C durante 24 horas, y el peso seco se estimó como la diferencia entre ambas pesadas. Se hicieron 5 réplicas.

Cultivo de *Keratella cochlearis*

Keratella cochlearis (con espina posterior) se aisló del embalse de Iznájar en 1997 y se estableció un clon a partir de una sola hembra partenogenética. La longitud media del cuerpo de *K. cochlearis* en los cultivos era 105 ± 3.63 (desviación estándar) μm , y la longitud media de la espina posterior 48.5 ± 5.93 μm . Los cultivos *stock* de *Keratella* se mantenían en frascos de cristal con 500 ml de agua mineral, en una cámara con temperatura controlada (memmert ICP 400-800) a 20 ± 0.5 °C, con una radiación de $\sim 20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y con un ciclo luz:oscuridad de 14:10 h. *Keratella* se alimentaba rutinariamente con *Cryptomonas* ($\sim 0.2 \text{ mg C L}^{-1}$; $\sim 700\text{-}800 \text{ cel ml}^{-1}$) cada 1-2 días, y el medio se renovaba parcialmente ($\sim 25\%$) cada semana.

Respuesta numérica de *K. cochlearis*

Se estudió la tasa de crecimiento de una población de *Keratella cochlearis* a 6 concentraciones de alimento: 0.026, 0.157, 0.261, 0.522, 1.044 y 2.088 mg C L^{-1} del alga *Cryptomonas* sp. (equivalente a 100, 600, 1000, 2000, 4000 y 8000 cel ml^{-1}). La densidad celular de *Cryptomonas* se estimaba, después de cosechar

del cultivo continuo, sedimentando una alícuota de 100-500 μl en una cámara Uthermöhl. Las células se fijaban con una gota de lugol acético y se añadía agua destilada para completar el volumen de la cámara (~ 3 ml). Después de sedimentar durante 30 minutos (tiempo suficiente para que sedimentaran todas las células), se hacía el recuento de 25-30 campos, elegidos al azar recorriendo toda la superficie de la cámara. Para ello se utilizó un microscopio invertido (Leitz, Fluovert FU) a 200 aumentos. La abundancia celular siempre se estimaba por duplicado para poder obtener una abundancia media. En el caso de que la desviación típica de los dos conteos fuese superior al 10% de la media, se procedía a un tercer conteo para conseguir una mayor precisión en la estima. El cálculo de la abundancia celular se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$\text{cel ml}^{-1} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células}}{\text{n}^{\circ} \text{ campos}} \times \frac{\text{Sup. cámara}}{\text{Sup. campo}} \times \frac{1}{V}$$

donde Sup. es superficie (mm^2) y V es el volumen de muestra sedimentada (ml).

La densidad inicial de rotíferos en el experimento fue de 5 individuos sin huevo en 5 ml de agua mineral con *Cryptomonas*. Los individuos procedían del cultivo *stock* mantenido en el laboratorio en las condiciones señaladas anteriormente. Se hicieron 4 réplicas para cada concentración de alimento. Los animales fueron incubados en microplacas de poliestireno (IWAKI) estériles de 12 pocillos, en una cámara de cultivo (memmert ICP 400-800) a $20 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo de 14:10 h (luz:oscuridad). Cada 24 horas se contaban todos los individuos usando una lupa estereoscópica y se transferían con una pipeta Pasteur estéril a otros pocillos con medio fresco, previamente lavados con agua destilada y esterilizados con radiación ultravioleta en una campana de flujo laminar. Cuando se determinan respuestas numéricas de rotíferos en el laboratorio, es importante transferir a los animales regularmente a suspensiones frescas de alimento para que éstos reciban una fuente de alimento cualitativa y cuantitativamente constante (ROTHHAUPT, 1993). Además, la densidad de individuos no debe alcanzar valores muy altos para prevenir una reducción de la concentración de alimento por el consumo de los animales (ROTHHAUPT, 1993). Por esta razón, la duración del experimento fue de 7 días, momento en que se alcanzaron densidades de 15-17 individuos en $0.026 \text{ mg C L}^{-1}$, y de 30-47 individuos en concentraciones superiores a $0.157 \text{ mg C L}^{-1}$.

Para calcular la tasa de crecimiento instantánea de la población de *K. cochlearis* se siguió la metodología propuesta por STEMBERGER & GILBERT (1985). Para ello se hicieron regresiones simples, entre los valores del Ln (N_t/N_0) y el tiempo, donde N_0 era la densidad inicial de rotíferos y N_t la densidad de la población en el día t. La pendiente de la línea de regresión era la tasa de crecimiento instantánea de la población por día, r. La densidad inicial considerada fue la que había en cada pocillo experimental 4 días después de comenzar el experimento, ya que era un periodo de tiempo razonable para que los rotíferos se adaptaran a las condiciones de alimento experimentales (STEMBERGER & GILBERT, 1985; ROTHHAUPT & LAMPERT, 1992).

Los valores de r, para cada concentración de alimento, se ajustaron al modelo de Monod modificado (ROTHHAUPT, 1990b, 1993) mediante una regresión mínimo cuadrática no lineal usando el programa STATISTICA (StatSoft):

$$r = r_{\max} \times \frac{C - C_0}{C - C_0 + K_s}$$

donde r= tasa intrínseca de crecimiento poblacional; r_{\max} = tasa máxima de crecimiento poblacional; C= concentración de alimento; C_0 = concentración de alimento en la que r es cero (concentración umbral); K_s = constante de Monod.

Se analizó estadísticamente si la respuesta numérica de *K. cochlearis* se ajustaba significativamente mejor al modelo de Monod modificado (con 3 parámetros estimados: r_{\max} , C_0 y K_s) que al modelo de Monod (con sólo 2 parámetros estimados: r_{\max} y K_s). Para ello se utilizó una prueba F (véase capítulo 9 de MCCALLUM, 2000). Esta prueba consiste en calcular la suma de los cuadrados de los residuales de los dos modelos y, mediante una razón F se evalúa si el modelo de Monod modificado ajusta mejor los datos observados que el modelo de Monod. La razón F se calcula con la siguiente expresión (MCCALLUM, 2000):

$$F = \frac{SSP / (f - p)}{SSE_{C_0} / (n - f)}$$

donde SSE_{C_0} es la suma de los cuadrados de los residuales del modelo de Monod modificado, SSP es la diferencia entre la suma de los cuadrados de los residuales

del modelo de Monod menos SSE_{C_0} , f es el número de parámetros en el modelo completo (modelo de Monod modificado), p es el número de parámetros en el modelo parcial (modelo de Monod), y n es el número de casos.

El cultivo de *Cryptomonas* no era axénico y como *K. cochlearis* puede ingerir bacterias (GILBERT & BOGDAN, 1984), se controló la abundancia y biomasa de bacterias desde el comienzo hasta el final del experimento en las soluciones de *Cryptomonas* a partir de las cuales se preparaban los tratamientos experimentales. La abundancia de bacterias fue estimada por contaje directo utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leitz, Fluovert FS) siguiendo el protocolo propuesto por PORTER & FEIG (1980). Se contaron un mínimo de 400 células por muestra eligiendo campos al azar y la abundancia celular se obtuvo a partir de la siguiente expresión (JONES, 1979):

$$n = \frac{Y \times A}{a \times V}$$

donde n = nº de células por ml; Y = nº medio de células por retícula; A = área de filtración (mm^2); a = área de la retícula (mm^2); V = volumen de muestra filtrado (ml).

Las células bacterianas tenían forma de bacilo con un volumen medio de $0.025 \mu\text{m}^3$. El biovolumen bacteriano se obtuvo a partir fotografías realizadas con un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss Electron Microscope EM902) a 12 000 aumentos. Se escanearon las fotografías de las bacterias y de la rejilla de calibración y, con un programa de análisis de imagen (Corel Photo-Paint), se midió el ancho y largo de 29 células. El biovolumen bacteriano se calculó aproximando la forma de las células bacterianas a un elipsoide a partir de la expresión:

$$\text{Biovolumen} (\mu\text{m}^3) = W^2 \times L \times \frac{\pi}{6}$$

donde W es la anchura (μm) y L la longitud (μm) de la célula.

La biomasa bacteriana (fg C cel^{-1}) se estimó a partir del biovolumen según la expresión de NORLAND (1993):

$$C \text{ (fg cel}^{-1}\text{)} = 120 \times V^{0.72}$$

donde V es el volumen celular ($\mu\text{m}^3 \text{ cel}^{-1}$).

RESULTADOS

La respuesta numérica de *K. cochlearis* se ajustó a la ecuación modificada de Monod explicando un 83% de la varianza. La curva de crecimiento observada se caracterizó por un aumento curvilíneo con la concentración de alimento, alcanzando asintóticamente una r_{max} de 0.39 ind d⁻¹ (Figura 3.2.).

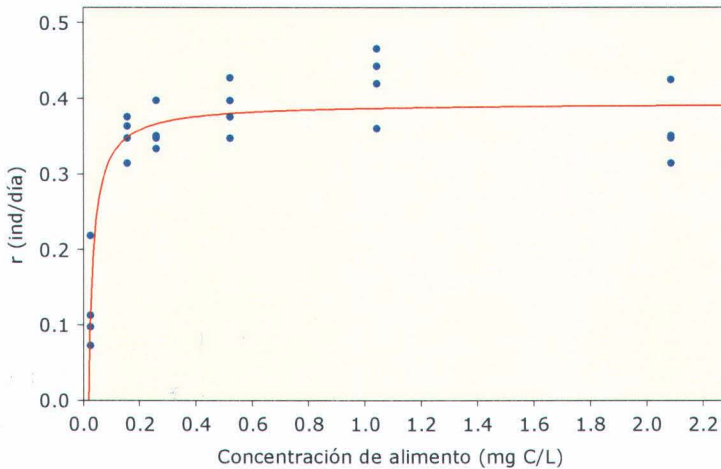


Figura 3.2. Tasa de crecimiento poblacional de *K. cochlearis* (r) vs. concentración de alimento (mg C L^{-1} de *Cryptomonas*). La curva corresponde a un ajuste mínimo cuadrático a la ecuación de Monod modificada (ROTHHAUPT, 1990b, 1993).

La tasa de crecimiento de la población de *Keratella* mostró una respuesta muy rápida a pequeños cambios en la concentración de alimento. El nivel de alimento umbral (C_0) estimado para este clon de *K. cochlearis* alimentada con esta cepa de *Cryptomonas* resultó ser muy bajo ($0.018 \text{ mg C L}^{-1}$, véase Tabla 3.1). El peso seco estimado de las células de *Cryptomonas* fue $3.13 \cdot 10^{-4} \pm 1.70 \cdot 10^{-5}$ (desviación estándar) $\mu\text{g cel}^{-1}$, de forma que la concentración de alimento umbral expresada en términos de peso seco algal sería $0.022 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Tabla 3.1. Tasa máxima de crecimiento poblacional (r_{max}), concentración mínima de alimento para un crecimiento poblacional igual a cero (C_0), y constante de Monod (K_s) estimados mediante la ecuación de Monod modificada (ROTHHAUPT, 1990b, 1993) y el modelo de MONOD (1950) para la tasa intrínseca de crecimiento poblacional de *K. cochlearis* vs. la concentración de alimento (n=24). Se muestran los valores medios estimados (\pm error estándar) por regresión mínimo cuadrática a los modelos. Los dos modelos se comparan mediante una prueba F (MCCALLUM, 2000; véase material y métodos).

Modelo	r_{max} (ind d ⁻¹)	C_0 (mg C L ⁻¹)	K_s (mg C L ⁻¹)	SSE	g.l.	SSP	F	p
Monod MONOD (1950)	0.41 \pm 0.02	0	0.045 \pm 0.011	0.0525	22	0.0081	3.83	0.06
Monod modificado ROTHHAUPT (1990b, 1993)	0.39 \pm 0.02	0.018 \pm 0.004	0.018 \pm 0.011	0.0444				

g.l.: grados de libertad.



Una prueba F (MCCALLUM, 2000) indicó que el modelo de Monod modificado ajustaba ligeramente mejor los datos observados que el modelo de Monod (Tabla 3.1.).

La biomasa bacteriana máxima en las soluciones de *Cryptomonas*, a partir de las cuales se preparaban las diferentes concentraciones de alimento usadas en este experimento, fue 11 207 $\mu\text{g C ml}^{-1}$, inferior al 1% de la biomasa algal.

La suma de los parámetros C_0 y K_s del modelo de Monod modificado es igual a la constante de Michaelis-Menten (concentración de alimento en la cual $r=r_{\text{max}}/2$). Este valor fue 0.036 mg C L^{-1} (Tabla 3.1.).

DISCUSIÓN

El modelo de Monod describe adecuadamente el efecto de la cantidad de alimento sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Keratella cochlearis*. En cualquier caso, conviene tener presente que la función de Monod es solamente útil cuando se estudia el crecimiento de una sola especie sobre una única fuente de alimento dentro de un medio estable (JOST, 2000). Además, sólo es posible si a altas concentraciones de alimento no existe ningún tipo de toxicidad (KOT, 2001).

La respuesta numérica observada de este clon de *K. cochlearis* indica que el alimento usado en este estudio es de alta calidad nutricional para el rotífero. La r_{max} alcanzada (0.39 ind d^{-1}) es superior a la observada por KIRK & GILBERT (1990) cuando alimentaron a *K. cochlearis* con *Cryptomonas* sp. (-0.30 ind d^{-1}). Por otro lado, STEMBERGER & GILBERT (1985) estimaron una r_{max} para *K. cochlearis* de 0.28 ind d^{-1} cuando el rotífero se alimentaba con la criptofícea *Rhodomonas minuta*. Con esta especie algal la tasa de crecimiento de *K. cochlearis* se inhibía a concentraciones superiores a 0.5 $\mu\text{g peso seco ml}^{-1}$. Sin embargo, en el presente estudio a esta misma concentración de alimento (equivalente a 1572 cel ml^{-1} ; 0.41 mg C L^{-1}), según la ecuación de Monod modificada, se estima una tasa de crecimiento de *K. cochlearis* de 0.37 ind d^{-1} , próxima a la r_{max} alcanzada, y no se observó una inhibición de la tasa de crecimiento de *Keratella* a concentraciones elevadas de *Cryptomonas* (Figura

3.2). STEMBERGER & GILBERT (1985) concluyeron que las células de *Rhodomonas minuta* podrían contener una endotoxina, que afectaba diferencialmente a las especies de rotíferos estudiadas. WALZ (1993) estimó una r_{\max} para *K. cochlearis* de 0.36 ind d^{-1} , y EDMONSON (1965) y ZIMMERMAN (1974) indicaron que los valores máximos de la tasa de crecimiento alcanzados por poblaciones naturales de *K. cochlearis* estaban en el rango de $0.35\text{-}0.40 \text{ ind d}^{-1}$.

El nivel de alimento umbral (C_0) estimado para este clon de *K. cochlearis* alimentada con esta cepa de *Cryptomonas* ($0.018 \text{ mg C L}^{-1}$, $0.022 \text{ } \mu\text{g}$ peso seco ml^{-1}) resultó ser inferior al estimado por KIRK & GILBERT (1990) cuando alimentaron a *K. cochlearis* con *Cryptomonas* sp. ($0.05 \text{ } \mu\text{g}$ peso seco ml^{-1}). En el presente estudio, a una concentración de alimento de $0.026 \text{ mg C L}^{-1}$ (equivalente a $0.03 \text{ } \mu\text{g}$ peso seco ml^{-1} de *Cryptomonas*) se obtuvo una tasa de crecimiento media positiva de 0.12 ind d^{-1} . Por otro lado, el nivel de alimento umbral estimado en el presente estudio fue tres veces inferior al estimado por STEMBERGER & GILBERT (1985) cuando alimentaron a esta especie de rotífero con *Rhodomonas minuta* ($0.06 \text{ } \mu\text{g}$ peso seco ml^{-1}). La diferencia entre el nivel de alimento umbral de *K. cochlearis* estimado en este estudio con los estimados por estos autores podría atribuirse a diferencias específicas de los clones de *K. cochlearis* y a una mejor calidad nutricional de la cepa de *Cryptomonas* usada. STEMBERGER & GILBERT (1985) señalaron que el nivel de alimento umbral de los rotíferos podría aumentar, y la forma de la curva de crecimiento podría cambiar, si el alimento fuese de peor calidad nutricional. En varias especies de *Brachionus* se ha determinado que la concentración de alimento umbral no es una constante específica de la especie, pues dependiendo del tamaño y de la calidad nutricional de los diferentes taxones algales usados como alimento, el nivel umbral puede variar (ROTHHAUPT, 1990b; CIROS-PÉREZ *et ál.*, 2001). En cladóceros, también se ha mostrado que la composición elemental del alimento puede influir de manera importante sobre la concentración de alimento umbral a nivel individual de estos organismos (BOERSMA & KREUTZER, 2002).

La temperatura es también un factor que puede influir en las respuestas numéricas y en las concentraciones umbrales de los rotíferos (véase p. ej. STELZER, 1998). En este estudio la temperatura fue de 20°C , similar a la usada por STEMBERGER & GILBERT (1985) y KIRK & GILBERT (1990).

El contenido en carbono celular de la cepa de *Cryptomonas* usada en este estudio ($261 \text{ pg C cel}^{-1}$) es consistente con otras estimas directas de carbono para *Cryptomonas*. Este valor está dentro del amplio rango de variación ($171\text{-}2197 \text{ pg C cel}^{-1}$) publicado por ROCHA & DUNCAN (1985) para varias especies de *Cryptomonas*. STELZER (1998) estimó un contenido en carbono para *Cryptomonas erosa* de $219 \text{ pg C cel}^{-1}$.

La contaminación bacteriana no habría contribuido de manera significativa a la nutrición de *Keratella*, ya que la biomasa bacteriana máxima estimada en los tratamientos fue inferior al 1% de la biomasa algal. Este porcentaje supone una biomasa bacteriana máxima de $26 \cdot 10^{-5} \text{ mg C L}^{-1}$ en el tratamiento de más baja concentración de alimento. KIRK (1997) consideró como despreciable para la nutrición del rotífero *Brachionus calyciflorus* una biomasa bacteriana de un 2% de su concentración de alimento umbral, en un experimento en que el rotífero era sometido a condiciones de ayuno.

La pendiente de la curva de crecimiento de *K. cochlearis* a bajas concentraciones de alimento fue muy pronunciada, indicando que *Keratella* mostró una respuesta muy rápida a pequeños cambios en la concentración de alimento. Este comportamiento, junto con su relativamente baja r_{max} , y su bajo nivel umbral, sugiere que *K. cochlearis* es una especie estratega-k. Estudios anteriores ya han mostrado que *K. cochlearis* es, en efecto, una especie estratega-K, con largos tiempos de generación y bajas concentraciones de alimento umbral (WALZ, 1987; CONDE-PORCUNA *et ál.*, 1994). De este modo, *K. cochlearis* puede mantener su población con tasas de nacimiento y concentraciones de alimento más bajas que las de las especies de rotíferos estrategas-r.

Este clon de *K. cochlearis*, aislado del embalse de Iznájar, ha sido usado en todas las experiencias de laboratorio de esta Tesis, y se ha mantenido durante 5 años en un estado óptimo. El éxito obtenido con los cultivos de *K. cochlearis* puede ser debido, además de la alta calidad nutricional de las criptofíceas para los cultivos de rotíferos (POURRIOT, 1963, 1977; LINDSTROM & PEJLER, 1975; PEJLER, 1977; STEMBERGER, 1981; STEMBERGER & GILBERT, 1985; MERRIMAN & KIRK, 2000), al hecho de que rotífero y alga hayan sido aislados del mismo sistema (STEMBERGER, 1981).

En conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la especie algal elegida como alimento para *K. cochlearis* es de alta calidad nutricional. Este estudio permitió conocer el nivel de alimento umbral para este rotífero con el fin de diseñar posteriores estudios experimentales (capítulos 4, 5 y 6).



4

Calidad del alimento para un rotífero planctónico: consecuencias de la limitación de nutrientes sobre su historia de vida y resistencia al ayuno

INTRODUCCIÓN

En los sistemas acuáticos y terrestres, el nitrógeno (N) y el fósforo (P) pueden encontrarse en concentraciones más bajas en los vegetales que en los herbívoros (SKINNER & COHEN, 1994; STERNER & HESSEN, 1994; AYRES *et ál.*, 2000), y en consecuencia, los nutrientes de la dieta pueden limitar el crecimiento y la reproducción de estos organismos (MATTSON, 1980). Los organismos herbívoros pueden resolver el problema del bajo contenido en nutrientes de la dieta mediante estrategias que les permiten adquirir nutrientes. AYRES *et ál.* (2000) desarrollaron un modelo en ecosistemas terrestres para insectos herbívoros en el que posibles combinaciones de diferentes aspectos nutricionales y fisiológicos pueden permitir que los insectos herbívoros se desarrollen con éxito cuando sus dietas son pobres en nutrientes. PLATH & BOERSMA (2001), para organismos acuáticos, desarrollaron también un modelo que predice que la actividad de alimentación de *Daphnia* aumenta al disminuir la calidad del alimento (aumento en la razón carbono:P [C:P] de las algas). Este fue el primer estudio que, modificando exclusivamente el contenido en fósforo de las algas, analizó el efecto de diferentes razones C:P en el seston sobre el crecimiento de *Daphnia*.

Al igual que las plantas superiores, las algas tienen razones C:P y C:N relativamente altas y, bajo limitación de N o P, la razón C:N:P del fitoplancton varía considerablemente (GOLDMAN *et ál.*, 1979; MOAL *et ál.*, 1987). Numerosos estudios

experimentales han mostrado que la limitación de nitrógeno, y particularmente la limitación de fósforo, reduce la calidad de las algas como alimento para el zooplancton (GROEGER *et ál.*, 1991; MITCHELL *et ál.*, 1992; SOMMER, 1992; STERNER *et ál.*, 1993; ROTHHAUPT, 1995; LÜRLING & VAN DONK, 1997; WEERS & GULATI, 1997b; DEMOTT, 1998; DEMOTT *et ál.*, 1998; SCHULZ & STERNER, 1999; BOERSMA, 2000; CONDE-PORCUNA, 2000; DEMOTT *et ál.*, 2001; PLATH & BOERSMA, 2001; BOERSMA & KREUTZER, 2002; VILLAR-ARGAIZ & STERNER, 2002). En todos estos estudios experimentales se han utilizado medios limitados en N o en P para alterar las razones estequiométricas de C:N:P de las algas, y aprovechar esta característica para producir alimento de diferente calidad para el zooplancton. Pero la mayoría de estos estudios se han centrado principalmente en crustáceos (normalmente *Daphnia*) alimentándose sobre algas verdes (fundamentalmente *Scenedesmus*). La extrapolación de estos resultados a las condiciones naturales es bastante limitada ya que las poblaciones zooplanctónicas naturales están constituidas por una gran variedad de organismos, crustáceos y otros que no son crustáceos, que se alimentan de una comunidad algal constituida frecuentemente por una gran variedad de grupos taxonómicos. Sin embargo, sólo algunos estudios experimentales han analizado los efectos de la limitación de nutrientes para algunas especies de rotíferos (ROTHHAUPT, 1995; CONDE-PORCUNA, 2000) y también son escasos los estudios sobre calidad nutricional del zooplancton que han utilizado otras especies algales diferentes a las algas verdes (LÜRLING & VAN DONK, 1997; BOERSMA, 2000). No hay ninguna razón *a priori* para asumir que *Scenedesmus*, una especie algal relativamente poco frecuente en la naturaleza en términos de porcentaje de biomasa de una comunidad, sea lo suficientemente representativa de otros taxones algales de los que se alimenta el zooplancton en los lagos naturales (BRETT *et ál.*, 2000). Las criptofíceas tienen mayor calidad nutricional que las algas verdes (AHLGREN *et ál.*, 1990; BRETT *et ál.*, 2000) y, recientemente, se ha puesto de manifiesto que la composición taxonómica del fitoplancton en los sistemas naturales puede ser un factor importante cuando se estudia la limitación de nutrientes sobre las poblaciones del zooplancton (BRETT *et ál.*, 2000). En consecuencia, se necesitan más estudios que analicen cómo la disponibilidad de nutrientes afecta a la composición elemental de otras especies algales diferentes a las algas verdes y cómo su calidad nutricional afecta al crecimiento de diferentes grupos zooplanctónicos.

Algunos estudios han mostrado que los rotíferos son más susceptibles que *Daphnia* o los copépodos a la limitación de nutrientes, especialmente a la limitación

de fósforo (MORALES-BAQUERO & CONDE-PORCUNA, 2000; CONDE-PORCUNA *et ál.*, 2002). CONDE-PORCUNA *et ál.* (2002) observaron en un embalse que la abundancia de algunas especies de rotíferos no se correlacionaba con la disponibilidad de alimento pero sí mostraba una fuerte dependencia con la disponibilidad de fósforo. La diferente susceptibilidad de las especies del zooplancton a la limitación de nutrientes puede ser importante para explicar la dinámica de estos organismos en situaciones naturales. ROTHHAUPT (1995) y CONDE-PORCUNA (2000) han señalado que la limitación de P reduce significativamente las tasas de crecimiento de los rotíferos *Brachionus* y *Anuraeopsis*. ROTHHAUPT (1995) también mostró que *Brachionus* alcanzaba tasas de crecimiento similares a bajas y a moderadas concentraciones de alimento cuando se alimentaba con *Scenedesmus* limitado en N y *Scenedesmus* no limitado en nutrientes, pero su tasa de crecimiento máxima era significativamente reducida a altas concentraciones de alimento con *Scenedesmus* limitado por N. Sin embargo, no se han realizado estudios que analicen como afectan las algas limitadas en nutrientes a los parámetros de historia de vida en rotíferos.

Por otra parte, la resistencia al ayuno es una medida de la habilidad de una especie para persistir cuando la ingestión de energía es menor que el gasto de la misma (KIRK, 1997). La resistencia al ayuno también refleja la habilidad de una especie para almacenar energía y controlar su distribución durante periodos de extrema limitación de recursos. Los estudios que han considerado la habilidad de los rotíferos como organismos especialistas de almacenamiento, y su habilidad para resistir durante periodos de ayuno son bastantes escasos (KIRK, 1997; KIRK *et ál.*, 1999; YOSHINAGA *et ál.*, 2000). Además de esto, aún no se ha investigado la resistencia al ayuno en rotíferos cuando estos se alimentan sobre algas de diferente calidad nutricional. Este tipo de estudios si se han realizado con *Daphnia*. GROEGER *et ál.* (1991) observaron que *Daphnia* alimentada con *Scenedesmus* limitado en N destinaba más lípidos a sus huevos que cuando se alimentaba con *Scenedesmus* no limitado por N y, en consecuencia, su descendencia podía sobrevivir durante más tiempo en condiciones de ayuno gracias a estas reservas de energía. Recientemente, CONDE-PORCUNA (2000) ha observado que *Anuraeopsis* es menos susceptible a la competencia explotativa por *Daphnia* cuando se alimenta con *Scenedesmus* limitado en N, sugiriendo que los rotíferos que se alimentan sobre algas limitadas en N podrían también ser menos susceptibles al ayuno. Sin embargo, este aspecto necesita ser estudiado con mayor profundidad en rotíferos.

Los objetivos de este capítulo fueron dos: primero, analizar cómo la disponibilidad de nutrientes (nitrógeno y fósforo) afecta al crecimiento y composición elemental del alga flagelada *Cryptomonas* sp., y cómo su diferente calidad nutricional influye sobre diferentes parámetros de historia de vida del rotífero *K. cochlearis*, a baja y alta concentración de alimento; y segundo, comprobar la hipótesis de que los individuos de *Keratella* sobrevivirán durante más tiempo en condiciones de ayuno cuando se alimenten con algas cultivadas en un medio limitado en N.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos de Cryptomonas sp.

Para realizar este estudio *Cryptomonas* sp. se cultivó en varios cultivos estancos utilizando tres tipos de medio de crecimiento algal (Tabla 4.1.) modificados a partir del medio Z8 estándar (SKULBERG & SKULBERG, 1990). El contenido en nitrógeno, como NaNO_3 y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, y en fósforo, como K_2HPO_4 , se ajustaron para producir un medio limitado en N ($120 \mu\text{M N} : 40 \mu\text{M P}$; N:P=3), un medio limitado en P ($640 \mu\text{M N} : 6.4 \mu\text{M P}$; N:P=100), y un medio sin limitación de nutrientes ($640 \mu\text{M N} : 40 \mu\text{M P}$; N:P=16). En principio podría esperarse que las algas cultivadas en estas razones y concentraciones absolutas de N y P limitaran el crecimiento de los rotíferos (véase p. ej. CONDE-PORCUNA, 2000). Además, en un estudio previo LÜRLING & VAN DONK (1997) obtuvieron células de la criptofíceo *Cryptomonas pyrenoidifera* limitadas en nutrientes utilizando concentraciones de P similares a las usadas en el presente estudio.

Todos los cultivos experimentales contenían 800 ml de medio de cultivo. Se realizaron dos réplicas para cada razón N:P y cada una de ellas se inoculó con células de *Cryptomonas* procedentes del cultivo continuo (capítulo 3) para obtener una densidad inicial de $\sim 1000 \text{ cel ml}^{-1}$. Los cultivos estancos se mantuvieron a $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$, con una intensidad de luz de $23 \pm 7 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y con un fotoperiodo de 14:10 h (luz:oscuridad). Todos los cultivos se airearon, sin producir burbujeo, con aire filtrado por $0.22 \mu\text{m}$ (Figura 4.1.).

Tabla 4.1. Composición de los medios de crecimiento algal (modificados desde SKULBERG & SKULBERG, 1990).

Compuesto	Concentración final en el medio (mg L ⁻¹)		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	8.325		
Na ₂ CO ₃	10.5		
FeCl ₃ · 6H ₂ O	2.8		
EDTA-Na ₂	3.705		
Elementos traza			
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0.0033		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.0088		
KBr	0.0120		
KI	0.0083		
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.0287		
Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.0155		
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0146		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0125		
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ · 6H ₂ O	0.0198		
Cr(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0.0041		
V ₂ O ₅	0.0009		
Al(SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ · 24H ₂ O	0.0474		
H ₃ BO ₃	0.1550		
MgSO ₄ · 4H ₂ O	0.1115		
	N:P = 3	N:P = 16	N:P = 100
NaNO ₃	9.4	50	50
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	1.18	6.28	6.28
K ₂ HPO ₄	6.97	6.97	1.12

Cada 3 días se cosechaba el 25-50% del volumen de los cultivos alternando las dos réplicas de cada razón N:P, y posteriormente se añadía la misma cantidad de medio fresco para permitir que los cultivos se mantuvieran en fase de crecimiento exponencial durante la duración del experimento y se dispusiera de una cantidad de alimento suficiente para poder alimentar a los rotíferos. De este modo, los cultivos de *Cryptomonas* limitados en P y N recibían aportes de estos nutrientes cada 6 días (~1.6-3.2 µM de P y ~30-60 µM de N, respectivamente).

Después de cosechar las algas de los cultivos estancos, y una vez concentradas las células de manera natural, gracias a su comportamiento fototáctico, se prepararon soluciones de *Cryptomonas* de cada tratamiento en agua mineral. La densidad celular se estimó por duplicado tal como se detalla en el capítulo 3 de esta Tesis. Los rotíferos se alimentaban con una mezcla de las algas cosechadas de los dos cultivos de cada tratamiento.

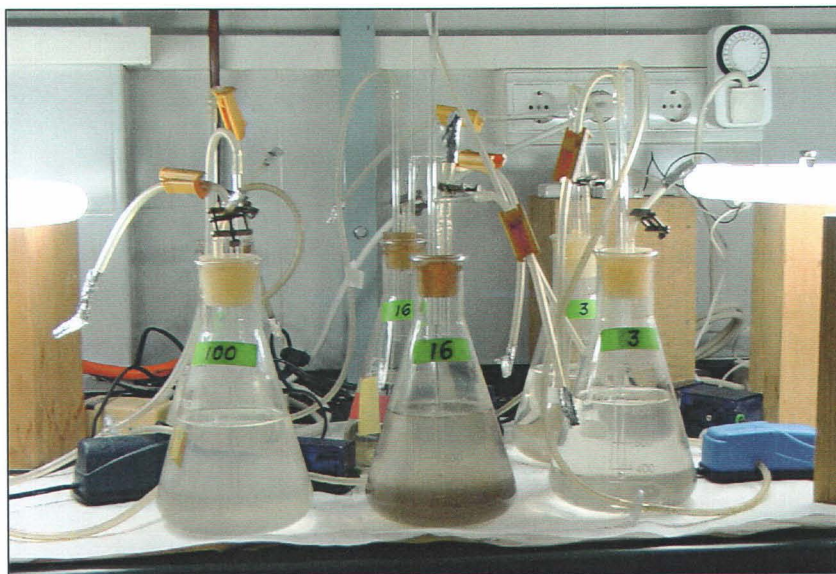


Figura 4.1. Cultivos experimentales de *Cryptomonas* sp. después de 33 días creciendo en un medio sin limitación de nutrientes (N:P=16), en un medio limitado en fósforo (N:P=100), y en un medio limitado en nitrógeno (N:P=3).

Composición elemental y estudio citoquímico de *Cryptomonas* sp.

Se analizó el contenido en carbono, nitrógeno y fósforo de las células de *Cryptomonas* cultivadas en los tres medios experimentales. Los análisis se realizaron coincidiendo con el día 15 de los experimentos de tabla de vida. Se filtró un volumen de cultivo sobre filtros de fibra de vidrio (Wathman GF/C) precombustionados (2 h a 550°C). Todos los análisis se realizaron con 2-3 réplicas, y los filtros se almacenaron a -20°C hasta su análisis. El carbono y el nitrógeno se determinaron usando un analizador elemental (2400 CHN, Perkin Elmer) en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Málaga. El fósforo total intracelular se analizó como ión fosfato según el método propuesto por MURPHY & RILEY (1962), después de oxidar y autoclavar las muestras durante 30 minutos a 121°C con una mezcla oxidante (APHA, 1992). La concentración de ión fosfato se analizó en un espectrofotómetro (Lambda 40, Perkin Elmer) en cubetas de 10 cm a 882 nm. La densidad celular se estimó antes de filtrar contando dos submuestras en una cámara Uthermöhl. Las concentraciones celulares internas de nitrógeno (Q_N) y fósforo (Q_P) se calcularon con estos resultados.

También se realizó un estudio citoquímico de *Cryptomonas* cultivadas en los tres medios de cultivo experimentales con el fin de detectar inclusiones celulares de polisacáridos, lípidos y proteínas. Para ello se fijaron concentrados de células de los diferentes tratamientos (2 horas a temperatura ambiente) con una solución de glutaraldehído (2%) y paraformaldehído (2.5%) en tampón cacodilato 0.1 M (M'RANI-ALAOUI, 2000). Después de este periodo, las muestras fijadas se centrifugaron con una microcentrífuga (Hettich EBA 12) a 20 000 x g durante 5 minutos, y el concentrado se lavó 2 veces con solución tampón cacodilato 0.1 M. Una vez fijadas las células se procedió a la deshidratación e inclusión en una resina sintética (Epon).

A continuación, se hicieron cortes semifinos (~1 µm de espesor) con un ultramicrotomo (Reichert Ultracut S) con cuchilla de diamante y se tiñeron inespecíficamente con una solución de azul de metileno / azul de toluidina / bórax. Estos cortes semifinos se tiñeron posteriormente con tinciones específicas de polisacáridos, lípidos y proteínas. La tinción de polisacáridos se basó en la reacción del ácido periódico de Schiff (PAS) (JENSEN, 1962; FISHER, 1968), según la cual una coloración roja indica presencia de azúcares. Para la tinción de lípidos se siguió la metodología propuesta por M'RANI-ALAOUI (2000), basada en la reacción de Sudan Black B, dando lugar a una coloración azul-negrizca. Y la tinción de proteínas se hizo siguiendo el método de la ninhidrina-Schiff (MARTOJA & MARTOJA PIERSON, 1970) dando una coloración morada. Las observaciones de las diferentes tinciones se hicieron con un microscopio óptico (Zeiss Axiovert 35) a 1000 aumentos en el Departamento de Botánica de la Universidad de Granada.

Además de los cortes semifinos, se hicieron también cortes ultrafinos (500-700 Å de espesor) con el fin de tratar de localizar la disposición y el origen de las diferentes inclusiones. Estos cortes se contrastaron con una doble tinción de acetato de uranilo y citrato de plomo para aumentar el contraste. Las observaciones de estos cortes ultrafinos se hicieron con un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss Electron Microscope EM902) en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Experimentos de tabla de vida

Se realizaron dos experimentos de tabla de vida con *Keratella cochlearis* para estudiar la importancia relativa de la calidad y la cantidad del alimento. Los individuos de *K. cochlearis* usados en este estudio procedían de los cultivos *stock* mantenidos en el laboratorio en las condiciones previamente señaladas en el capítulo 3. Los animales se alimentaron con tres tipos de *Cryptomonas* cultivadas en los medios con limitación de nitrógeno (LN), con limitación de fósforo (LP), y sin limitación de nutrientes (SLN), a dos concentraciones de alimento (baja concentración, 80 cel ml⁻¹ [0.016-0.025 mg C L⁻¹]; y alta concentración, 500 cel ml⁻¹ [0.114-0.132 mg C L⁻¹]). La concentración baja de alimento se corresponde con la concentración umbral de este clon de *K. cochlearis* cuando se alimenta con esta cepa de *Cryptomonas* cultivada en un medio sin limitación de nutrientes (Z8 estándar, véase capítulo 3).

Los experimentos de tabla de vida comenzaron con 24 neonatos (<24 horas de vida) por tratamiento. Los animales se mantuvieron individualmente en pocillos de placas de cultivo de poliestireno estériles (IWAKI), de 24 pocillos, con 2 ml de agua mineral con *Cryptomonas*. Todos los tratamientos se mantuvieron en una cámara de cultivo (memmert ICP 400-800) a 20 ± 0.5°C, con un fotoperiodo de 14:10 h (luz:oscuridad) y con una intensidad luminosa de ~20 μE m⁻² s⁻¹. Los neonatos procedían de la segunda puesta de unas madres que habían sido cultivadas en las mismas condiciones a las usadas en estos experimentos, con la excepción de que estas madres se alimentaron con 80 y 500 cel ml⁻¹ de *Cryptomonas* procedentes del cultivo continuo (medio Z8 estándar). Cuando las madres desarrollaron su segundo huevo, éstas se sometieron a los seis tratamientos descritos anteriormente, de tal forma que los neonatos usados en estos experimentos se alimentaron con células de *Cryptomonas* cultivadas en SLN, LP y LN desde su primer día de vida.

Los individuos de *Keratella* se observaban cada 24 horas y se transferían a otras placas de cultivo (previamente lavadas con agua destilada) en las que se habían añadido las suspensiones de alimento experimentales. En las observaciones diarias se anotaba si la hembra estaba formando algún huevo y también se contaban los individuos que habían nacido. Estas hijas recién nacidas se eliminaban de los pocillos y se anotaba el día de su nacimiento. Las tablas de vida se continuaron hasta que todas las hembras de *Keratella* murieron. Todas estas observaciones permitieron

estimar los siguientes parámetros en cada tratamiento: el periodo juvenil, la longevidad y el número total de descendientes por hembra. La tasa intrínseca de crecimiento se calculó resolviendo iterativamente la ecuación de Euler, con los intervalos de confianza determinados por la técnica *jackknife* descrita por MEYER et ál. (1986).

Los cultivos estancos de *Cryptomonas* no eran axénicos, pero la contaminación bacteriana no contribuyó significativamente a la nutrición de los rotíferos. Se estimó la abundancia bacteriana en las suspensiones de alimento con 80 cel ml⁻¹ de *Cryptomonas*, desde el comienzo hasta el final del experimento, como unidades formadoras de colonias (UFC) ml⁻¹ siguiendo la metodología propuesta por RODINA (1972). La abundancia bacteriana máxima en estas suspensiones de alimento fue de 21 500 UFC ml⁻¹. Esta abundancia bacteriana en términos de biomasa, dado que el contenido en carbono de las células bacterianas presentes en los cultivos de *Cryptomonas* era de 8.43·10⁻⁹ µg C cel⁻¹, fue 1.81 10⁻⁴ µg C ml⁻¹. Esta biomasa bacteriana es igual al 1% de la concentración de alimento umbral de este clon de *K. cochlearis*, de tal forma que puede considerarse despreciable (véase KIRK, 1997). La metodología referente a la determinación del volumen de las células bacterianas, así como la estima de su biomasa se detalla en el capítulo 3 de esta Tesis.

Resistencia al ayuno

Se inocularon individualmente 24 neonatos (<24 horas de vida) de *K. cochlearis* en pocillos de placas estériles de poliestireno conteniendo 2 ml de agua mineral con 80 cel ml⁻¹ de *Cryptomonas* (0.016-0.025 mg C L⁻¹), cultivadas en distintas condiciones de limitación de nutrientes (SLN, LP y LN). Todos los neonatos se obtuvieron a partir de hembras grávidas de *K. cochlearis* bien alimentadas procedentes del cultivo *stock* mantenido en el laboratorio en las condiciones detalladas en el capítulo 3 de esta Tesis. Los rotíferos se mantuvieron en medio con alimento durante 5 días y después de este periodo los individuos que sobrevivieron se lavaron 2 veces con agua mineral estéril y se mantuvieron en condiciones de ayuno (agua mineral filtrada por 0.22 µm) hasta que murieron. Cada 24 horas se examinaba el estado de todos los individuos y se anotaba el día de su muerte. Las condiciones de temperatura, fotoperiodo e intensidad luminosa fueron las mismas que en los experimentos de tabla de vida descritos anteriormente.

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa STATISTICA (StatSoft) y se tuvieron en cuenta las recomendaciones descritas por SOKAL & ROHLF (1995). Para analizar las diferencias de los parámetros de historia de vida de *Keratella* entre los distintos tratamientos se utilizaron análisis no paramétricos en lugar de análisis paramétricos debido a la distribución no normal de algunas variables, y además por la heterogeneidad de varianzas entre los tratamientos. La normalidad y la homogeneidad de varianzas se examinaron con los análisis de Kolmogorov-Smirnov y de Bartlett, respectivamente (SOKAL & ROHLF, 1995). Ninguna transformación logró que los datos estuviesen normalmente distribuidos, de tal forma que un análisis ANOVA paramétrico debía ser sustituido por un análogo no paramétrico (SOKAL & ROHLF, 1995, p. 407). Así pues, para analizar los efectos de la limitación de nutrientes y la concentración de alimento sobre los parámetros de historia de vida de *Keratella*, se realizó un ANOVA de dos vías por rangos, la extensión Scheirer-Ray-Hare del análisis de Kruskal-Wallis (SOKAL & ROHLF, 1995, pp. 445-447).

La resistencia al ayuno de los individuos de *Keratella* después de haber estado alimentándose con *Cryptomonas* cultivadas en medios con limitación de nutrientes y sin limitación de nutrientes se analizó con un ANOVA de Kruskal-Wallis (SOKAL & ROHLF, 1995).

Para analizar las diferencias en los parámetros de historia de vida y en la resistencia al ayuno entre pares de tratamientos se realizaron pruebas *U* de Mann-Whitney, ajustando los valores de probabilidad al número de análisis simultáneos mediante el método secuencial de Bonferroni (RICE, 1989).

RESULTADOS

Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre la composición elemental y bioquímica de Cryptomonas sp.

Las células de *Cryptomonas* cultivadas en los medios limitados en nutrientes no reflejaron en su composición elemental la limitación de P y N de los medios de cultivo, ni cuando se expresaba en términos de concentración celular interna de fósforo (Q_P) o de nitrógeno (Q_N), ni cuando se expresaba como una razón con el

carbono celular (Tabla 4.2.). Q_P era más alta para las algas que habían sido cultivadas en los medios limitados en N o P. Q_N era más alta en las algas que habían crecido sin limitación de nutrientes, y era similar para las algas cultivadas en los medios LN y LP. Las razones atómicas C:P y N:P eran más altas en las células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio SLN, y la razón C:P más baja se obtuvo en las células cultivadas en LP. Sin embargo, los cultivos con medios limitados en N y P después de 33 días cultivándose en estas condiciones alcanzaron menores densidades de *Cryptomonas* que los cultivos sin limitación de nutrientes (Tabla 4.2., véase también Figura 4.1.).

Tabla 4.2. Concentración celular interna (pmol cel⁻¹) de fósforo (Q_P) y de nitrógeno (Q_N), y razones estequiométricas (mol/mol) en células de *Cryptomonas* cultivadas en un medio sin limitación de nutrientes (SLN), con limitación de fósforo (LP), y con limitación de nitrógeno (LN). También se indica la densidad de *Cryptomonas* en los diferentes cultivos (cel ml⁻¹) después de 33 días creciendo en estas condiciones. Los valores son medias \pm error estándar de ambos experimentos: baja y alta concentración de alimento.

<i>Cryptomonas</i>	Q_P	Q_N	C : N : P	Cel ml ⁻¹
SLN	0.18 \pm 0.00	5.13 \pm 0.07	133 : 29 : 1	29 446 \pm 1322
LP	0.25 \pm 0.02	4.00 \pm 0.22	75 : 16 : 1	5308 \pm 1113
LN	0.25 \pm 0.03	4.07 \pm 0.75	85 : 16 : 1	16 761 \pm 2609

En las figuras 4.2., 4.3. y 4.4. se muestran las tinciones específicas de lípidos, polisacáridos y proteínas, respectivamente, en los tejidos de las células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio sin limitación de nutrientes y en los medios con limitación de P y N. La diferencia citológica más notable fue la presencia de grandes inclusiones que se tiñeron intensamente con las tinciones de lípidos, polisacáridos y proteínas en las células cultivadas con limitación de P. Estas inclusiones no se detectaron en las células cultivadas en el medio limitado en N ni en el medio con suficientes nutrientes. Las células cultivadas en condiciones limitantes de N y en condiciones no limitantes de nutrientes mostraron tinciones muy parecidas de los tres componentes bioquímicos. No obstante, puede apreciarse una tinción de proteínas en las células limitadas en N un poco más débil que en las células cultivadas sin limitación de nutrientes (Figura 4.4.).

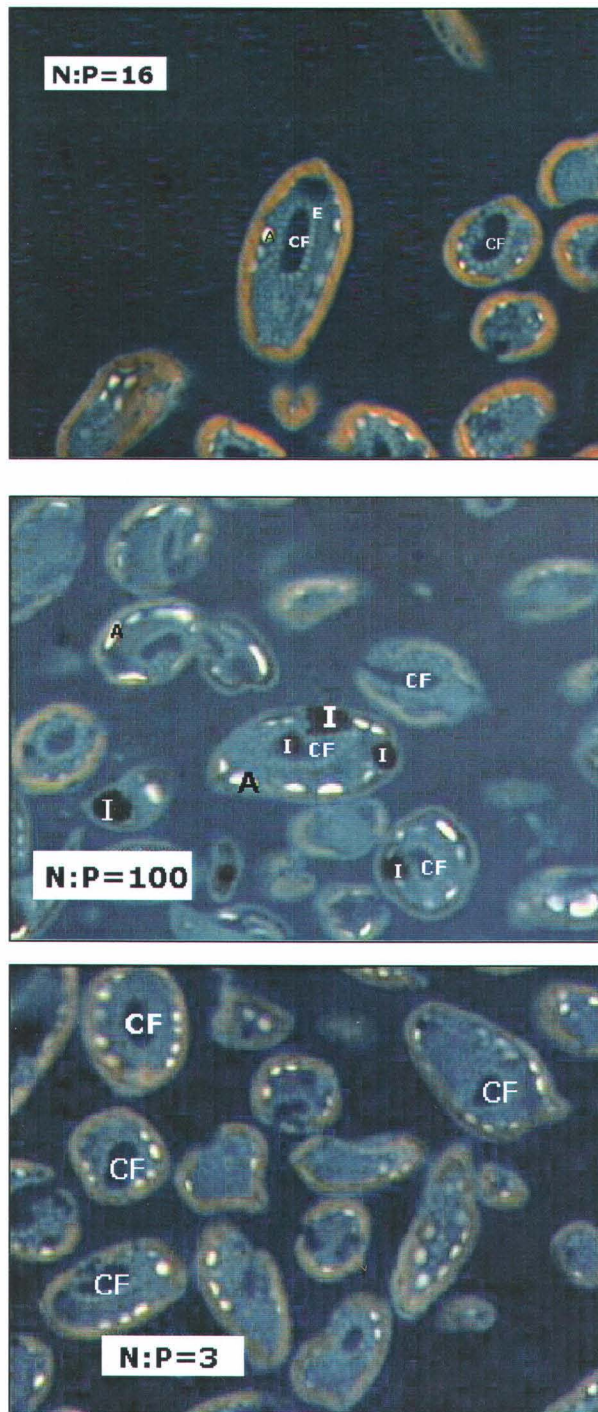


Figura 4.2. Tinción de lípidos en células de *Cryptomonas* cultivadas sin limitación de nutrientes (N:P=16), con limitación de fósforo (N:P=100) y con limitación de nitrógeno (N:P=3). (1000 X). (CF) Citofaringe; (E) Eyectosomas.; (A) Almidón; (I) Inclusión.

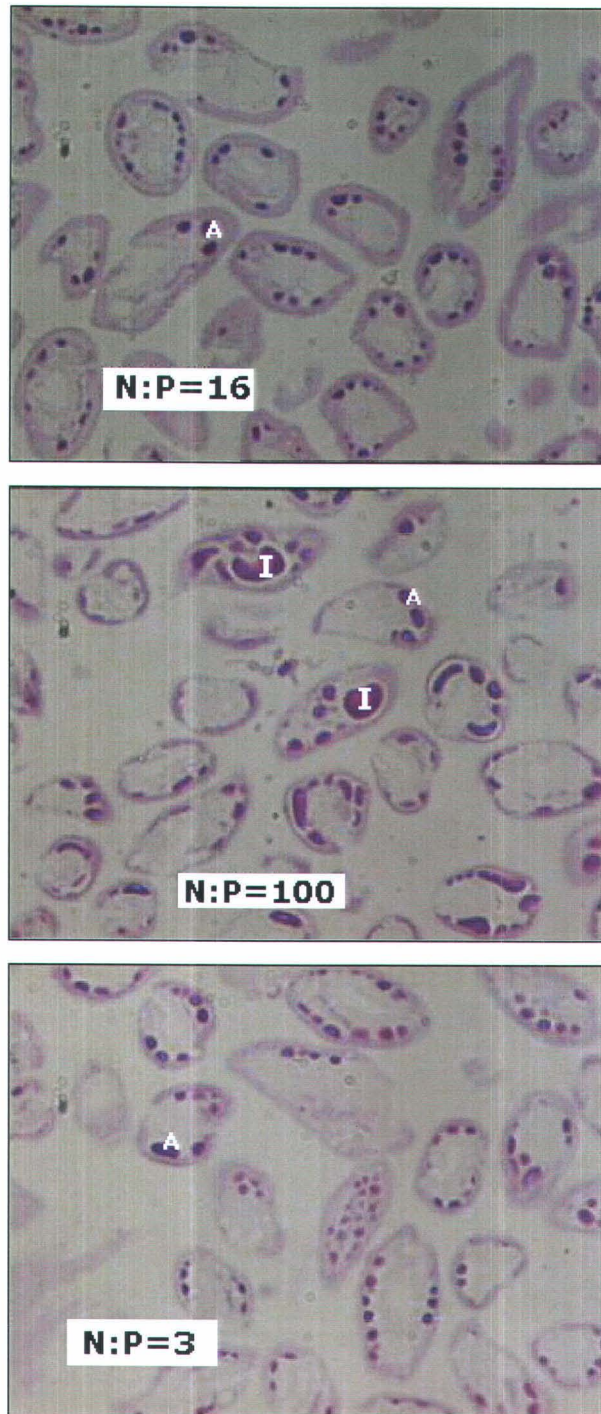


Figura 4.3. Tinción de polisacáridos en células de *Cryptomonas* cultivadas sin limitación de nutrientes (N:P=16), con limitación de fósforo (N:P=100) y con limitación de nitrógeno (N:P=3). (1000 X). (A) Almidón; (I) Inclusión.

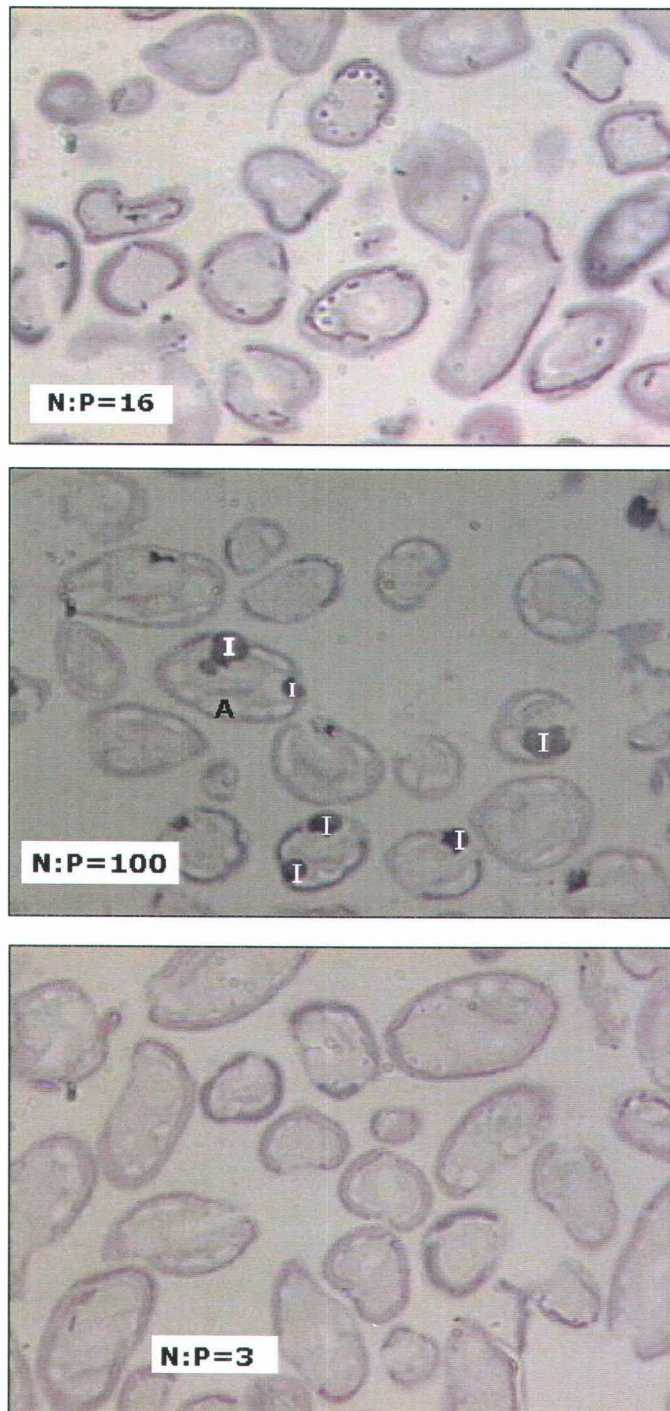


Figura 4.4. Tinción de proteínas en células de *Cryptomonas* cultivadas sin limitación de nutrientes (N:P=16), con limitación de fósforo (N:P=100) y con limitación de nitrógeno (N:P=3). (1000 X). (A) Almidón; (I) Inclusión.

Las imágenes obtenidas con microscopía electrónica de transmisión de los cortes ultrafinos de las células que fueron cultivadas en condiciones limitantes de P mostraron que estas inclusiones orgánicas estaban situadas en la proximidad de la citofaringe y en la periferia de la célula, y su origen parece estar ligado con procesos de transformación de determinados eyectosomas (Figura 4.5.). La citofaringe, rodeada de eyectosomas, está relacionada con la nutrición fagotrófica de estas células algales (VAN DEN HOEK *et ál.*, 1995).

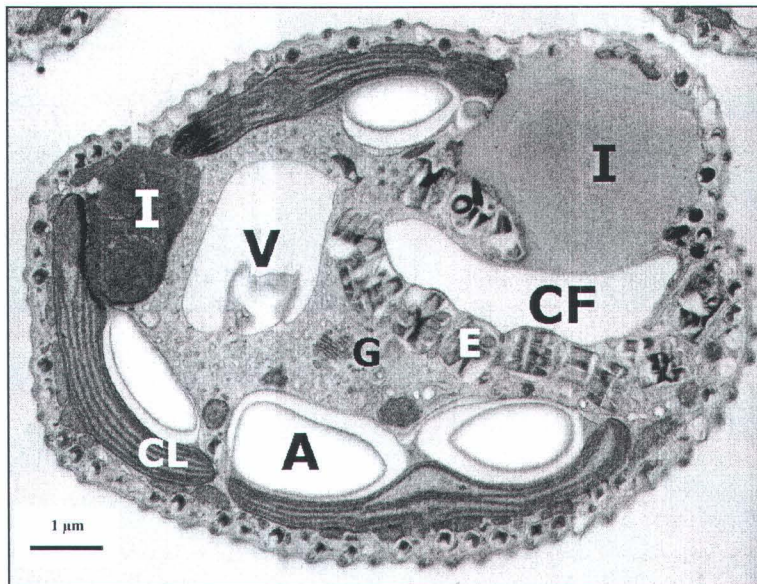


Figura 4.5. Corte ultrafino de una célula de *Cryptomonas* sp. cultivada en un medio limitado en P observado con microscopía electrónica de transmisión. (I) Inclusiones; (CF) Citofaringe; (E) Eyectosoma; (CL) Cloroplasto; (G) Aparato de Golgi; (A) Almidón; (V) Vacuola.

Por otro lado, en las células de *Cryptomonas* cultivadas con limitación de P se observaron también otras diferencias ultraestructurales importantes. El área tilacoidal (espacio que ocupan los tilacoides dentro del cloroplasto), y el número de tilacoides era mucho menor en las células limitadas en P (Figura 4.6.). Estos resultados indican que en las células limitadas por P el aparato fotosintético estaba menos desarrollado que en las células cultivadas sin limitación de nutrientes.

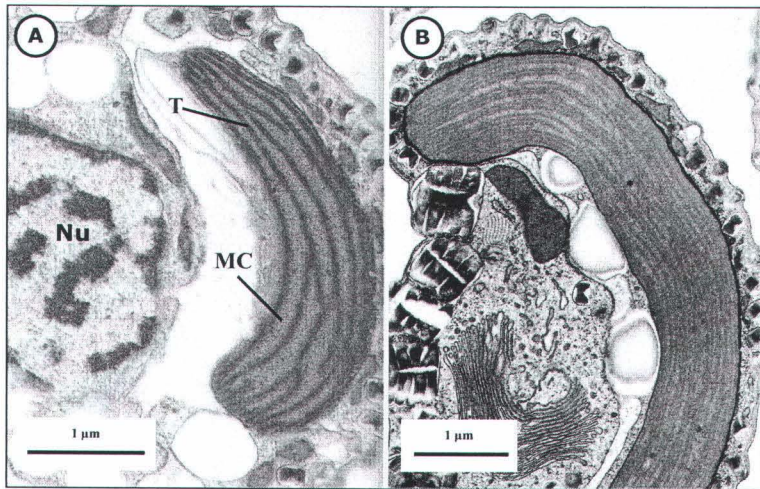


Figura 4.6. Cortes ultrafinos observados con microscopía electrónica de transmisión mostrando el sistema tilacooidal de una célula de *Cryptomonas* sp. cultivada en (A) un medio limitado en P y (B) un medio sin limitación de nutrientes. (MC) Matriz cloroplastidial; (T) Tilacoides; (Nu) Núcleo.

Efecto de la calidad y cantidad del alimento sobre los parámetros de historia de vida de *K. cochlearis*

Keratella cochlearis alcanzó, a baja concentración de alimento, tasas de crecimiento más altas cuando se alimentó con células de *Cryptomonas* cultivadas en los medios con limitación de N y P que cuando se alimentó con células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio sin limitación de nutrientes (Figura 4.7a.). Un ANOVA de dos vías por rangos (la extensión Scheirer–Ray–Hare del análisis de Kruskal–Wallis) mostró que la tasa de crecimiento de *Keratella* se veía significativamente afectada por ambos efectos principales (la concentración de alimento y el tipo de limitación de nutrientes de las algas) y por la interacción de ambos (Tabla 4.3.). Comparaciones pareadas (pruebas *U* de Mann–Withney) indicaron que la tasa de crecimiento de *Keratella* se veía significativamente afectada por el estado nutricional de las algas a baja concentración de alimento (Figura 4.7a.). La tasa de crecimiento de *Keratella* más baja se obtuvo cuando los animales se alimentaron con células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio SLN, y la tasa de crecimiento más alta se obtuvo para los individuos de *Keratella* alimentados con células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio LP. A alta concentración de alimento, la calidad del alimento no mostró un efecto significativo sobre la tasa de crecimiento del rotífero.

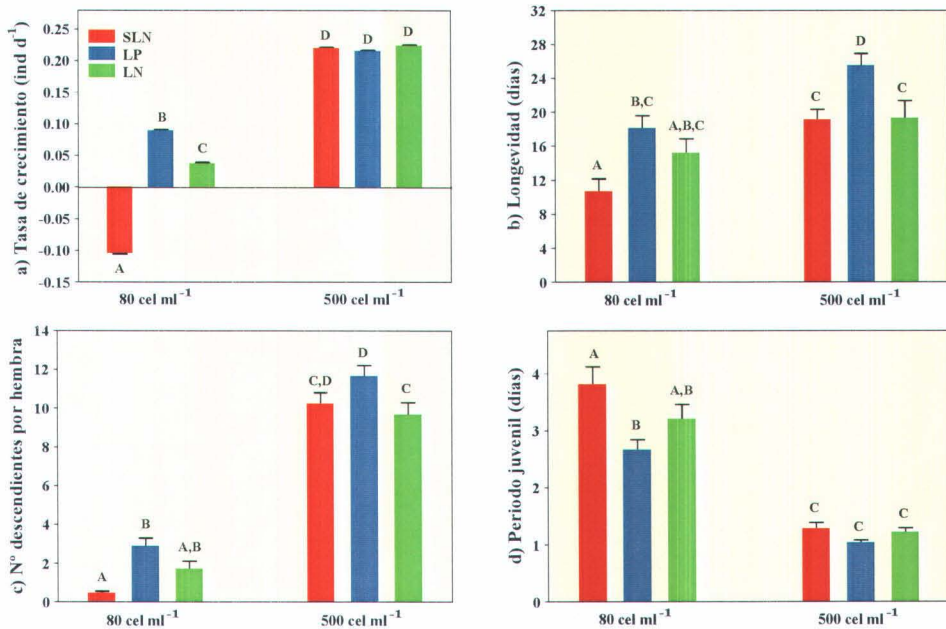


Figura 4.7. Tasa de crecimiento (a), longevidad (b), número total de descendientes por hembra (c), y periodo juvenil (d) de *K. cochlearis* alimentada con *Cryptomonas* cultivada en varios medios (SLN: sin limitación de nutrientes; LP: limitado en P; y LN: limitado en N), en dos concentraciones de alimento. Las barras de error indican error estándar de la media; los tratamientos marcados con la misma letra no son significativamente diferentes (pruebas *U* de Mann-Whitney). Los valores de probabilidad se ajustaron al número de análisis simultáneos mediante el método secuencial de Bonferroni.

Aunque la calidad nutricional de *Cryptomonas* afectaba a la longevidad de *Keratella*, el número de descendientes producidos por hembra no se vio afectado (Tabla 4.3.). No obstante, a baja concentración de alimento, el número total de descendientes por hembra era significativamente más bajo, y el periodo juvenil significativamente más alto, en los animales que se alimentaron con *Cryptomonas* cultivada en el medio SLN en relación con los animales que se alimentaron con células cultivadas en el medio LP (Figuras 4.7c. y 4.7d.). La longevidad de los animales alimentados con algas cultivadas en el medio SLN era significativamente más baja que la de los animales alimentados con algas cultivadas en el medio LP en ambas concentraciones de alimento (Figura 4.7b.). El periodo fértil (estimado como la diferencia entre la longevidad y el periodo juvenil) mostraron resultados similares. Además, en los medios SLN y LP la longevidad era significativamente más baja en el tratamiento de baja concentración de alimento con relación al tratamiento de alta concentración de alimento. Sin embargo, la longevidad de los animales alimentados

Tabla 4.3. ANOVA de dos vías por rangos (extensión Scheirer-Ray-Hare del análisis de Kruskal-Wallis) para analizar los efectos del tipo de limitación de nutrientes (A) y de la concentración de *Cryptomonas* (B) sobre la tasa de crecimiento poblacional, la longevidad, el número total de descendientes por hembra y el periodo juvenil de *K. cochlearis*.

Efecto	Tasa de crecimiento (ind día ⁻¹)				Longevidad (días)			Nº descendientes por hembra			Periodo juvenil (días)			
	g.l.	SS	H	p	SS	H	p	SS	H	p	g.l.	SS	H	p
A: Nutrientes	2	11 476	7.08	0.029	25 341	15.63	<0.001	8887	5.48	0.0646	2	4577	3.43	0.18
B: Concentración	1	166 076	102.41	<0.0001	28 464	17.55	<0.0001	159 633	98.44	<0.0001	1	114 268	85.69	<0.0001
A X B	2	15 854	9.77	<0.01	4156	2.56	0.278	1803	1.11	0.5741	2	470	0.352	0.8386
Error	133	9696			163 291			48 563			120	29 960		

g.l.: grados de libertad.

con algas cultivadas en el medio LN no era significativamente diferente entre ambas concentraciones de alimento.

Efecto de la calidad del alimento sobre la resistencia al ayuno de *K. cochlearis*

Un ANOVA de Kruskal–Wallis indicó un efecto significativo del tratamiento de nutrientes sobre la longevidad de *K. cochlearis* en condiciones de ayuno después de haberse alimentado con células de *Cryptomonas* cultivadas en varios estados de limitación de nutrientes ($H_{2,56} = 6.752$, $p < 0.05$). Las comparaciones pareadas (pruebas *U* de Mann–Withney) señalaron que la longevidad de los animales que se alimentaron con células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio LN era significativamente más alta que la de los animales que se alimentaron con algas cultivadas en el medio SLN (Figura 4.8.). No se observaron diferencias significativas entre las longevidades de los individuos que se alimentaron con algas cultivadas en condiciones de limitación de P y limitación de N.

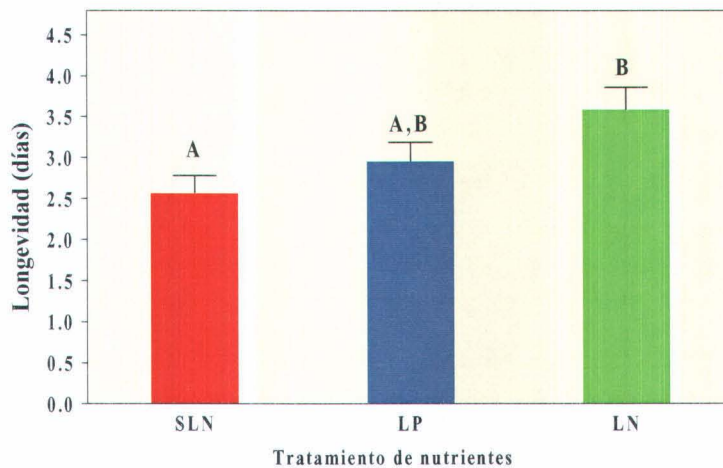


Figura 4.8. Resistencia al ayuno de *K. cochlearis* (nº de días que los animales sobrevivieron en condiciones de ayuno) después de alimentarse durante 5 días con células de *Cryptomonas* ($\sim 0.02 \text{ mg C L}^{-1}$) cultivadas en un medio sin limitación de nutrientes (SLN), con limitación de P (LP) y con limitación de N (LN). Las barras de error indican error estándar de la media; los tratamientos marcados con la misma letra no son significativamente diferentes (pruebas *U* de Mann–Withney). Los valores de probabilidad se ajustaron considerando el número de análisis simultáneos mediante el método secuencial de Bonferroni.

DISCUSIÓN

En este estudio la limitación de nutrientes en los medios de cultivos no se reflejó en las razones estequiométricas de las células de *Cryptomonas* (Tabla 4.2.). La razón más alta de C:P se obtuvo en las algas cultivadas en el medio no limitado en nutrientes, y la razón C:P más baja se obtuvo en las algas cultivadas en el medio limitado en P. En contraste con estos resultados, estudios anteriores han mostrado que algas cultivadas en medios limitados en nutrientes si reflejaron esta limitación en sus razones atómicas C:P (STERNER *et ál.*, 1993; ROTHHAUPT, 1995; LÜRLING & VAN DONK, 1997; BOERSMA, 2000). En estos estudios, las razones C:P de las algas fueron más altas cuando se cultivaban en condiciones de limitación de P.

Sin embargo, *Cryptomonas* alcanzó menores densidades en los cultivos con medios limitados en nutrientes, y el mayor contenido en P en estas células podría indicar que *Cryptomonas* hubiera optado por una estrategia de almacenamiento de P ("consumo de lujo") con tasas de crecimiento más bajas y velocidades de ingestión de fosfato mayores cuando este nutriente era añadido periódicamente a los cultivos limitados en N y P (véase p. ej. SOMMER, 1984; ISTVÁNOVICS *et ál.*, 1994). El hecho de haber observado también una mayor Q_p en las células cultivadas en el medio limitado en N resulta incongruente, ya que en este medio de cultivo el P estaba en la misma concentración que en el medio no limitado en nutrientes. Estos resultados podrían indicar que este comportamiento de acumulación de P podría ser una respuesta general a la limitación de ambos nutrientes. Hasta la fecha no se ha descrito este comportamiento de consumo de lujo en células de *Cryptomonas* limitadas en N y P cuando reciben aportes de P periódicos, y por tanto se necesitan más estudios que corroboren los resultados obtenidos en este estudio.

Por otro lado, las células que crecieron en condiciones limitantes de N y P presentaron también concentraciones internas de N (Q_N) similares. Este resultado podría estar relacionado con la movilización de ficobiliproteínas (pigmentos fotosintéticos ricos en N característicos de criptofíceas, cianobacterias y algas rojas). LEWITUS & CARON (1990) observaron que en condiciones limitantes de N, e incluso de P, la criptofícea *Pyrenomonas salina* movilizaba el N de sus ficoeritrinas para satisfacer la demanda de N necesaria para el crecimiento celular. Estos autores sugirieron que la movilización de este N endógeno de las ficobiliproteínas, también en cultivos limitados por P, podría reflejar una respuesta generalizada de esta

criptofíceas cuando se enfrenta con condiciones estresantes de algún nutriente. En la cianobacteria *Agmenellum quadruplicatum* también se ha observado una pérdida de ficocianina en respuesta a un descenso de P en el medio, simultánea con una menor tasa de ingestión de nitrato y menor contenido en N total celular (STEVENS *et ál.*, 1981).

Las imágenes de microscopía óptica y electrónica de transmisión revelaron que las algas que crecieron en condiciones limitantes de P presentaban grandes inclusiones de lípidos, polisacáridos y proteínas, situadas en la proximidad de la citofaringe de estas células. La presencia de estas inclusiones de naturaleza orgánica podría indicar que estas algas en condiciones limitantes de P desarrollaron un comportamiento de nutrición fagotrófica de sustancias orgánicas presentes en el medio, que podrían ser bacterias y/o restos orgánicos de células de *Cryptomonas* en descomposición. Numerosos autores han descrito que *Cryptomonas* puede ingerir partículas del tamaño de bacterias (SANDERS & PORTER, 1988; TRANVIK *et ál.*, 1989; NYGAARD & TOBIESEN, 1993; ROBERTS & LAYBOURN-PARRY, 1999; URABE *et ál.*, 2000) de manera que estas algas pueden ser consideradas mixotróficas. Sin embargo, la función fagotrófica en este género no está muy clara y es una línea de investigación en desarrollo creciente. Recientemente URABE *et ál.* (2000) han sugerido que la nutrición fagotrófica en *Cryptomonas* podría ser una estrategia para adquirir N y P cuando la fotosíntesis tiene lugar en condiciones de limitación de nutrientes inorgánicos. No obstante, es necesario realizar más estudios que corroboren el origen de estas inclusiones y caractericen de manera cuantitativa su contenido.

Además, las imágenes de microscopía electrónica de transmisión revelaron que el aparato fotosintético de las células de *Cryptomonas* cultivadas bajo limitación de P estaba mucho menos desarrollado que el de las células cultivadas sin limitación de nutrientes. Este hecho podría estar también relacionado con la posible nutrición heterotrófica desarrollada por *Cryptomonas* en condiciones limitantes de fósforo. LEWITUS *et ál.* (1991) observaron que *Pyrenomonas salina*, con capacidad de nutrición autótrofa y heterótrofa, respondía a la adición de glicerol como sustrato orgánico con una desorganización de su sistema fotosintético como consecuencia de un aumento en su nutrición heterotrófica. Estas células de *Pyrenomonas* presentaban una menor cantidad de tilacoides por célula además de un menor contenido en ficoeritrina (pigmento fotosintético rico en nitrógeno). LEWITUS *et ál.* (1991)

sugirieron que el aumento de la nutrición heterotrófica en *Pyrenomonas* podría haber reducido el potencial de estas células para capturar energía luminosa. De este modo, el menor número de tilacoides observado en los cloroplastos de las células de *Cryptomonas* limitadas en P en el presente estudio apoya la idea de que estas células posiblemente desarrollaron una nutrición heterotrófica.

En el presente estudio se ha mostrado por primera vez que algas cultivadas en condiciones limitantes en nutrientes pueden ser de mejor calidad nutricional para el crecimiento de organismos zooplanctónicos. *Keratella* alcanzó la tasa de crecimiento más alta cuando se alimentó con células de *Cryptomonas* cultivadas bajo limitación de P a baja concentración de alimento (próxima al nivel de alimento umbral para su crecimiento).

Algunos estudios han sugerido una limitación mineral directa del zooplancton (HESSEN, 1992; STERNER, 1993), mientras que otros han hecho más hincapié en la importancia de los constituyentes bioquímicos como los ácidos grasos poliinsaturados (AHLGREN *et ál.*, 1990; MÜLLER-NAVARRA *et ál.*, 2000) y los aminoácidos (GUISANDE *et ál.*, 1999). No obstante, también se ha descrito que los distintos taxones que componen una comunidad zooplanctónica (copépodos, cladóceros y rotíferos) responden de manera diferente a la adición de emulsiones de estos ácidos grasos poliinsaturados siendo, por tanto, muy difícil generalizar cuales son los factores limitantes en los ecosistemas acuáticos (BOERSMA & STELZER, 2000). Recientemente, BOERSMA (2000) ha sugerido que la limitación mineral y la limitación bioquímica de las algas juegan ambas un papel muy importante en el crecimiento y dinámica poblacional de los organismos del zooplancton, pero los ácidos grasos poliinsaturados son realmente importantes sólo cuando la razón C:P de las algas es bastante baja (las algas contienen suficiente fósforo) de forma que los requerimientos minerales deben ser cubiertos primero. En el presente estudio se ha mostrado que el contenido en P de las células algales puede influir considerablemente en la tasa de crecimiento de *Keratella* ya que variaciones relativamente pequeñas en la razón C:P de *Cryptomonas* desde 75 a 133 reducían significativamente la tasa de crecimiento del rotífero a baja concentración de alimento. El aparente almacenamiento de P observado en las células limitadas por nutrientes podría explicar porqué *Keratella* alcanzó tasas de crecimiento positivas a tan baja concentración de alimento cuando se alimentó con células de *Cryptomonas* cultivadas bajo limitación de P y N.

Algunos autores han sugerido que la diferencia entre un alimento de baja calidad y otro de alta calidad debería ser menor a baja concentración de alimento que a alta concentración de alimento (STERNER & ROBINSON, 1994; ROTHHAUPT, 1995). Sin embargo, en contraste con estos estudios previos que utilizaron *Scenedesmus* como fuente de alimento algal, en el presente estudio el efecto de la diferente calidad de *Cryptomonas* sobre el crecimiento de *Keratella* se reflejó solamente a baja concentración de alimento. La diferente respuesta de *Scenedesmus* y *Cryptomonas* a la disponibilidad de nutrientes podría explicar estas diferencias. LÜRLING & VAN DONK (1997) observaron, utilizando cinco especies algales como alimento para *Daphnia*, que los animales que se alimentaron con varias especies algales limitadas en P, incluida *Scenedesmus acutus*, producían menos descendientes con la excepción de *Cryptomonas pyrenoidifera* limitada en P.

Resistencia al ayuno

En este estudio se planteó la hipótesis de que la resistencia al ayuno podría reflejar la habilidad para almacenar energía durante periodos de fluctuación en la calidad del alimento. Los resultados obtenidos mostraron que los individuos de *Keratella* alimentados con células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio LN vivían más tiempo bajo condiciones de ayuno. Estas células de *Cryptomonas* tenían mayor contenido en P que las células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio SLN. Además de esto, estas células tenían menor contenido en N y mayor razón C:N que las células de *Cryptomonas* cultivadas en el medio SLN. GROEGER *et ál.* (1991) mostraron que individuos de *Daphnia* alimentados con *Scenedesmus* cultivado en un medio deficiente en N destinaban más lípidos a sus huevos, de manera que su descendencia vivía más tiempo en condiciones de ayuno. CONDE-PORCUNA (2000) también sugirió que el rotífero *Anuraeopsis* podría ser menos susceptible al ayuno cuando hay limitación de nitrógeno.

Algunos estudios han mostrado que los organismos desarrollan adaptaciones ante la fluctuación de las concentraciones de alimento (CALOW & WOLLHEAD, 1977; GILBERT & SCHREIBER, 1998; STELZER, 2001). STELZER (2001) observó que el rotífero *Synchaeta* parece seleccionar una estrategia de reproducción arriesgada cuando el nivel de recursos es bajo. En casos extremos de esta estrategia, un organismo iteróparo puede llegar a ser esencialmente semélparo. Otras adaptaciones

alternativas cuando los organismos se enfrentan a concentraciones bajas de alimento es la producción de huevos de diapausa (GILBERT & SCHREIBER, 1998) o la detención de su reproducción al enfrentarse con un ayuno repentino, con el fin de usar el excedente de energía para mantener su metabolismo y así prolongar su vida para desarrollar una reproducción más tardía (CALOW & WOLLHEAD, 1977). Los organismos del zooplancton podrían desarrollar estrategias similares para enfrentarse a las fluctuaciones de la calidad del alimento en los ecosistemas naturales y, en consecuencia, una de ellas podría ser vivir más tiempo en condiciones de ayuno. KIRK (1997) sugiere que el tiempo que las especies de rotíferos pueden sobrevivir en condiciones de ayuno debería permitir la supervivencia de algunas especies durante periodos cortos de baja cantidad o calidad de los recursos como consecuencia, por ejemplo, de la rápida fluctuación en la abundancia de criptofíceas.

Los diferentes resultados obtenidos en este capítulo tienen implicaciones para comprender el ciclo de nutrientes en los lagos. Además, sería necesario estudiar las posibles estrategias del zooplancton para enfrentarse a las fluctuaciones de la calidad del alimento en los ecosistemas acuáticos. KIRK (1997) sugiere que la diferente resistencia al ayuno puede afectar al resultado de la competencia y a la estructura de una comunidad. CONDE-PORCUNA (2000) observó que el rotífero *Anuraeopsis* era menos susceptible a la competencia explotativa por *Daphnia* cuando se alimentaba con *Scenedesmus* limitado en N. Para comprender el ciclo de nutrientes y las estrategias del zooplancton en los sistemas acuáticos se necesitan más estudios que analicen las interacciones entre varias especies de zooplancton y varias especies de fitoplancton en condiciones limitantes de nutrientes.

5

Competencia entre cladóceros y rotíferos: importancia relativa de la competencia explotativa, interferencia mecánica e interferencia química de *Daphnia longispina* sobre *Keratella cochlearis*

INTRODUCCIÓN

Numerosas observaciones de campo y estudios de laboratorio han puesto de manifiesto que los cladóceros pueden suprimir poblaciones de rotíferos, indirectamente, por competencia explotativa (CE) y, directamente, por competencia por interferencia. Dentro de la competencia por interferencia puede distinguirse la interferencia mecánica (IM) (BURNS & GILBERT, 1986a, 1986b; GILBERT, 1988b), y la interferencia química (IQ) (CONDE-PORCUNA, 1998). En la IM, los rotíferos entran en la cámara branquial de grandes dáphnidos y son posteriormente rechazados con daños que pueden ser letales o subletales. La intensidad de la CE y la IM aumenta al aumentar el tamaño y la densidad del cladóceros (BURNS & GILBERT, 1986b; GILBERT, 1988a; MACISAAC & GILBERT, 1991b).

Daphnia puede competir explotativamente con todas las especies de rotíferos y por IM selectivamente con las especies de rotíferos más susceptibles (GILBERT, 1988a). Las especies de rotíferos más susceptibles a la IM con *Daphnia* son generalmente pequeñas (p. ej. algunas especies de *Keratella* y *Synchaeta*) o de cuerpo blando (p. ej. *Ascomorpha ecaudis*), mientras que las menos susceptibles son generalmente especies de mayor tamaño (p. ej. *Asplanchna*, algunas especies de *Synchaeta*, colonias de *Conochilus*), con esqueletos rígidos y

espinosos (p. ej. algunas especies de *Keratella* y *Kellicottia*), o con respuestas de escape efectivas (p. ej. *Polyarthra*) (GILBERT, 1988b).

El efecto de los grandes dáfnidos sobre la estructura de las comunidades naturales de rotíferos será diferente cuando los recursos alimenticios sean abundantes y cuando sean limitantes (GILBERT, 1988a). Cuando el alimento sea abundante los individuos de *Daphnia* de mayor tamaño podrán ocasionar altas tasas de mortalidad por IM de las especies de rotíferos más susceptibles, mientras que las especies menos susceptibles para interferir mecánicamente con *Daphnia* deberían sobrevivir y reproducirse. Estudios de laboratorio han mostrado que la IM entre grandes dáfnidos y rotíferos se intensifica en ausencia de alimento (BURNS & GILBERT, 1986a). De este modo, GILBERT (1988a) sugería que las tasas de mortalidad inducidas por IM de las especies de rotíferos más susceptibles deberían ser incluso más altas cuando el alimento sea limitante. En consecuencia, cuando el alimento sea limitante en las comunidades naturales, los grandes dáfnidos podrán suprimir todas las especies de rotíferos pero especialmente aquellas que son más susceptibles a la IM.

MACISAAC & GILBERT (1991b), mediante un estudio de laboratorio, evaluaron la importancia relativa de la CE y la IM de distintas especies de cladóceros sobre *Keratella cochlearis*. En este estudio, MACISAAC & GILBERT mostraron que los cladóceros más pequeños pueden suprimir las poblaciones de rotíferos exclusivamente por CE, mientras que los cladóceros de mayor tamaño (≥ 1.2 mm) lo hacen principalmente por IM. Evaluar la importancia relativa de estos mecanismos en situaciones naturales resulta complicado ya que estos mecanismos no son fácilmente separables cuando actúan simultáneamente, y además pueden variar en función de varios factores tales como la vulnerabilidad de las distintas especies de rotíferos a la IM, la disponibilidad de alimento y las respuestas numéricas de los rotíferos, la temperatura y el solapamiento espacial entre cladóceros y rotíferos en la columna de agua (MACISAAC & GILBERT, 1990, 1991a). De este modo, el efecto de los cladóceros sobre las especies de rotíferos en medios naturales puede incluso no ser evidente, sobre todo si se tiene en cuenta que gran parte de las observaciones realizadas corresponden a experimentos de laboratorio bajo condiciones muchas veces no extrapolables al medio natural. Sólo algunos estudios han intentado evaluar la importancia relativa de la CE y la IM en sistemas naturales, sugiriendo que estos mecanismos

pueden influir de manera importante sobre la composición de especies y estructura de tamaños de las comunidades de rotíferos (véase p. ej. CONDE-PORCUNA *et ál.*, 1994; FUSSMANN, 1996).

Pero además de estos dos mecanismos de interacción entre cladóceros y rotíferos ampliamente documentados, existe un tercer mecanismo, la interferencia química, con el que los cladóceros pueden también afectar a las poblaciones de rotíferos y que ha recibido mucho menos atención. Si bien la comunicación química en animales planctónicos ha sido un tema de investigación en desarrollo creciente (véase revisiones por LARSSON & DODSON (1993) y SNELL (1998)), los estudios desarrollados se han centrado principalmente en la inducción de cambios morfológicos (p. ej. BEAUCHAMP, 1952; GILBERT, 1966; STEMBERGER & GILBERT, 1987a; PAREJKO & DODSON, 1990; TOLLRIAN & VON ELERT, 1994) y de comportamiento (FOLT & GOLDMAN, 1981; DE MEESTER, 1993; MATVEEV, 1993; VON ELERT & LOOSE, 1996) inducidos por competidores y/o depredadores, y en la implicación de sustancias químicas en la reproducción sexual de rotíferos (p. ej. GILBERT, 1963; SNELL *et ál.*, 1988; CARMONA *et ál.* 1993; SNELL & CARMONA, 1995; SNELL & RICO-MARTÍNEZ, 1996). Sin embargo, son escasos los estudios que han analizado cambios de historia de vida en rotíferos inducidos por sus competidores y/o depredadores (STEMBERGER, 1988, 1990; CONDE-PORCUNA, 1998). CONDE-PORCUNA (1998), mediante experimentos de tablas de vida, observó que *Daphnia longispina* podía reducir la tasa de crecimiento poblacional de *K. cochlearis* por interferencia química (IQ), mediante la cual sustancias químicas exudadas por el cladóceros inducían fecundidades más bajas en esta especie de rotífero. Sin embargo, la importancia relativa de este mecanismo de IQ entre cladóceros y rotíferos respecto a los mecanismos de CE e IM no ha sido aún evaluada, y tampoco se conoce nada sobre el tamaño y naturaleza de esta(s) sustancia(s) exudada(s) por los cladóceros.

El objetivo de este capítulo fue analizar la importancia relativa de la interferencia química y de la competencia explotativa e interferencia mecánica de *Daphnia* sobre una población de *K. cochlearis* a baja concentración de alimento, y caracterizar el corte molecular de la(s) sustancia(s) exudada(s) por *Daphnia* responsable(s) de la interferencia química sobre esta especie de rotífero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los individuos de *Keratella cochlearis* y el alimento algal empleado (*Cryptomonas* sp.) procedían de los cultivos *stock* mantenidos en el laboratorio en las condiciones previamente señaladas en el capítulo 3. Ya que los individuos de *K. cochlearis* de este cultivo *stock* pertenecen a un genotipo con espina fija, se pueden eliminar los posibles gastos energéticos que podría suponer la inducción de cambios morfológicos en el rotífero. Para realizar este estudio se aisló de forma adicional del embalse de Iznájar una hembra partenogenética de *Daphnia longispina* a partir de la cual se estableció un cultivo clónico. El cultivo de *Daphnia* se estableció dos meses antes de empezar este experimento y se mantuvo en las mismas condiciones que los cultivos *stock* de *K. cochlearis*, alimentándose con *Cryptomonas* ($\sim 0.2 \text{ mg C L}^{-1}$; $700\text{-}800 \text{ cel ml}^{-1}$) cada 1-2 días.

Se realizaron dos medios experimentales: un medio control (2 litros de agua mineral) y un medio precondicionado con *Daphnia* (2 litros de agua mineral con 130 individuos de *Daphnia longispina* con longitudes superiores a 1.2 mm) (véase Figura 5.1.). *Daphnia* se alimentaba diariamente con 200 cel ml^{-1} de *Cryptomonas*. Para reducir la posible influencia de sustancias químicas asociadas con el alimento de *Daphnia* se añadía también diariamente la misma cantidad de algas al medio control. Después de 6 días de acondicionamiento previo se filtró el 50% de cada medio experimental el primer día de experimento con los rotíferos, y el 20% los días siguientes, utilizando filtros de $0.22 \mu\text{m}$ de baja adsorción proteica (Durapore PVDF, No. GVWP04700; Millipore). Posteriormente se añadía el mismo volumen de agua mineral estéril a cada medio experimental.

Para caracterizar el corte molecular de la(s) sustancia(s) exudada(s) por *Daphnia* responsable(s) de la interferencia química sobre *Keratella*, se utilizó un sistema de ultrafiltración tangencial (Pellicon XL, No. PXCO 05C 50; Millipore) con membrana de celulosa regenerada de 5000 dalton (Da) de peso molecular teórico, tal como se describe en las instrucciones para su uso. En estos sistemas de filtración con flujo tangencial (TFF), el fluido, bombeado con una bomba peristáltica, fluye tangencialmente a lo largo de la superficie de la membrana permitiendo clarificar y concentrar a su vez determinadas macromoléculas presentes en el fluido. Gracias al flujo tangencial, las macromoléculas que son demasiado grandes para pasar a través de los poros de la membrana no se

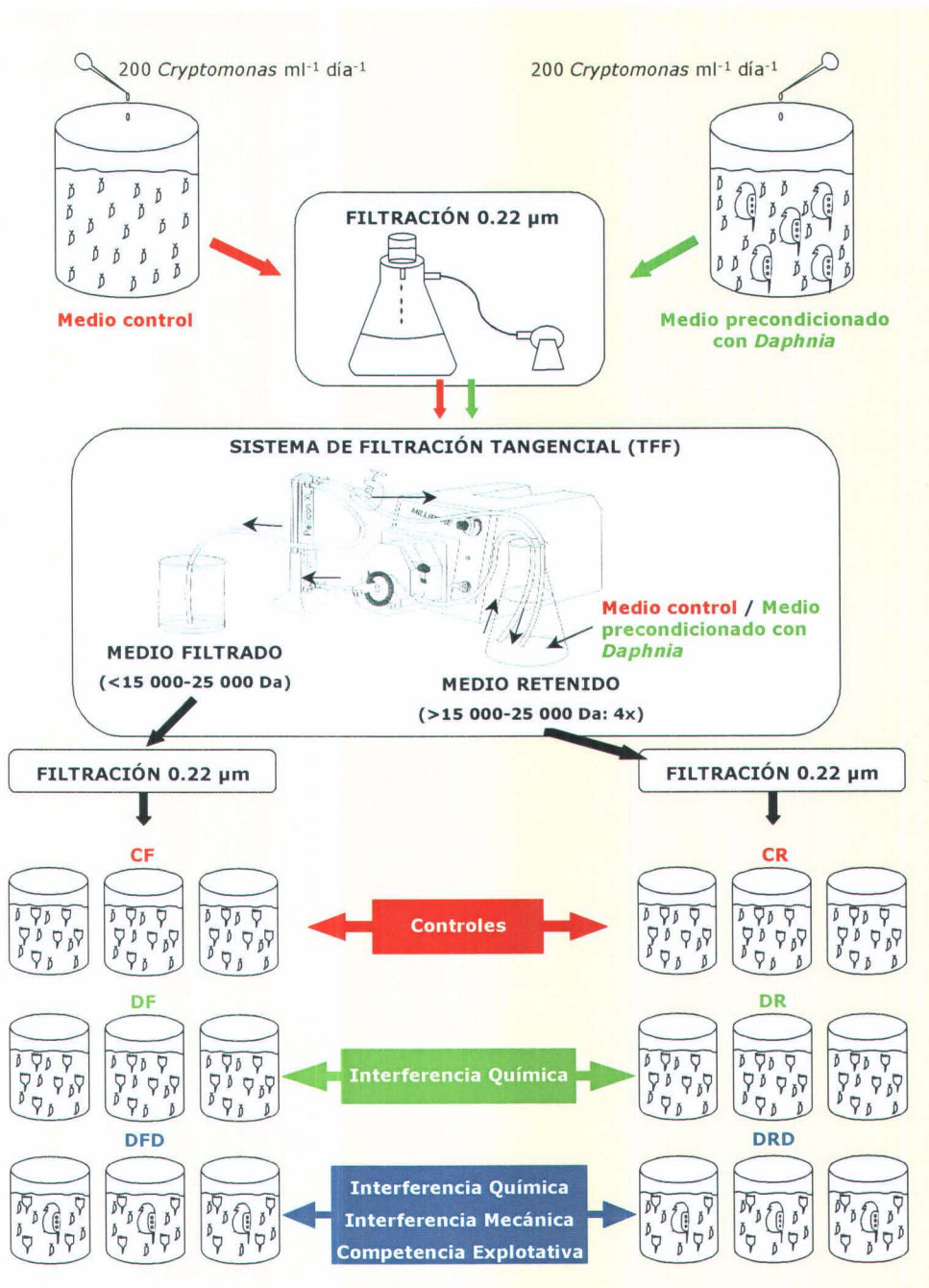


Figura 5.1. Diseño experimental. (CF=medio control filtrado; CR=medio control retenido; DF=medio acondicionado con *Daphnia* filtrado; DR=medio acondicionado con *Daphnia* retenido; DFD=medio acondicionado con *Daphnia* filtrado con una *Daphnia*; DRD=medio acondicionado con *Daphnia* retenido con una *Daphnia*).

adhieren sobre la superficie de la membrana sino que son movilizadas con el flujo tangencial formando parte de lo que comúnmente se denomina fluido retenido (Figura 5.2.). En este estudio, el volumen inicial del medio control y del medio preconicionado con *Daphnia* se redujo 4 veces con el sistema TFF. Según las instrucciones de uso que acompañan a estos sistemas, este tipo de membranas de ultrafiltración no indican una retención absoluta. De esta forma, una membrana de 5000 Da podría retener macromoléculas disueltas en el fluido con pesos moleculares superiores a 15 000-25 000 Da (de 3 a 5 veces el corte molecular teórico empleado). Así pues, en el presente estudio, en los fluidos filtrados a través de la membrana no habrá macromoléculas con pesos moleculares superiores a 15 000-25 000 Da, y en los fluidos retenidos la concentración de sustancias químicas menores de 15 000-25 000 Da será similar a la de los filtrados. En cambio, en la fracción retenida se concentrarán las macromoléculas con pesos moleculares superiores a 15000-25000 Da, las cuales se encontrarán 4 veces más concentradas respecto a su concentración en los medios experimentales antes de ser tratados con el sistema de filtración tangencial.

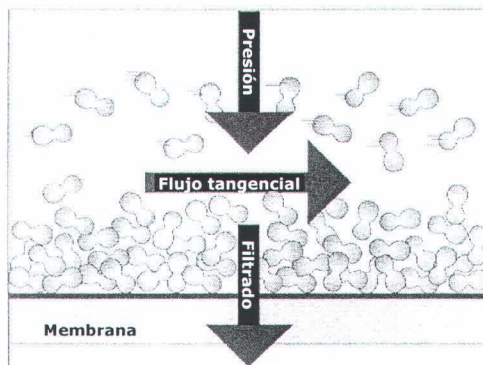


Figura 5.2. Filtración con flujo tangencial.

Por tanto, con el sistema TFF se obtuvieron cuatro medios experimentales:

1. Medio control filtrado: **CF**
2. Medio control retenido: **CR**
3. Medio con sustancias químicas exudadas por *Daphnia* filtrado: **DF**
4. Medio con sustancias químicas exudadas por *Daphnia* retenido: **DR**

Estos cuatro medios experimentales eran de nuevo filtrados utilizando los filtros de baja adsorción proteica de 0.22 μm con el fin de eliminar la posible contaminación bacteriana que podría haberse originado después de ser manipulados con el sistema de filtración tangencial.

Con el objetivo de evaluar los efectos de la IQ de *Daphnia* sobre una población de *K. cochlearis*, así como la importancia relativa de la IQ respecto a la CE e IM, y poder estimar el peso molecular de la(s) sustancia(s) responsable(s) de esta IQ, se realizaron 6 tratamientos experimentales con 3 réplicas cada uno (Figura 5.1.):

- ❖ **2 tratamientos control:** uno con medio control filtrado (**CF**), y otro con medio control retenido (**CR**).
- ❖ **2 tratamientos donde actuaría la IQ:** uno con medio precondicionado con *Daphnia* filtrado (**DF**), y otro con medio precondicionado con *Daphnia* retenido (**DR**).
- ❖ **2 tratamientos donde actuarían conjuntamente la CE, la IM y la IQ:** uno con medio precondicionado con *Daphnia* filtrado en el que se añadió una *Daphnia* (**DFD**), y otro con medio precondicionado con *Daphnia* retenido en el que se añadió otra *Daphnia* (**DRD**). Los individuos de *Daphnia* utilizados en estos tratamientos tenían una longitud de 1.50-1.65 mm.

Todos los tratamientos experimentales contenían 40 ml del medio correspondiente. La densidad inicial en cada uno de los tratamientos fue de 20 hembras de *K. cochlearis* sin huevo cogidas al azar del cultivo *stock*. La concentración de alimento inicial fue de 100 cel ml⁻¹ de *Cryptomonas*, estimada contando dos submuestras con cámaras Uthermöhl tal como se detalla en el capítulo 3 de esta Tesis. Los tratamientos se mantuvieron en una cámara de cultivo a 20 ± 0.5°C con una radiación de ~20 µE m⁻² s⁻¹ (14:10 h luz:oscuridad).

Cada 2 días se contaba el número de individuos de *Keratella* y a continuación los rotíferos se transferían en los mismos medios experimentales reemplazando un 40% del volumen (16 ml) con medio fresco con 100 cel ml⁻¹ de *Cryptomonas*. El 60% del volumen final (24 ml) era el medio de los días anteriores filtrado por una malla de nylon de 20 µm para eliminar los detritus y desechos generados, y permitir a su vez que se filtraran las células de *Cryptomonas* que no habían sido aún ingeridas.

La duración del experimento fue de 8 días, momento en que se llegaron a alcanzar elevadas densidades de rotíferos en algunos tratamientos ($\sim 100 \text{ ind L}^{-1}$), y se observó una fuerte limitación por cantidad de alimento (véase resultados).

Como *Daphnia* excreta amonio y es bien conocido que altas concentraciones de este compuesto nitrogenado pueden reducir la reproducción de los organismos del zooplancton, se analizó la concentración de amonio en el segundo y sexto día de experimento después de transferir los rotíferos a los medios experimentales parcialmente renovados. La concentración de amonio se estimó mediante un análisis cuantitativo fotométrico usando un juego de reactivos (Spectroquant, Merck) en cada una de las réplicas de los seis tratamientos experimentales. Este método, con un límite de detección de $30\text{-}3000 \mu\text{g L}^{-1}$, está basado en una reacción de color en la que el amonio presente en la muestra reacciona para dar un indofenol azul.

Además de estimar la concentración de amonio en cada uno de los tratamientos experimentales al principio y al final del experimento, cada día que se transferían los rotíferos se medía también el pH en los cuatro medios experimentales obtenidos con el sistema de filtración tangencial (CF, DF, CR y DR), utilizando un medidor de pH (Crison GLP22) previamente calibrado.

En el segundo y sexto día de experimento, después de transferir los rotíferos, se estimó también la densidad de *Cryptomonas* en cada una de las réplicas experimentales. La concentración residual de algas se estimó por duplicado sedimentando 3-4 ml de medio fijado con lugol acético en cámaras Uthermöhl. Debido a la baja densidad de células utilizada en estos experimentos y al poco volumen de medio que se disponía, se contaron todas las células sedimentadas sobre la cámara para poder ser más precisa la cuantificación.

El efecto de la IQ de *Daphnia* sobre la población de *K. cochlearis* en el medio con exudados de *Daphnia* filtrado (IQ_F) y retenido (IQ_R) obtenidos con el sistema de filtración tangencial, y el efecto conjunto de la CE e IM también en el medio filtrado [(CE+IM)_F] y retenido [(CE+IM)_R], se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$IQ_F = \frac{CF - DF}{CF} \times 100$$

$$IQ_R = \frac{CR - DR}{CR} \times 100$$

$$(CE + IM)_F = \frac{DF - DFD}{CF} \times 100$$

$$(CE + IM)_R = \frac{DR - DRD}{CR} \times 100$$

donde CF, DF, DFD, CR, DR y DRD son el número medio de individuos de *Keratella* de las tres réplicas en los correspondientes tratamientos.

Para evaluar la importancia relativa de la IQ de *Daphnia* sobre la población de *Keratella* en el medio filtrado (IQ_{R_F}) y en el medio retenido (IQ_{R_R}) con exudados de *Daphnia* respecto a los tres mecanismos de interacción entre *Daphnia* y *Keratella*, se utilizaron las siguientes expresiones:

$$IQ_{R_F} = \frac{IQ_F}{IQ_F + (CE + IM)_F} \times 100$$

$$IQ_{R_R} = \frac{IQ_R}{IQ_R + (CE + IM)_R} \times 100$$

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA (Statsoft). La normalidad de las variables se analizó con el análisis de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con el análisis de Bartlett (SOKAL & ROHLF, 1995). Para analizar los efectos de los diferentes mecanismos de interacción de *Daphnia* sobre la dinámica poblacional de *K. cochlearis*, y evaluar si los medios experimentales filtrados y retenidos obtenidos con el sistema de filtración tangencial ejercían algún efecto sobre la dinámica del rotífero, se realizó un análisis de la varianza de dos vías para medidas repetidas. Este tipo de análisis son recomendados para evitar la pseudoreplicación temporal cuando se utilizan diseños experimentales con medidas repetidas en el tiempo (HULBERT & WHITE, 1993). El efecto de la IQ así como el efecto conjunto de la CE, IM e IQ sobre la población de *Keratella* se comparó mediante análisis de la mínima diferencia significativa (LSD, *least-significant-difference*), ajustando los valores de probabilidad al número de análisis simultáneos mediante el método secuencial de Bonferroni (RICE, 1989). Para analizar diferencias en la concentración residual de *Cryptomonas* entre algunos tratamientos experimentales se realizaron análisis no paramétricos (pruebas *U* de Mann-Withney) en lugar de análisis paramétricos debido a la heterogeneidad de varianzas.

RESULTADOS

La densidad de *K. cochlearis* aumentó progresivamente en el tiempo en los tratamientos control y en los tratamientos con sustancias exudadas por *Daphnia* de forma más o menos paralela, mientras que el rotífero se mantuvo con densidades muy bajas, similares a la densidad inicial, en los tratamientos con medios precondicionados con *Daphnia* donde el cladóceros estaba presente (Figura 5.3.). Aunque *Daphnia* impidió que la población de *Keratella* alcanzara altas densidades, el cladóceros no llegó a excluir completamente a la población de *Keratella*.

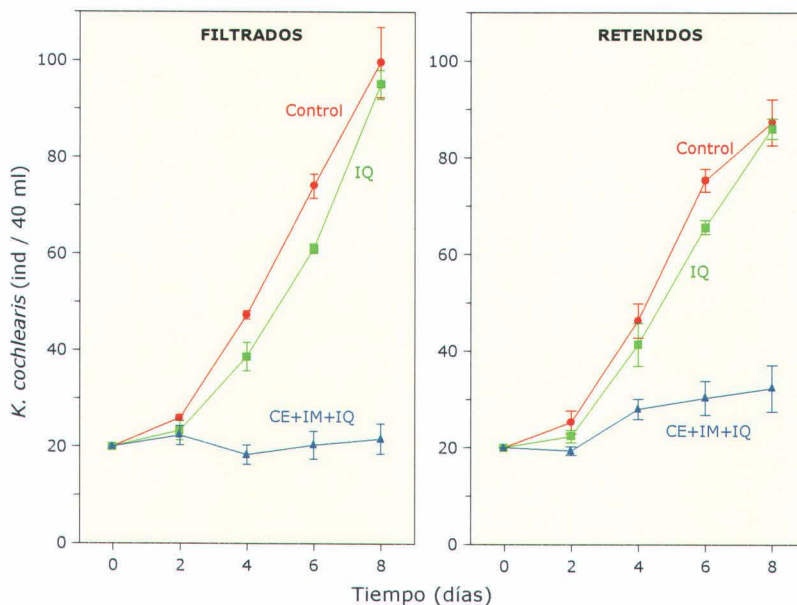


Figura 5.3. Densidad de *K. cochlearis* en los tratamientos experimentales con medios filtrados y retenidos obtenidos con el sistema de filtración tangencial. IQ= interferencia química, IM= interferencia mecánica, CE= competencia explotativa. (Media \pm error estándar, $n = 3$).

Un ANOVA de dos vías para medidas repetidas mostró que *Daphnia* redujo significativamente la densidad de *Keratella*, y que el efecto de *Daphnia* sobre la población del rotífero se hacía más intenso a lo largo del tiempo (*Daphnia* x tiempo) (Tabla 5.1.). Análisis LSD mostraron que *Daphnia* reducía significativamente la densidad de *K. cochlearis* por IQ, y especialmente por CE+IM (Tabla 5.2.).

Tabla 5.1. Análisis de la varianza para medidas repetidas evaluando los efectos de los mecanismos de interacción de *Daphnia* y de los medios experimentales filtrados y retenidos obtenidos con el sistema de filtración tangencial (TFF) sobre la dinámica de la población de *Keratella cochlearis*.

Efecto	g.l.	MS	F	p
<i>Daphnia</i>	2	8972.1	180.04	<0.000001
TFF	1	18	0.36	0.559
<i>Daphnia</i> x TFF	2	162.5	3.26	0.074
Error	12	49.8		
Tiempo	3	7646.1	367.01	<0.000001
<i>Daphnia</i> x tiempo	6	1474.4	70.77	<0.000001
TFF x tiempo	3	80.7	3.87	0.017
<i>Daphnia</i> x TFF x tiempo	6	48.1	2.31	0.055
Error	36	20.8		

g.l.: grados de libertad.

La dinámica temporal de la población de *K. cochlearis* fue similar en los medios filtrados y retenidos obtenidos con el sistema de filtración tangencial (TFF) en todos los tratamientos experimentales (Figura 5.3.). Un ANOVA para medidas repetidas no mostró un efecto significativo de este factor (Tabla 5.1.). Este resultado sugiere que la(s) sustancia(s) responsable(s) de la IQ de *Daphnia* sobre *Keratella* se encuentra(n) en la misma concentración en el medio filtrado y en el medio retenido precondicionado con *Daphnia*. De este modo, esta(s) sustancia(s) tendría(n) un peso molecular inferior a 15 000-25 000 Da (véase material y métodos).

El pH varió entre 8.24 y 8.39 en los medios previamente precondicionados con *Daphnia*, siendo prácticamente similar al pH medido en los medios control filtrado y retenido (Tabla 5.3.). La concentración media de amonio estimada en los días 2 y 6 del experimento también fue similar en todos los tratamientos

Tabla 5.2. Valores de probabilidad de comparaciones LSD entre la densidad de *K. cochlearis* en los diferentes tratamientos experimentales (día2-día8): control, interferencia química (IQ), competencia explotativa e interferencia mecánica y química (CE+IM+IQ).

Tratamiento	IQ	CE+IM+IQ
Control	0.012*	<0.000001
IQ		<0.000001

*Valor de probabilidad significativo (<0.05) considerando el número de análisis simultáneos utilizando el método secuencial de Bonferroni.

experimentales, sin encontrarse diferencias significativas ($p > 0.05$; Tabla 5.3.).

La importancia absoluta y relativa de la IQ y de la CE e IM de *Daphnia* sobre la población de *Keratella* variaron en función del tiempo de forma similar en los medios filtrados y retenidos obtenidos con el sistema TFF (Figura 5.4.). La IQ disminuía en el tiempo en términos absolutos y relativos, mientras que la CE e IM aumentaban progresivamente hasta el final del experimento. La importancia relativa de la IQ en el segundo día de experimento fue de un 50-73%, y disminuyó rápidamente hasta llegar a ser despreciable en el día 8.

Tabla 5.3. Valores medios \pm error estándar de pH y concentración de amonio (NH_4^+) en los diferentes tratamientos experimentales.

Tratamientos	pH (Día 0-Día 8)	NH_4^+ ($\mu\text{g L}^{-1}$) (Día 2 y Día 6)
CF	8.21 \pm 0.04	87.30 \pm 30.35
CR	8.30 \pm 0.05	89.94 \pm 15.58
DF	8.24 \pm 0.07	65.65 \pm 8.18
DR	8.39 \pm 0.04	84.39 \pm 8.45
DFD	-	76.74 \pm 31.94
DRD	-	66.23 \pm 0.74

CF=medio control filtrado; CR=medio control retenido; DF=medio acondicionado con *Daphnia* filtrado; DR=medio acondicionado con *Daphnia* retenido; DFD=medio acondicionado con *Daphnia* filtrado con una *Daphnia*; DRD=medio acondicionado con *Daphnia* retenido con una *Daphnia*.

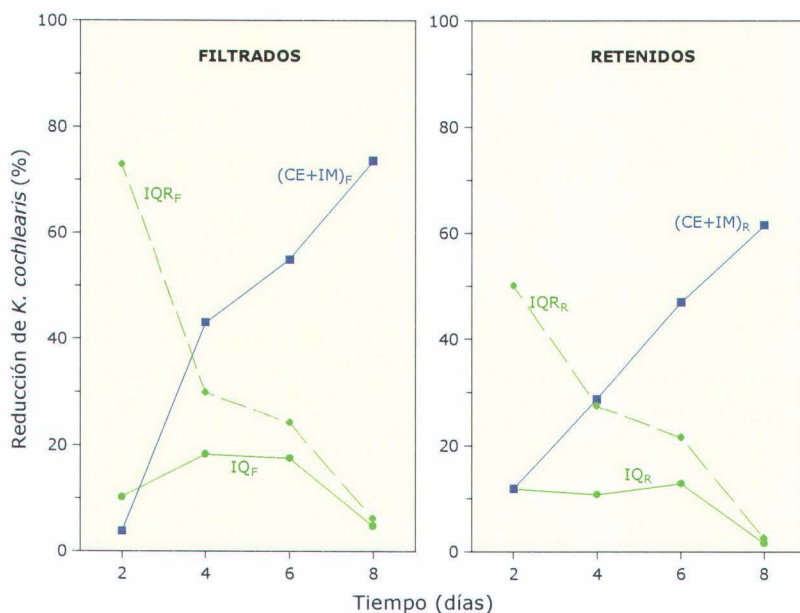


Figura 5.4. Reducción de la densidad de *K. cochlearis* por interferencia química (IQ_F e IQ_R) y por competencia explotativa e interferencia mecánica [(CE+IM)_F y (CE+IM)_R] con *Daphnia* en los medios filtrados y retenidos obtenidos con el sistema de filtración tangencial. Las líneas verdes discontinuas representan la contribución relativa de la IQ de *Daphnia* respecto a los tres mecanismos de interacción.

La concentración media residual de *Cryptomonas* estimada en los tratamientos de IQ de *Daphnia* (filtrado y retenido) después de los dos primeros días de experimento no se redujo respecto a la concentración inicial de alimento (100 cel ml⁻¹, véase Figura 5.5.). En cambio, en los tratamientos control la concentración de alimento residual si se redujo respecto a la densidad inicial de *Cryptomonas*. Análisis *U* de Mann-Withney mostraron que la concentración residual de alimento en el día 2 de experimento era significativamente mayor en el tratamiento con medio preconicionado con *Daphnia* filtrado a través del sistema de filtración tangencial (DF) que en el medio control filtrado (CF) ($U=0.00$; $Z=-1.96$; $p<0.05$). No se pudo evaluar si en este mismo día de experimento había también diferencias significativas en la concentración de alimento residual en los respectivos tratamientos retenidos obtenidos con el sistema TFF debido a que el mal estado de conservación de 2 réplicas del tratamiento retenido del medio preconicionado con *Daphnia* (DR) impidió su contaje (véase Figura 5.5.)

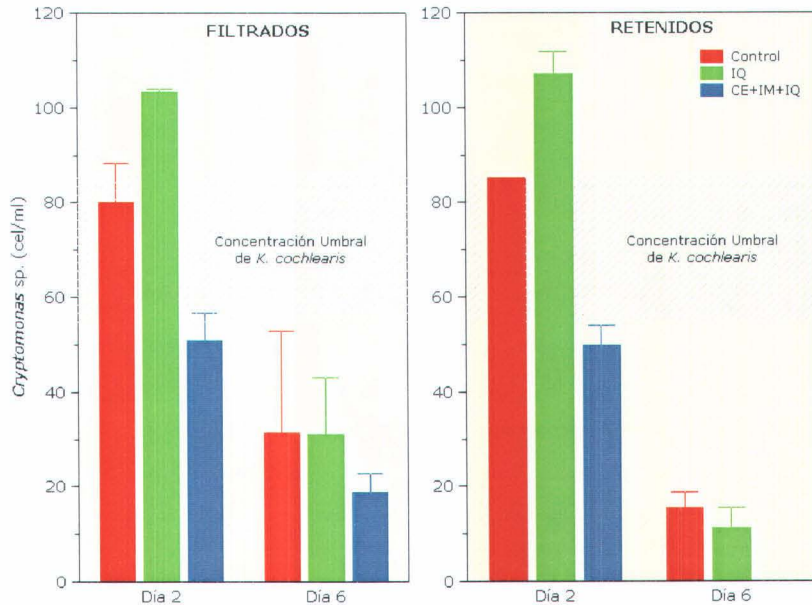


Figura 5.5. Concentración residual de alimento (media \pm error estándar, $n=3$) en los diferentes tratamientos experimentales: IQ= interferencia química, IM= interferencia mecánica, CE= competencia explotativa. La concentración residual de *Cryptomonas* no pudo estimarse en el día 2 de experimento en 2 réplicas del tratamiento IQ en el medio retenido, ni en el día 6 en ninguna de las tres réplicas del tratamiento CE+IM+IQ en el medio retenido (véase texto).

Por otro lado, la actividad de alimentación de *Daphnia* redujo la concentración de algas en el día 2 por debajo de la concentración de alimento umbral estimada para este clon de *K. cochlearis* alimentada con esta cepa de *Cryptomonas* (69 ± 15 (error estándar) cel ml^{-1} , véase capítulo 3). La densidad de *Cryptomonas* en el tratamiento control y en el tratamiento de IQ después de 6 días de experimento era prácticamente similar, y se encontraba en niveles muy por debajo de la concentración umbral de *Keratella*.

DISCUSIÓN

En este estudio se muestran evidencias de que *Daphnia* puede también afectar negativamente a la población del rotífero *Keratella cochlearis* por interferencia química. Aunque la densidad de *Keratella* aumentó en el tiempo de forma más o menos paralela en los medios control y en los medios precondicionados con *Daphnia* (Figura 5.3.), la densidad del rotífero era significativamente menor en los medios precondicionados con *Daphnia* que en los medios control (Tabla 5.2.). Ya que no se observaron diferencias de pH ni de concentración de amonio entre los diferentes tratamientos, estos resultados sugieren que en el medio precondicionado con *Daphnia* debería haber alguna sustancia química que pudiera ser responsable de la inhibición del crecimiento de *Keratella*. No obstante, la importancia relativa de esta IQ respecto a los mecanismos más conocidos de competencia explotativa e interferencia mecánica entre cladóceros y rotíferos es realmente despreciable. Es al comienzo del experimento (día 2) cuando la importancia relativa de la IQ es mayor o igual que la importancia relativa de la CE e IM (Figura 5.4.). Sin embargo, cuando los efectos de la limitación por la cantidad de alimento debido a la actividad de alimentación de *Daphnia* se hacen sentir sobre la población de *Keratella*, es la CE el mecanismo que ejerce una influencia mayor sobre la población del rotífero.

El efecto de la IM entre cladóceros y rotíferos debe manifestarse principalmente durante los primeros días de experimento (MACISAAC & GILBERT, 1991b). En este sentido, en el día 2 de experimento, análisis *LSD* no mostraron diferencias significativas de la densidad de *Keratella* ni entre los tratamientos CF y DFD ($p=0.54$), ni entre los tratamientos CR y DRD ($p=0.32$). De este modo, aunque el diseño experimental realizado en este estudio no permite discriminar

entre los efectos de la CE y la IM de *Daphnia* sobre *K. cochlearis*, estos resultados sugieren que la IM con grandes individuos de *Daphnia* (>1.2 mm) podría considerarse despreciable en estos experimentos. Además, los individuos de este clon de *K. cochlearis* tenían una espina posterior muy larga ($48.5 \pm 5.93 \mu\text{m}$), y se ha descrito que la presencia de esta espina posterior en *K. cochlearis* la hace menos vulnerable a la IM con *Daphnia* (GILBERT, 1988b). Por otro parte, la existencia de un efecto de *Daphnia* acentuado en el tiempo (Tabla 5.1.) sugiere la existencia de una fuerte CE (MACISAAC & GILBERT, 1991b; CONDE-PORCUNA, 2000).

En un estudio previo, CONDE-PORCUNA (1998) observó cambios de historia de vida en *K. cochlearis* inducidos por sustancias químicas excretadas por *Daphnia longispina*, utilizando también un genotipo de espina fija de *K. cochlearis*. En este estudio se mostraba que *K. cochlearis* reducía significativamente su fecundidad y, en consecuencia, su tasa de crecimiento en un medio precondicionado con *Daphnia*. CONDE-PORCUNA (1998) sugirió que esta menor producción de huevos de *Keratella* en el medio precondicionado con *Daphnia* podría ser debido a una reducción de la tasa de filtración del rotífero. CONDE-PORCUNA observó un efecto mucho más intenso de la IQ de *Daphnia* sobre *Keratella* que el observado en el presente estudio. Estas diferencias sugieren que diferentes cepas de *K. cochlearis* podrían tener diferente susceptibilidad a la IQ con cladóceros, y quizás también, que la calidad nutricional del alimento algal empleado (*Dictyosphaerium* vs. *Cryptomonas*) podría influir sobre la respuesta de los rotíferos a esta IQ.

La IQ ha sido descrita en estudios previos para copépodos y cladóceros (FOLT & GOLDMAN, 1981; MATVEEV, 1993). FOLT & GOLDMAN (1981) observaron que la tasa de filtración del copépodo *Diaptomus tyrrelli* se reducía en la presencia de su competidor y depredador potencial, *Epischura nevadensis*, a través de una sustancia química liberada en el agua por *Epischura*. MATVEEV (1993) observó que la tasa de alimentación de *Daphnia carinata* y *Daphnia lumholtzi* se reducía en presencia de una sustancia química excretada por *Daphnia carinata*, inhibiendo la alimentación de los individuos de su misma especie y la de los individuos de una especie competidora. En el presente estudio, en el día 2 de experimento se observó que la concentración residual de *Cryptomonas* en el medio precondicionado con *Daphnia* filtrado (DF) fue significativamente mayor que en el medio control filtrado (CF). Este resultado sugiere que los rotíferos podrían haber

reducido su tasa de filtración como consecuencia de la IQ de *Daphnia*. Esta posible menor tasa de filtración de los rotíferos durante los primeros días de experimento podría explicar por qué los efectos de la IQ del cladóceros sobre la dinámica temporal de *Keratella* se hicieron más patentes en los días 4 y 6 del experimento (Figura 5.3.). Sin embargo, habría que responder también a otra pregunta: ¿por qué la densidad media de *Keratella* es prácticamente igual en los tratamientos control y de IQ en el día 8 de experimento, en vez de acentuarse cada vez más las diferencias entre estos tratamientos?. Una posible respuesta podría ser que debido a la baja concentración de alimento que hay después del día 6, muy por debajo de la concentración de alimento umbral de este clon de *K. cochlearis* (véase Figura 5.5.), los rotíferos estarían tan limitados por la cantidad de alimento que cualquier otro efecto negativo (IQ) apenas sería relevante. En consecuencia, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que una fuerte limitación por cantidad de alimento podría reducir la importancia que juega la IQ de *Daphnia* sobre esta especie de rotífero. Recientemente, WEBER (2001) ha señalado que el efecto combinado de la concentración de alimento y de la inducción de cambios de historia de vida en *Daphnia* por sustancias químicas producidas por sus depredadores (*Chaoborus* y peces) es complejo. En dicho estudio, WEBER (2001) mostró que a bajos niveles de alimento las respuestas de distintos parámetros de historia de vida de *Daphnia* a las sustancias exudadas por sus depredadores se ven aumentadas. Sin embargo, este tipo de estudios no se han realizado aún en rotíferos, siendo por tanto necesario profundizar más en la interacción entre cantidad de alimento e importancia de la IQ de cladóceros sobre rotíferos.

Los resultados obtenidos en este estudio también indican que la o las sustancias exudadas por *Daphnia* responsables de la IQ sobre *K. cochlearis* deberían tener un peso molecular inferior a 15 000-25 000 Da, ya que la respuesta de la población de *Keratella* fue similar en el medio preconicionado con *Daphnia* filtrado y retenido obtenidos con sistema de filtración tangencial. Este es el primer estudio que ha caracterizado el corte molecular de estas sustancias. Sería necesario realizar más estudios para poder identificar cual es realmente la naturaleza de esta o estas sustancias. En ciliados se ha mostrado que algunas sustancias químicas producidas por sus depredadores son proteínas. KUSCH & HECKMAN (1992) aislaron y caracterizaron una proteína con una masa de 31.5 KDa producida por el ciliado *Lembadion bullinum* que induce cambios

morfológicos en ciliados del género *Euplotes*. KUSCH (1993) también aisló otra proteína de 17.5 KDa producida por el turbelario *Stenostomum sphagnetorum* que afecta a la morfología de *Euplotes*. En cladóceros también se han identificado algunas señales químicas. Por ejemplo, TOLLRIAN & VON ELERT (1994) han caracterizado, empleando técnicas de HPLC y de ultrafiltración, que la sustancia producida por *Chaoborus* que induce ciclomorfosis en *Daphnia* es una molécula relativamente pequeña (<500 Da). VON ELERT & LOOSE (1996) también han caracterizado sustancias químicas exudadas por peces (<500 Da) responsables de inducir la migración vertical en dáfnidos usando técnicas similares.

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que aunque los cladóceros pueden interferir químicamente con los rotíferos a través de sustancias químicas exudadas en el agua (<15 000-25 000 Da), la importancia relativa de esta IQ respecto a la CE por los recursos alimenticios compartidos podría ser despreciable, al menos sobre la dinámica poblacional de esta población de *Keratella cochlearis*.



6

Impacto de la depredación por copépodos sobre la fecundidad de *Keratella cochlearis*

INTRODUCCIÓN

En numerosas ocasiones se ha mostrado que la depredación selectiva e intensa de copépodos ciclópidos y calanoides sobre rotíferos puede ejercer una gran influencia sobre la dinámica de las poblaciones naturales de estos organismos (BRANDL & FERNANDO, 1979; WILLIAMSON, 1984; STEMBERGER & EVANS, 1984; LAIR, 1990; PAUL & SCHINDLER, 1994; PLAßMANN *et ál.*, 1997; CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998; YOSHIDA *et ál.*, 2000; DIEGUEZ & GILBERT, 2002). La observación directa de las interacciones que pueden ocurrir entre estos depredadores invertebrados y sus especies presa puede dar una información muy valiosa acerca de la vulnerabilidad que pueden tener distintas especies a ser depredadas y, por tanto, de la influencia que podría ejercer un depredador sobre la dinámica de las poblaciones de sus presas.

Algunos estudios han mostrado que la depredación selectiva por un rotífero depredador (*Asplanchna*) sobre hembras ovígeras de *Keratella cochlearis* puede reducir la fecundidad de esta especie de rotífero (CONDE-PORCUNA & SARMA, 1995; CONDE-PORCUNA & DECLERCK, 1998). Sin embargo, aunque numerosos estudios experimentales han analizado el comportamiento de alimentación de algunas especies de copépodos calanoides (WILLIAMSON & BUTLER, 1986; WILLIAMSON, 1987) y ciclópidos (JUDITH & HIRAM, 1979; WILLIAMSON & GILBERT, 1980; ROCHE, 1990a; LAPESA *et ál.*, 2002) sobre distintas especies de rotíferos, los estudios que han considerado el impacto que estos depredadores

invertebrados pueden ejercer sobre la fecundidad y, en consecuencia, sobre las tasas de natalidad de rotíferos son muy escasos (ROCHE, 1990b; LEBLANC *et ál.*, 1997). LEBLANC *et ál.* (1997) sugirieron que el copépodo *Diacyclops thomasi* ingiere huevos de *Keratella cochlearis* en el Lago Ontario sin llegar a consumir las propias hembras que transportan estos huevos. Por otro lado, WILLIAMSON & BUTLER (1986) también observaron resultados similares para el calanoide *Diatomus pallidus*. Sin embargo, las consecuencias de este comportamiento de depredación por copépodos ciclópodos y calanoides sobre la fecundidad de rotíferos no se han analizado aún en detalle, y además sería importante analizar si existen diferencias en estos aspectos para diferentes especies de copépodos.

Los objetivos que se plantearon en este capítulo fueron dos: primero, observar directamente el comportamiento de alimentación de los copépodos *Lovenula alluaudi* (Calanoida) y *Acanthocyclops vernalis* (Cyclopoida), aislados del embalse de Iznájar, sobre hembras ovígeras de *Keratella cochlearis*; y, segundo, evaluar mediante un experimento de laboratorio si estas dos especies de copépodos pueden reducir la fecundidad de *Keratella*.

MATERIAL Y MÉTODOS

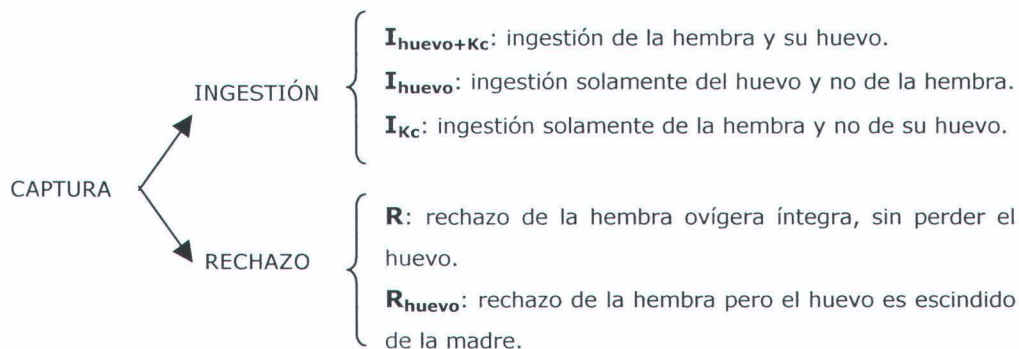
Los individuos de *Keratella cochlearis* usados en estos experimentos, y el alimento algal empleado (*Cryptomonas* sp.) procedían de los cultivos mantenidos en el laboratorio en las condiciones previamente señaladas en el capítulo 3 de esta Tesis. Para realizar este estudio se aislaron de forma adicional del embalse de Iznájar, un mes antes de empezar los experimentos, hembras y machos adultos de *Lovenula alluaudi* (1.2-1.7 mm) y hembras adultas de *Acanthocyclops vernalis* (1-1.2 mm). No se pudieron aislar machos de *A. vernalis* debido a su escasez en el embalse. Los cultivos de copépodos se mantuvieron en frascos de vidrio con 500 ml de agua mineral en una cámara de cultivo en las mismas condiciones de temperatura y luz que los cultivos *stock* de *K. cochlearis* ($20 \pm 0.05^\circ\text{C}$; $\sim 20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 14:10 h luz:oscuridad). Los copépodos se alimentaron con una dieta mixta de *Cryptomonas* sp. ($\sim 0.2 \text{ mg C L}^{-1}$) y *K. cochlearis* (~ 100 ind) cada 1-2 días.

Observaciones directas

Se inocularon individualmente 20 hembras partenogenéticas de *Keratella cochlearis* con un solo huevo, en estado de formación muy avanzado, en pocillos de placas de poliestireno estériles (placas IWAKI de 24 pocillos) conteniendo 2 ml de agua mineral con *Cryptomonas* (300 cel ml^{-1}). A continuación se añadió suavemente un solo depredador adulto haciendo uso de una pipeta de plástico de boca ancha. Los copépodos antes de empezar las observaciones se mantuvieron individualmente en condiciones de ayuno durante 7-10 horas en pocillos con 5 ml de agua mineral (placas IWAKI de 12 pocillos). Se hicieron 22 observaciones con el calanoide *L. alluaudi* (11 hembras y 11 machos) y otras 10 observaciones con el ciclópido *A. vernalis* (10 hembras). El comportamiento de alimentación de cada copépodo se observó durante 15 minutos usando una lupa estereoscópica.

La elección del volumen utilizado en estas observaciones (2 ml) fue fruto de una solución intermedia para permitir, por un lado, examinar todo el pocillo sin necesidad de desplazar la placa durante las observaciones y, por otro lado, que los copépodos nadaran sin dificultad. Estudios previos que han realizado también observaciones directas del comportamiento de alimentación de copépodos sobre diferentes tipos de especies presa (rotíferos, cladóceros, copepoditos y nauplios) han utilizado volúmenes similares (p. ej. JAMIESON, 1980; WILLIAMSON, 1987), e incluso menores, concretamente 1 ml (WILLIAMSON & GILBERT, 1980; ROCHE, 1990b) y 0.5 ml (CIROS-PÉREZ, 2001).

Durante las observaciones se anotaba cada captura, ingestión y rechazo de las presas. Se distinguieron tres tipos diferentes de ingestiones y otros dos tipos de rechazos después de que una hembra ovígera de *Keratella* fuera capturada por los copépodos:



Se observó la viabilidad de los huevos de *Keratella* que habían sido escindidos de sus madres cuando las hembras de *Keratella* eran rechazadas por los copépodos y cuando estos sólo ingerían las hembras. Estos huevos se incubaron individualmente en pocillos con 2 ml de agua mineral con *Cryptomonas* (300 cel ml⁻¹), y se observó si eclosionaban en las siguientes 24 o 48 horas. Se consideró un tiempo máximo de 48 h porque en estas condiciones experimentales, la eclosión de huevos de individuos de *Keratella* saludables tiene lugar en menos de 24 horas (observación personal).

Efecto de la depredación por copépodos sobre la fecundidad de *K. cochlearis*

Con el objetivo de evaluar el efecto de la depredación por *Lovenula alluaudi* y *Acanthocyclops vernalis* sobre la fecundidad de *K. cochlearis* en las mismas condiciones experimentales en las que se realizaron las observaciones directas, se inocularon 20 hembras del rotífero (10 hembras adultas con un solo huevo, también en estado de formación avanzado, más 10 hembras sin huevo de distinta edad cogidas al azar del cultivo *stock*) en pocillos con 2 ml de agua mineral con *Cryptomonas* (300 cel ml⁻¹). Posteriormente, en cada pocillo experimental se añadió un solo depredador adulto. Antes de empezar los experimentos, los copépodos se mantuvieron también individualmente en condiciones de ayuno en pocillos con 5 ml de agua mineral durante 7-10 h. Se hicieron 46 réplicas con el calanoide *L. alluaudi* (20 machos y 26 hembras) y otras 20 réplicas con el ciclópido *A. vernalis* (20 hembras). Las placas se incubaron a 20°C durante 30 minutos en oscuridad en una cámara de cultivo (memmert ICP 400-800).

Después del periodo de incubación, para calcular la fecundidad, se contaron las hembras de *Keratella* con huevo y sin huevo que sobrevivieron a la depredación de los copépodos, así como los posibles huevos sueltos. La fecundidad se estimó como la razón entre el número total de huevos dividido entre el número total de hembras de *Keratella*. La fecundidad inicial de *Keratella* fue de 0.5. En observaciones preliminares se observó que en un periodo de 30 minutos de incubación podían eclosionar algunos huevos, de forma que la proporción de hembras con huevo del total de hembras podía reducirse en los tratamientos por el nacimiento de nuevos individuos y no por depredación de los

copépodos. Por este motivo se hicieron 20 réplicas de un tratamiento control sin depredadores.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA (StatSoft). Se utilizaron análisis no paramétricos en lugar de análisis paramétricos debido a que algunas variables no se ajustaron a una distribución normal, y tampoco se observó una homogeneidad de varianzas. La normalidad de las variables se analizó mediante análisis de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante pruebas de Bartlett (SOKAL & ROHLF, 1995).

Para evaluar si el comportamiento de alimentación de machos y hembras de *Lovenula* sobre hembras ovígeras de *K. cochlearis* era diferente, se realizaron pruebas *U* de Mann-Whitney. Por otro lado, para comparar diferentes comportamientos observados para cada especie de copépodo después de capturar a una hembra ovígera del rotífero, se utilizaron análisis pareados de Wilcoxon. Y por último, para evaluar si los copépodos depredadores reducían la fecundidad de *Keratella* respecto al tratamiento control se realizaron pruebas *U* de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Comportamiento de alimentación de L. alluaudi y A. vernalis sobre hembras ovígeras de K. cochlearis

En la tabla 6.1. se indican las interacciones observadas entre los copépodos y hembras ovígeras de *K. cochlearis*. Análisis *U* de Mann-Whitney no mostraron diferencias significativas entre machos y hembras de *Lovenula*, ni en cuanto al número medio de capturas, ni en cuanto a los diferentes tipos de interacción depredador-presa observados después de una captura. No obstante, en las observaciones con hembras de *Lovenula* hubo ocasiones en que ante el rechazo de una hembra ovígera de *Keratella*, ésta perdía su huevo hundiéndose en el

pocillo experimental (R_{huevo}), comportamiento que no se llegó a observar para los machos de *Lovenula*.

Tabla 6.1. Comportamiento de alimentación de machos y hembras de *Lovenula alluaudi* y de hembras de *Acanthocyclops vernalis* sobre hembras ovígeras de *K. cochlearis* durante 15 minutos de observación directa. Los valores son medias \pm error estándar. El comportamiento de machos y hembras de *Lovenula* es comparado mediante pruebas U de Mann-Withney.

	<i>L. alluaudi</i>		U	p	<i>A. vernalis</i> Hembras (n=10)
	Machos (n=11)	Hembras (n=11)			
Captura	5.82 \pm 1.66	5.36 \pm 0.69	51.5	0.56	3.70 \pm 1.07
I_{huevo+Kc}	0.27 \pm 0.14	1.27 \pm 0.41	32.5	0.07	0.90 \pm 0.28
I_{huevo}	1.00 \pm 0.30	1.18 \pm 0.33	55.0	0.72	0.90 \pm 0.41
I_{Kc}	0	0	-	-	0.20 \pm 0.13
R	4.55 \pm 1.70	2.36 \pm 0.51	49.0	0.45	1.50 \pm 1.08
R_{huevo}	0	0.55 \pm 0.16	-	-	0.20 \pm 0.13

I_{huevo+Kc} = ingestión de la hembra de *Keratella* y su huevo; **I_{huevo}** = ingestión solamente del huevo y no de la hembra; **I_{Kc}** = ingestión solamente de la hembra y no de su huevo; **R** = rechazo de la hembra ovígera íntegra, sin perder el huevo; **R_{huevo}**: rechazo de la hembra ovígera perdiendo el huevo.

Las dos especies de copépodos ingerían tanto los huevos como las hembras ovígeras completas de *Keratella* (la hembra y el huevo). Sin embargo, en las observaciones con el copépodo calanoide se observó una pérdida mayor de huevos de *Keratella* por ingestión solamente del huevo y por rechazo de la hembra ovígera ($I_{\text{huevo}} + R_{\text{huevo}}$) que de hembras ovígeras ($I_{\text{huevo+Kc}}$) (Figura 6.1a.). En cambio, en las observaciones con el copépodo ciclópido no se observaron diferencias significativas entre estos comportamientos (Figura 6.1b.). Pruebas U de Mann-Withney no mostraron tampoco diferencias significativas entre machos y hembras de *Lovenula* ni en el número total de huevos eliminados ($U=38.50$; $p=0.15$) ni en el número de ingestiones de hembras ovígeras completas (Tabla 6.1.).

La probabilidad de que no eclosionaran los huevos escindidos de sus madres, que no llegaron a ser ingeridos por los copépodos, fue 0.67 (4/6) en las

observaciones con *Lovenula* y 0.25 (1/4) en las observaciones con *Acanthocyclops*. En condiciones saludables del cultivo *stock* de *Keratella*, de donde provenían las hembras ovígeras utilizadas en estos experimentos, la probabilidad de que los huevos unidos a sus madres eclosionaran después de 24 horas era 0.99 (n=336) (observación personal).

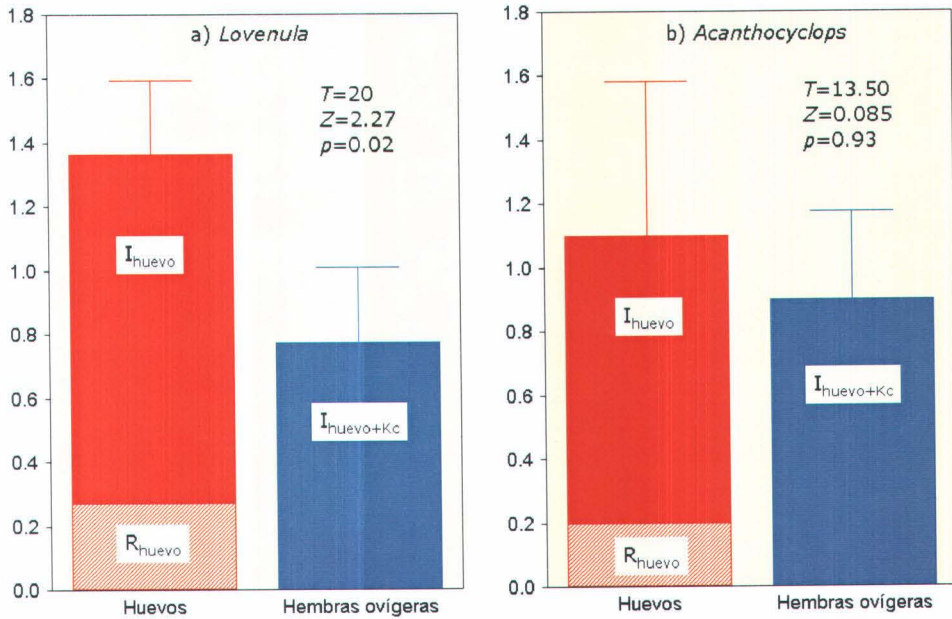


Figura 6.1. Análisis pareados de Wilcoxon comparando el número de huevos ingeridos y escindidos de hembras ovígeras de *K. cochlearis* ($I_{\text{huevo}} + R_{\text{huevo}}$) y el número de ingestiones de hembras ovígeras íntegras ($I_{\text{huevo+Kc}}$) durante las observaciones directas del comportamiento de alimentación de (a) machos y hembras de *Lovenula alluadi* (n=22) y (b) hembras de *Acanthocyclops vernalis* (n=10). Los valores son medias \pm error estándar.

Efecto de la depredación por *L. alluadi* y *A. vernalis* sobre la fecundidad de *K. cochlearis*

La fecundidad de *K. cochlearis* fue significativamente reducida por la depredación de *Lovenula* ($U=257.5$; $p<0.01$), mientras que *Acanthocyclops* no mostró tal efecto (Figura 6.2.). Los efectos de la depredación sobre la fecundidad de *Keratella* eran similares entre machos y hembras de *Lovenula* ($U=209.5$; $p=0.26$).

Tabla 6.2. Huevos de *K. cochlearis* escindidos, hembras de *K. cochlearis* ovígeras ($K_{C_{huevo}}$) y no ovígeras (K_c) después del periodo de incubación en el control (sin depredador) y en los tratamientos con copépodos depredadores. Estos valores se compararon estadísticamente con respecto al control mediante pruebas U de Mann-Whitney.

	Control (n=20)	<i>L. alluaudi</i> (n=46)			<i>A. vernalis</i> (n=20)		
	Media \pm EE	Media \pm EE	U	p	Media \pm EE	U	p
Huevos escindidos	0	0.02 \pm 0.02			0		
$K_{C_{huevo}}$	9.65 \pm 0.11	7.11 \pm 0.23	55	<0.000001	8.90 \pm 0.31	122.5	<0.05
K_c	10.70 \pm 0.22	9.93 \pm 0.31	380.5	>0.05	9.70 \pm 0.37	118	<0.05

EE: error estándar de la media.

En la Tabla 6.2. se indica el número de hembras ovígeras y no ovígeras de *Keratella* que sobrevivieron a la depredación de los copépodos. *Lovenula* redujo significativamente el número de hembras ovígeras de *Keratella*, mientras que el número de hembras sin huevo era similar al control. Estos resultados sugieren que *Lovenula* se alimentó selectivamente sobre hembras ovígeras y/o sobre los huevos de *Keratella* sin llegar a ingerir las hembras que portan estos huevos. En cambio, *Acanthocyclops* redujo significativamente tanto el número de hembras ovígeras de *Keratella* como el número de hembras sin huevo, manteniéndose constante respecto al control la proporción del número de huevos por hembra de *Keratella*.

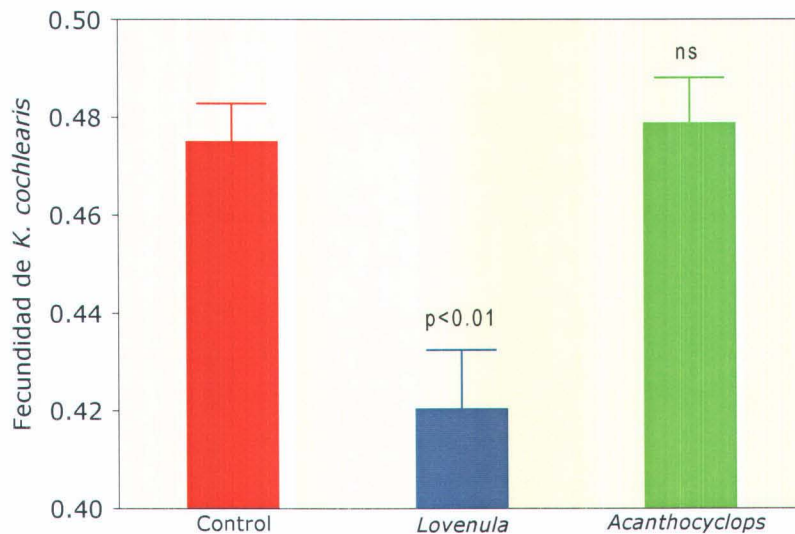


Figura 6.2. Fecundidad media (\pm error estándar) de *K. cochlearis* en el tratamiento control sin depredadores ($n=20$), y en los tratamientos con machos y hembras de *Lovenula alluaudi* ($n=46$) y con hembras de *Acanthocyclops vernalis* ($n=20$). La medias se compararon estadísticamente mediante pruebas *U* de Mann-Whitney.

DISCUSIÓN

El comportamiento de alimentación de *Lovenula* y *Acanthocyclops* fue diferente. El copépodo calanoide se mantenía continuamente en suspensión filtrando *Cryptomonas* de manera que, generalmente, no atacaba a las presas sino que las capturaba de forma pasiva al quedar atrapadas en las corrientes de alimentación originadas por el copépodo. Este mismo comportamiento también se

ha observado en el calanoide *Diaptomus pallidus* cuando depreda sobre rotíferos, y ha sido definido como "captura pasiva" (WILLIAMSON, 1987). Cuando *Lovenula* capturaba una hembra ovígera de *Keratella*, ésta era generalmente capturada por el huevo. Sin embargo, *Acanthocyclops* permanecía más tiempo en reposo en el fondo del pocillo que nadando y atacaba a *Keratella* dando un salto enérgico sobre ella. Este comportamiento ha sido también observado en otras especies de copépodos ciclópidos (*Cyclops bicuspidatus* y *Mesocyclops edax*) cuando depredan sobre rotíferos (WILLIAMSON & GILBERT, 1980; WILLIAMSON, 1983; LAPESA et ál., 2002).

WILLIAMSON & BUTLER (1986) mostraron que aunque *K. cochlearis* no era ingerida por el calanoide *Diaptomus pallidus*, el copépodo sí ingería sus huevos. En el presente estudio se observó que *Lovenula* ingería tanto los huevos como las hembras ovígeras de *Keratella*. El diferente comportamiento entre *Diaptomus pallidus* y *Lovenula alluaudi* podría ser debido al diferente tamaño del cuerpo de ambas especies. Los individuos adultos de *Diaptomus pallidus* utilizados en el estudio de WILLIAMSON & BUTLER (1986) tenían una longitud de 1-1.2 mm. En cambio, los individuos de *Lovenula* usados en el presente estudio tenían longitudes de 1.2-1.7 mm, de forma que este calanoide podría ingerir presas mayores. Recientemente, GREEN (2001) ha descrito que *Lovenula falcifera*, un congénere de *Lovenula alluaudi*, es un gran depredador de rotíferos y ha observado en su interior, además de varias especies de rotíferos (*Keratella cochlearis*, *Trichocerca capucina*, *Cephalodella* sp.), presas más grandes (p. ej. el cladócer *Chydorus* sp. y otros copépodos). En dicho estudio el rotífero presa más registrado en el interior de los individuos de *Lovenula falcifera* analizados fue *Keratella cochlearis* (78% del total de presas registradas).

Por otro lado, LEBLANC et ál.(1997) también sugirieron que el copépodo ciclópido *Diacyclops thomasi* (1-1.4 mm) depredaba los huevos de *K. cochlearis* sin llegar a consumir a sus madres. Sin embargo, las observaciones directas realizadas en el presente estudio han mostrado que *A. vernalis* depredaba tanto los huevos de *Keratella* como las hembras ovígeras completas de esta especie de rotífero, sin mostrar un comportamiento de depredación selectiva sobre sus huevos. Este diferente comportamiento entre estas especies de ciclópidos podría deberse a que *A. vernalis* podría ser un depredador más voraz que *Diacyclops*. JUDITH & HIRAM (1979) observaron que *Acanthocyclops vernalis* consumía con

mucha frecuencia individuos enteros de *Asplanchna*, *Diaphanosoma* y *Diaptomus*. Estas presas son de mayor tamaño que *K. cochlearis*, y por tanto, *Acanthocyclops vernalis* podría no tener ninguna dificultad para ingerir los individuos con huevo de *Keratella*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, *Lovenula* reduce la fecundidad de *Keratella cochlearis* mientras que *Acanthocyclops* no tiene efecto. Sin embargo, estos resultados deberían interpretarse con ciertas consideraciones. *Lovenula* redujo la fecundidad de *Keratella* al reducir significativamente, respecto al tratamiento control, sólo el número de hembras ovígeras del rotífero manteniéndose similar el número de hembras sin huevo. Estos resultados sugieren, por tanto, que *Lovenula* depredó selectivamente hembras ovígeras y/o los huevos de estas hembras sin llegar a ingerir a sus madres (siempre y cuando algunas hembras sin huevo hubieran sido también ingeridas). En cambio, la fecundidad de *Keratella* no se vio reducida por la depredación de *Acanthocyclops* porque esta especie de copépodo depredó en la misma proporción hembras ovígeras y hembras sin huevo del rotífero, manteniéndose constante su fecundidad, y sugiriendo, por tanto, que las hembras con huevo y sin huevo de *Keratella* son igual de vulnerables a la depredación por *Acanthocyclops*. En consecuencia, *Acanthocyclops* podría ejercer también una gran influencia sobre las tasas de natalidad de *K. cochlearis* en situaciones naturales al producir una reducción del número de huevos totales de esta especie de rotífero.

Incluso aunque este estudio se ha realizado en condiciones bastante artificiales debido al pequeño volumen empleado, las observaciones directas del comportamiento de alimentación de estas dos especies de copépodos sobre hembras ovígeras de *Keratella* permiten hacer algunas conclusiones en relación con la influencia que estos depredadores invertebrados podrían ejercer sobre la fecundidad de una población natural de *K. cochlearis*. Ambas especies de copépodos ingieren tanto los huevos de *Keratella*, sin llegar a ingerir a sus madres, como las hembras ovígeras completas de *Keratella*, es decir, la hembra y su huevo. De este modo, tanto *Lovenula* como *Acanthocyclops* podrían ejercer una gran influencia sobre la fecundidad de una población de *Keratella* en un sistema natural. Además, se ha observado que las dos especies de copépodos pueden provocar una escisión de los huevos de *Keratella* cuando las presas son rechazadas. Este comportamiento podría también provocar una reducción

considerable del número de huevos viables en las poblaciones naturales de esta especie de rotífero, teniendo en cuenta que estos huevos que son escindidos de sus madres por los copépodos se hundirían hacia capas más profundas y frías de la columna de agua con posiblemente menor probabilidad de eclosionar que la observada en estos experimentos de laboratorio. Sin embargo, se observaron algunas diferencias entre las dos especies de copépodos en las interacciones depredador-presa. *Lovenula* originaba una pérdida significativamente mayor de huevos del rotífero, por ingestión sólo del huevo y por escisión de los huevos cuando la presa era rechazada, que de hembras ovígeras completas de *Keratella*, diferencias que no se observaron para *Acanthocyclops*. En consecuencia, podría esperarse que el copépodo calanoide ejerciera un efecto mucho más importante sobre la fecundidad de *Keratella* que el copépodo ciclópido.

En resumen, tanto *Lovenula alluaudi* como *Acanthocyclops vernalis* podrían ejercer una gran influencia sobre la fecundidad y la tasa de natalidad de *K. cochlearis* en un sistema natural al depredar tanto las hembras ovígeras como sólo los huevos de esta especie de rotífero. En consecuencia, la reproducción de *K. cochlearis* podría no estar sólo controlada por la disponibilidad de alimento en el medio, sino también por la depredación de estos depredadores invertebrados. Más estudios experimentales permitirían corroborar todas estas observaciones.

7

SÍNTESIS GENERAL

En este estudio se ha realizado un análisis integrado de campo y laboratorio con el fin de intentar cuantificar la importancia que las interacciones bióticas (**cantidad** y **calidad** del alimento algal disponible, **competencia** con grandes cladóceros y **depredación** por copépodos) tienen sobre la dinámica poblacional del rotífero más relevante en el embalse de Iznájar, *Keratella cochlearis*. Durante la primavera de 1997 se realizó una campaña de muestro intensiva en dicho embalse con una alta periodicidad de muestro (cada 3 días), acorde con los tiempos de generación característicos de los rotíferos. Paralelamente se realizaron experiencias de laboratorio con el fin de examinar hipótesis y dilucidar diferentes interacciones bióticas que pudieran existir en el medio natural. Todos los experimentos de laboratorio se realizaron con organismos del zooplancton aislados del embalse de Iznájar, y se alimentaron con una cepa de *Cryptomonas* sp. aislada también del mismo sistema.

Tradicionalmente la limitación por alimento es considerada como un factor *bottom-up* o ascendente que controla la densidad de una población a través de la reproducción, mientras que la depredación es percibida como un factor *top-down* o descendente que controla la densidad de una población exclusivamente a través de la mortalidad. Generalmente, los estudios que evalúan el impacto de la depredación sobre las poblaciones naturales de rotíferos no consideran los posibles efectos adicionales de una mortalidad por depredación diferencial sobre huevos y hembras ovígeras de estos animales planctónicos. En el embalse de Iznájar, un sistema meso-eutrófico, se ha observado que la reproducción del rotífero *Keratella cochlearis* podría estar controlada no sólo por la cantidad de alimento disponible en el medio, sino también por la depredación por parte de los

copépodos depredadores *Lovenula alluaudi* y *Acanthocyclops vernalis*, incluso cuando la concentración de biomasa algal comestible por el zooplancton alcanza valores relativamente altos (capítulo 2). La importancia de la depredación por estas especies de copépodos sobre los valores de fecundidad de *K. cochlearis* quedó corroborada en un estudio experimental (capítulo 6).

En las observaciones de campo se consideró que una concentración de 0.25 mg C L⁻¹ podría ser lo suficientemente elevada como para que la población de *K. cochlearis* no estuviese limitada por la cantidad de alimento disponible en el embalse (véase capítulo 2). Un estudio de laboratorio, en el que se analizó el efecto de la cantidad de alimento sobre el crecimiento de un clon de *K. cochlearis* aislado del embalse de Iznájar, alimentado con una cepa de *Cryptomonas* sp. aislada también del mismo sistema, mostró que, en efecto, estas concentraciones de alimento permiten al rotífero alcanzar elevadas tasas de crecimiento poblacional (capítulo 3). En consecuencia, las observaciones realizadas en el embalse de Iznájar, junto con los resultados obtenidos en las experiencias de laboratorio sugieren que, en sistemas con cierto grado de eutrofia y elevada disponibilidad de alimento algal, la reproducción de los rotíferos podría estar controlada por la depredación por copépodos. CONDE-PORCUNA & DECLERCK (1998) mostraron también que, en un sistema hipertrófico, la abundancia de *K. cochlearis* estaba regulada por el rotífero depredador *Asplanchna* como consecuencia de la depredación selectiva sobre hembras ovígeras de esta especie de rotífero.

Las concentraciones extremadamente bajas de SRP, junto con las elevadas razones de NT:PT registradas en la superficie del embalse de Iznájar durante la primavera de 1997, sugieren que la comunidad fitoplanctónica podría haberse encontrado en condiciones limitantes de fósforo y, en consecuencia, la posible peor calidad del alimento algal podría haber condicionado la dinámica poblacional de los rotíferos en el sistema durante este periodo. Desgraciadamente, en este estudio no se disponen de datos suficientes de disponibilidad de nutrientes que permitan evaluar su posible influencia sobre la dinámica poblacional de los rotíferos en este sistema. En cualquier caso las concentraciones de alimento algal en el embalse de Iznájar fueron muy elevadas, y en el capítulo 4 se pone de manifiesto que la limitación por nutrientes es mayor a bajas concentraciones de alimento, utilizando *Cryptomonas* sp. como recurso algal.

Además, recientemente BOERSMA & KREUTZER (2002) también han observado que los efectos de la diferente calidad nutricional de algas verdes (*Scenedesmus*) sobre el crecimiento de *Daphnia* son notables a bajas concentraciones de alimento. Todos estos resultados vienen a contradecir estudios previos que indican que la calidad nutricional del alimento para el zooplancton sólo es relevante a altas concentraciones de alimento (STERNER & ROBINSON, 1994; ROTHHAUPT, 1995). En consecuencia, son necesarios más estudios para clarificar esta controversia.

La respuesta tan peculiar de *Cryptomonas* sp. en condiciones limitantes de fósforo pone de manifiesto que diferentes especies algales pueden responder de forma muy distinta a la disponibilidad de nutrientes en el medio, de manera que la composición taxonómica del fitoplancton en los sistemas naturales puede ser un factor muy importante cuando se estudia la limitación de nutrientes sobre las poblaciones del zooplancton. En este sentido, BRETT *et ál.* (2000) han mostrado que la diferencia en la calidad del alimento media entre una comunidad algal dominada por diatomeas y/o criptofíceas frente a una comunidad dominada por cianobacterias es mayor que el descenso observado en la calidad del alimento algal a lo largo del rango completo de variabilidad en la razón C:P del seston. En la actualidad, aún no se han realizado estudios que analicen el crecimiento y/o abundancia de rotíferos en función de las razones C:P del seston. CONDEPORCUNA *et ál.* (2002) observaron en un ambiente natural que la fecundidad de varias especies de rotíferos podría estar afectada por la limitación de P (estimada a partir de razones de nitrógeno inorgánico disuelto: fósforo reactivo soluble del medio). En ese estudio, la comunidad algal comestible por el zooplancton estaba dominada por diatomeas, pero la filiación taxonómica parecía ser menos importante que la limitación de fósforo sobre la abundancia de rotíferos, aunque no hay datos de las razones C:P del seston. Es importante destacar, sin embargo, que cuantificar la disponibilidad real de fósforo para las algas en sistemas acuáticos naturales puede resultar bastante complicado. SELIG *et ál.* (2002) sugieren que la concentración de fósforo reactivo soluble (SRP) y la composición elemental del seston pueden no ser un buen reflejo de las condiciones limitantes de P que existen en ciertos sistemas acuáticos, debido, por un lado, a que la determinación analítica de SRP sobreestima el contenido de ortofosfato realmente disponible para las algas y, por otro lado, a la interferencia que pueden producir los sólidos inorgánicos en suspensión en las medidas sestónicas.

Las comunidades de fitoplancton de lagos templados meso- a hipereutróficos, en general, experimentan una sucesión estacional caracterizada por el dominio de criptofíceas y diatomeas en primavera, una mayor abundancia de clorofíceas al principio del verano, y un dominio de cianofíceas al final del verano, que es a menudo sucedido por un desarrollo masivo de diatomeas en otoño (WETZEL, 1983; SOMMER *et ál.*, 1986; LAMPERT & SOMMER, 1997). La diferente calidad de los distintos taxones algales sugiere que el zooplancton estará limitado por la calidad del alimento de las comunidades fitoplanctónicas cuando estas comunidades no estén sumamente dominadas por diatomeas o criptofíceas, u otros grupos algales de alta calidad nutricional (BRETT *et ál.*, 2000). De acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo 4, concentraciones bajas de N o P en el medio aumentan la calidad de *Cryptomonas* como recurso alimenticio para *Keratella*, aumentando las tasas de crecimiento del rotífero y su resistencia al ayuno. De este modo, el crecimiento de las poblaciones del zooplancton dependerá no sólo del tamaño algal como principal causa de que una determinada especie sea comestible, sino que también dependerá de las características taxonómicas de las especies algales y de sus necesidades específicas de nutrientes.

En el embalse de Iznájar, bajo las condiciones de elevada concentración de alimento observadas, no se evidenció competencia explotativa ni competencia por interferencia con individuos de *Daphnia* de gran tamaño (≥ 1.2 mm) sobre la población de *K. cochlearis*. Este hecho probablemente fue debido a la baja densidad de grandes cladóceros registrada durante el periodo de estudio (densidad máxima de *Daphnia* ≥ 1.2 mm igual a 12.04 ind L^{-1}), y a la baja concentración de alimento umbral de *K. cochlearis* estimada en el laboratorio ($0.018 \text{ mg C L}^{-1}$; capítulo 3). Un análisis experimental, utilizando densidades de *Daphnia* mucho más elevadas que las registradas en el embalse, mostró que el impacto de la competencia por interferencia (IM e IQ) sobre *K. cochlearis* fue mínimo (capítulo 5). Este análisis corrobora la falta de interacción negativa entre *Daphnia* y *Keratella* en el embalse de Iznájar.

En consecuencia, en el embalse de Iznájar, la depredación por copépodos puede ser importante en el control de las poblaciones de rotíferos, mientras que la competencia por *Daphnia* sería despreciable. Resultaría interesante profundizar más en estos aspectos observando el comportamiento de alimentación de otras

especies de copépodos sobre diferentes especies presa de rotíferos bajo diferentes condiciones ambientales, especialmente el comportamiento de copépodos calanoides por ser considerados tradicionalmente organismos herbívoros.

En virtud de todo lo dicho, un aspecto a destacar es que el impacto de la depredación por copépodos sobre la fecundidad y dinámica poblacional de rotíferos podría cambiar en función de cambios en la calidad nutricional del alimento algal. Son, pues, necesarios futuros estudios que analicen la respuesta de un mayor número de grupos algales a la limitación de nutrientes, bajo diferentes condiciones ambientales, y su repercusión no sólo sobre las poblaciones de rotíferos en particular, sino sobre la comunidad zooplanctónica en general. La importancia relativa de la depredación sobre distintas especies zooplanctónicas podría verse afectada por la limitación de nutrientes del mismo modo que lo es la competencia entre *Daphnia* y rotíferos (CONDE-PORCUNA, 2000). Además, estudios en sistemas naturales que analicen estos aspectos deben incluir sistemas oligotróficos donde la disponibilidad de alimento algal para el zooplancton es menor y, en consecuencia, la importancia de cambios en la calidad nutricional del alimento puede ser relevante.



CONCLUSIONES

1. La depredación por copépodos puede reducir la fecundidad de *Keratella cochlearis* en sistemas naturales y condicionar su distribución espacial. En consecuencia, la reproducción de los rotíferos en los sistemas acuáticos podría estar regulada no sólo por la cantidad de alimento disponible en el medio sino también por la depredación selectiva por parte de estos depredadores invertebrados sobre hembras ovígeras y/o sobre los huevos de estos organismos planctónicos.
2. El efecto de la cantidad de alimento sobre la tasa de crecimiento poblacional de *Keratella cochlearis* es descrito adecuadamente por el modelo modificado de Monod. La respuesta numérica observada de *K. cochlearis* alimentada con *Cryptomonas* sp. indica que esta especie algal, utilizada en todas las experiencias de laboratorio que aborda esta Tesis, es de alta calidad nutricional para el rotífero, obteniéndose una concentración de alimento umbral inferior, y una tasa máxima de crecimiento poblacional superior, a las observadas en estudios experimentales previos para esta especie de rotífero.
3. Las células de *Cryptomonas* sp. cultivadas en medios limitados en nitrógeno y fósforo no reflejaron en su composición elemental la limitación por estos nutrientes en los medios de cultivo, mostrando concentraciones de fósforo superiores a las observadas en aquellas células que crecieron sin limitación de nutrientes. Los resultados obtenidos sugieren que esta criptofíceo podría haber optado por una estrategia de almacenamiento de fósforo ("consumo de lujo") y/o de nutrición fagotrófica de sustancias orgánicas presentes en el medio como estrategias para adquirir nutrientes en condiciones limitantes.
4. El alga *Cryptomonas* sp. cultivada en condiciones de limitación de nutrientes, y especialmente bajo limitación de fósforo, es de mejor calidad nutricional para el crecimiento de organismos zooplanctónicos, en particular de *Keratella cochlearis*.

5. La resistencia al ayuno de *Keratella cochlearis* (i.e. nº de días que los animales sobreviven en condiciones de ayuno) aumenta cuando el rotífero se alimenta con células de *Cryptomonas* cultivadas en un medio limitado en nitrógeno. En consecuencia, cambios en la calidad del alimento algal afectarán no sólo al crecimiento poblacional del zooplancton sino también a su resistencia al ayuno.

6. La importancia relativa de la competencia por interferencia (interferencia química e interferencia mecánica) entre cladóceros y rotíferos, respecto a la competencia explotativa por los recursos alimenticios compartidos, podría ser despreciable bajo las condiciones estudiadas. Las sustancias químicas exudadas por estos cladóceros que pueden inhibir el crecimiento de los rotíferos tendrían un peso molecular inferior a 15 000-25 000 daltons.

7. El copépodo calanoide *Lovenula alluaudi* reduce la fecundidad de *Keratella cochlearis* fundamentalmente por depredación selectiva sobre los huevos de esta especie de rotífero. El copépodo ciclópido *Acanthocyclops vernalis* depreda indistintamente los huevos de *Keratella* y las hembras ovígeras íntegras (i.e. la hembra y su huevo) de esta especie de rotífero, sin mostrar un comportamiento de depredación selectiva sobre los huevos del rotífero.

REFERENCIAS

- ADRIAN, R. & T.M. FROST. 1992. Comparative feeding ecology of *Tropocyclops prasinus mexicanus* (Copepoda, Cyclopoida). *J. Plankton Res.* **14**: 1369-1382.
- AHLGREN, G., I. GUSTAFSSON & M. BOBERG. 1992. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *J. Phycol.* **28**: 37-50.
- AHLGREN, G., L. LUNDSTEDT, M. BRETT & C. FORSBERG. 1990. Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *J. Plankton Res.* **12**: 809-818.
- ALONSO, M. 1996. Crustacea, Branchiopoda. En: M.A. RAMOS *et ál.* [eds.], *Fauna Ibérica*, Vol. 7. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid. 486 pp.
- ANDERSON, R.S. 1980. Relationship between trout and invertebrate species as predators and the structure of the crustacean and rotiferan plankton in mountain lakes, pp. 635-641. En: W.C. KERFOOT [ed.], *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. University of New England Press, Hanover.
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 18ª ed. APHA, New York.
- ARMENGOL, X., A. ESPARCIA & M.R. MIRACLE. 1998. Rotifer vertical distribution in a strongly stratified lake: a multivariate analysis. *Hydrobiologia* **387/388**: 161-170.
- ARMENGOL, X. & M.R. MIRACLE. 2000. Diel vertical movements of zooplankton in lake La Cruz (Cuenca, España). *J. Plankton Res.* **22**: 1683-1703.
- ARNOTT, S.E. & M.J. VANNI. 1993. Zooplankton assemblages in fishless bog lakes: Influence of biotic and abiotic factors. *Ecology* **74**: 2361-2380.
- AYRES, M.P., R.T. WILKENS, J.J. RUEL, M.J. LOMBARDEO & E. VALLERY. 2000. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology* **81**: 2198-2210.
- BEACH, D.H., G.W. HARRINGTON & G.G. HOLZ JR. 1970. The polyunsaturated fatty acids of marine and freshwater cryptomonads. *J. Protozool.* **17**: 501-510.
- BEAUCHAMP, P. DE. 1952. Un facteur de la variabilité chez les rotifères du genre *Brachionus*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* **234**: 573-575.
- BEGG, G.W. 1976. The relationship between the diurnal movements of some of the zooplankton and the sardine *Limnothrissa miodon* in Lake Kariba, Rhodesia. *Limnol. Oceanogr.* **21**: 529-539.

- BERNER-FANKHAUSER, H. 1987. The influence of sampling strategy on the apparent population dynamics of planktonic rotifers. *Hydrobiologia* **147**: 181-188.
- BOERSMA, M. 2000. The nutritional quality of P-limited algae for *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1157-1161.
- BOERSMA, M. & C. KREUTZER. 2002. Life at the edge: Is food quality really of minor importance at low quantities?. *Ecology* **83**: 2552-2561.
- BOERSMA, M. & C.P. STELZER. 2000. Response of a zooplankton community to the addition of unsaturated fatty acids: an enclosure study. *Freshwater Biol.* **45**: 179-188.
- BOGDAN, K.G. & J.J. GILBERT. 1982. Seasonal patterns of feeding by natural populations of *Keratella*, *Polyarthra*, and *Bosmina*: clearance rates, selectivities, and contributions to community grazing. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 918-034.
- BOGDAN, K.G. & J.J. GILBERT. 1984. Body size and food size in freshwater zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 6427-6431.
- BOGDAN, K.G. & J.J. GILBERT. 1987. Quantitative comparison of food niches in some freshwater zooplankton: A multi-tracer-cell approach. *Oecologia* **72**: 331-340.
- BOTTRELL, H.H., A. DUNCAN, Z.M. GLIWICZ, E. GRYGIEREK, A. HERZIG, A. HILLBRICHT-ILKOWSKA, H. KURASAWA, P. LARSSON & T. WEGLENSKA. 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.* **24**: 419-456.
- BRANDL, Z. & C.H. FERNANDO. 1979. The impact of predation by the copepod *Mesocyclops edax* (Forbes) on zooplankton in three lakes in Ontario, Canada. *Can. J. Zool.* **57**: 940-942.
- BRETT, M.T., D.C. MÜLLER-NAVARRA & S. PARK. 2000. Empirical analysis of the effect of phosphorus limitation on algal food quality for freshwater zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1564-1575.
- BROOKS, J.L. & S.I. DODSON. 1965. Predation, body size and composition of the plankton. *Science* **150**: 28-35.
- BURNS, C.W. 1968. The relationship between body size of filter-feeding Cladocera and the maximum size of particles ingested. *Limnol. Oceanogr.* **13**: 675-678.
- BURNS, C.W. & J.J. GILBERT. 1986a. Direct observation of the mechanism of interference between *Daphnia* and *Keratella cochlearis*. *Limnol. Oceanogr.* **31**: 859-866.

- BURNS, C.W. & J.J. GILBERT. 1986b. Effects of daphnid size and density on interference between *Daphnia* and *Keratella cochlearis*. *Limnol. Oceanogr.* **31**: 848-858.
- BURTON, J.D. 1973. Problems in the analysis of phosphorus compounds. *Wat. Res.* **7**: 291-307.
- CALOW, P. & A.S. WOLLHEAD. 1977. The relationship between ration, reproductive effort and age-specific mortality in the evolution of life history strategies—some observations on freshwater triclads. *J. Anim. Ecol.* **46**: 765–781.
- CARMONA, M.J., M. SERRA & M.R. MIRACLE. 1993. Relationship between mixis in *Brachionus plicatilis* and preconditioning of culture medium by crowding. *Hydrobiologia* **255/256**: 145-152.
- CIROS-PÉREZ, J. 2001. Exclusión y coexistencia entre especies gemelas de rotíferos: mecanismos subyacentes. *Tesis doctoral*. Universidad de Valencia.
- CIROS-PÉREZ, J., M.J. CARMONA & M. SERRA. 2001. Resource competition between sympatric sibling rotifer species. *Limnol. Oceanogr.* **46**: 1511-1523.
- CONDE-PORCUNA, J.M. 1998. Chemical interference by *Daphnia* on *Keratella*: a life table experiment. *J. Plankton Res.* **20**: 1637.1644.
- CONDE-PORCUNA, J.M. 2000. Relative importance of competition with *Daphnia* (Cladocera) and nutrient limitation on *Anuraeopsis* (Rotifera) population dynamics in a laboratory study. *Freshwater Biol.* **44**: 423–430.
- CONDE-PORCUNA, J.M. & S. DECLERCK. 1998. Regulation of rotifer species by invertebrate predators in a hypertrophic lake: selective predation on egg-bearing females and induction of morphological defences. *J. Plankton Res.* **20**: 605-618.
- CONDE-PORCUNA, J.M., R. MORALES-BAQUERO & L. CRUZ-PIZARRO. 1994. Effects of *Daphnia longispina* on rotifer populations in a natural environment: relative importance of food limitation and interference competition. *J. Plankton Res.* **16**: 691-706.
- CONDE-PORCUNA, J.M., E. RAMOS-RODRÍGUEZ & C. PÉREZ-MARTÍNEZ. 2002. Correlations between nutrient limitation and zooplankton populations in a mesotrophic reservoir. *Freshwater Biol.* **47**: 1463–1473.
- CONDE-PORCUNA, J.M. & S.S.S. SARMA. 1995. Prey selection by *Asplanchna girodi* (Rotifera): the importance of prey defence mechanisms. *Freshwater Biol.* **33**: 341-348.
- CORDOVA, S.E., J. GIFFIN & K.L. KIRK. 2001. Food limitation of planktonic rotifers: field experiments in two mountain ponds. *Freshwater Biol.* **46**: 1519-1527.

- CROWDER, L.B., R.W. DRENNER, W.C. KERFOOT, D.J. MCQUEEN, E.L. MILLS, U. SOMMER, C.N. SPENCER & M.J. VANNI. 1988. Food web interactions in lakes, pp. 141-160. En: S.R. CARPENTER [ed.], *Complex interactions in lake communities*. Springer-Verlag, New York.
- CRUZ-PIZARRO, L. 1978. Comparative vertical zonation and diurnal migration among Crustacea and Rotifera in the small high mountain lake La Caldera (Granada, Spain). *Verh. Int. Ver. Limnol.* **20**: 1026-1032.
- DE MEESTER, L. 1993. Genotype, fish-mediated chemicals, and phototactic behavior in *Daphnia magna*. *Ecology* **74**: 1467-1474.
- DEMOTT, W.R. 1989. The role of competition in zooplankton succession, pp. 195-252. En: U. SOMMER [ed.], *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*. Springer-Verlag, New York.
- DEMOTT, W.R. 1995. The influence of prey hardness on *Daphnia*'s selectivity for large prey. *Hydrobiologia* **307**: 127-138.
- DEMOTT, W.R. 1998. Utilization of a cyanobacterium and a phosphorus-deficient green alga as complementary resources by daphnids. *Ecology* **79**: 2463-2481.
- DEMOTT, W.R., R.D. GULATI & K. SIEWERTSEN. 1998. Effects of phosphorus-deficient diets on the carbon and phosphorus balance of *Daphnia magna*. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 1147-1161.
- DEMOTT, W.R., R.D. GULATI & E. VAN DONK. 2001. Effects of dietary phosphorus deficiency on the abundance, phosphorus balance, and growth of *Daphnia cucullata* in three hypereutrophic Dutch lakes. *Limnol. Oceanogr.* **46**: 1871-1880.
- DEVETTER, M. 1998. Influence of environmental factors on the rotifer assemblage in an artificial lake. *Hydrobiologia* **387/388**: 171-178.
- DIEGUEZ, M.C. & J.J. GILBERT. 2002. Suppression of the rotifer *Polyarthra remata* by the omnivorous copepod *Tropocyclops extensus*: predation or competition. *J. Plankton Res.* **24**: 359-369.
- DOOHAN, M. 1973. An energy budget for adult *Brachionus plicatilis* (Müller). *Oecologia (Berlin)* **13**: 351-362.
- DUMONT, H.J., I. VAN DE VELDE & S. DUMONT. 1975. The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia (Berlin)* **19**: 2858-2867.
- DUNCAN, A. 1989. Food limitation and body size in the cycles of planktonic rotifers and cladocerans. *Hydrobiologia* **186/187**: 11-28.

- DUSSART, B. 1967. *Les copépodes des eaux continentales d'Europe occidentale*, Vols. I, II. Boubée & Cie, Paris.
- EDMONDSON, W.T. 1965. Reproductive rates of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature. *Ecol. Monogr.* **35**: 61-111.
- EINSLE, U. 1993. *Crustacea, Copepoda, Calanoida und Cyclopoida*. Gustav Fischer Verlag, New York. 208 pp.
- FISHER, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* **16**: 92-96.
- FOLT, C. & C.R. GOLDMAN. 1981. Allelopathy between zooplankton: A mechanism for interference competition. *Science* **213**: 1133-1135.
- FRADKIN, S.T. 1995. Effects of interference and exploitative competition from large-bodied cladocerans on rotifer community structure. *Hydrobiologia* **313/314**: 387-393.
- FROST, T.M., D.L. DEANGELIS, S.M. BARTELL, D.J. HALL & S.H. HURLBERT. 1988. Scale in the design and interpretation of aquatic community research, pp. 229-258. En: S.R. CARPENTER [ed.], *Complex interactions in lake communities*. Springer-Verlag, New York.
- FUSSMANN, G. 1996. The importance of crustacean zooplankton in structuring rotifer and phytoplankton communities: an enclosure study. *J. Plankton Res.* **18**: 1897-1915.
- GALKOVSKAYA, G.A. & I.F. MITYANINA. 1989. Morphological structure and functional patterns of *Keratella cochlearis* (Gosse) populations in stratified lakes. *Hydrobiologia* **186/187**: 119-128.
- GERRITSEN, J. 1984. Size-efficiency reconsidered: a general foraging model for free-swimming aquatic animals. *Am. Nat.* **123**: 450-467.
- GIANI, A. 1991. Implications of phytoplankton chemical composition for zooplankton production: experimental evidence. *Oecologia* **87**: 409-416.
- GILBERT, J.J. 1963. Contact chemoreception, mating behavior and sexual isolation in the rotifer genus *Brachionus*. *J. Exp. Biol.* **40**: 625-641.
- GILBERT, J.J. 1966. Rotifer ecology and embryological induction. *Science* **151**: 1234-1237.
- GILBERT, J.J. 1988a. Suppression of rotifer populations by *Daphnia*: A review of the evidence, the mechanisms, and the effects on zooplankton community structure. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 1286-1303.
- GILBERT, J.J. 1988b. Susceptibilities of ten rotifer species to interference from *Daphnia pulex*. *Ecology* **69**: 1826-1838.

- GILBERT, J.J. & K.G. BOGDAN. 1981. Selectivity of *Polyarthra* and *Keratella* for flagellate and aflagellate cells. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **21**: 1515-1521.
- GILBERT, J.J. & K.G. BOGDAN. 1984. Rotifer grazing: *in situ* studies on selectivity and rates, pp. 97-133. En: D.G. MEYERS & J.R. STRICKLER [eds.], *Trophic Interactions within Aquatic Ecosystems*. American Association for the Advancement of Science, Washington, DC.
- GILBERT, J.J. & D.K. SCHREIBER. 1998. Asexual diapause induced by food limitation in the rotifer *Synchaeta pectinata*. *Ecology* **79**: 1371-1381.
- GILBERT, J.J. & R.S. STEMBERGER. 1985. Control of *Keratella* populations by interference competition from *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **30**: 180-188.
- GLIWICZ, M.Z. 1986. Predation and the evolution of vertical migration in zooplankton. *Nature* **320**: 746-748.
- GLIWICZ, Z.M. 1990. Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature* **343**: 638-640.
- GOLDMAN, J.C., J.J. MCCARTHY & D.G. PEAVY. 1979. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. *Nature* **279**: 210-215.
- GONZÁLEZ, M.J. 1998. Spatial segregation between rotifers and cladocerans mediated by *Chaoborus*. *Hydrobiologia* **387/388**: 427-436.
- GONZÁLEZ, M.J. & T.M. FROST. 1992. Food limitation and seasonal population declines of rotifers. *Oecologia* **89**: 560-566.
- GOULDEN, C.E., L.L. HENRY & A.J. TESSIER. 1982. Body size, energy reserves, and competitive ability in three species of Cladocera. *Ecology* **63**: 1780-1789.
- GREEN, J. 2001. Variability and instability of planktonic rotifer associations in Lesotho, southern Africa. *Hydrobiologia* **446/447**: 187-194.
- GROEGER, A.W., M.D. SCHRAM & G. RICHARD. 1991. Influence of food quality on growth and reproduction in *Daphnia*. *Freshwater Biol.* **26**: 11-19.
- GUILLARD, R.R.L. 1973. Methods for microflagellates and nanoplankton, pp. 69-85. En: J.R. STEIN [ed.], *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, London.
- GUISANDE, C., I. MANEIRO & I. RIVEIRO. 1999. Homeostasis in the essential amino acid composition of the marine copepod *Euterpina acutifrons*. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 691-696.
- GUISET, A. 1977. Stomach content in *Asplanchna* and *Ploesoma*. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **8**: 126-129.

- GULATI, R.D. & W.R. DEMOTT. 1997. The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art perspectives and priorities. *Freshwater Biol.* **38**: 753-768.
- HAKKARI, L. 1978. On the productivity and ecology of zooplankton and its role as food for fish in some lakes in central Finland. *Biol. Res. Rep. Univ. Jyväskylä* **4**: 3-87.
- HALL, D.J., S.T. THRELKED, C.W. BURNS & P.H. CROWLEY. 1976. The size-efficiency hypothesis and the size structure of zooplankton communities. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **7**:177-208.
- HANEY, J.F. & D.J. HALL. 1973. Sugarcoated *Daphnia*: a preservation technique for cladocera. *Limnol. Oceanogr.* **18**: 331-333.
- HAVENS, K.E. 1990. *Chaoborus* predation and zooplankton community structure in a rotifer-dominated lake. *Hydrobiologia* **198**: 215-226.
- HERZIG, A. 1987. The analysis of planktonic rotifer populations: a plea for long-term investigations. *Hydrobiologia* **147**: 163-180.
- HESSEN, D.O. 1992. Nutrient element limitation of zooplankton production. *Am. Nat.* **140**: 799-814.
- HOFMANN, W. 1977. The influence of a abiotic environmental factors on population dynamics in planktonic rotifers. *Arch. Hydrobiol., Beiheft* **8**: 77-83.
- HOFMANN, W. 1983. Interactions between *Asplanchna* and *Keratella cochlearis* in the Plußsee (north Germany). *Hydrobiologia* **104**: 363-365.
- HOLLING, C.S. 1959. The components of predation as revealed by a study of small-mammal predation of the European sawfly. *Can. Entomol.* **91**: 293-320.
- HOSHAW, R.W. & J.R. ROSOWSKI. 1973. Methods for microscopic algae, pp. 53-68. En: J.R. STEIN [ed.], *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, London.
- HULBERT, S.H. & M.D. WHITE. 1993. Experiments with freshwater invertebrate zooplanktivores: quality of statistical analyses. *B. Mar. Sci.* **53**: 128-153.
- HUTCHINSON, B.P. 1967. *A Treatise on Limnology*. Vol II. *Introduction to Lake Biology and the Limnoplankton*. JOHN WILEY & SONS, New York, 1115 pp.
- INFANTE, A. & A.H. LITT. 1995. Differences between two species of *Daphnia* in the use of 10 species of alga in Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.* **30**: 1053-1059.
- ISTVÁNOVICS, V., J. PADISÁK, K. PETTERSSON & D.C. PIERSON. 1994. Growth and phosphorus uptake of summer phytoplankton in Lake Erken (Sweden). *J. Plankton Res.* **16**: 1167-1196.

- JACK, J.D. & J.J. GILBERT. 1994. Effects of *Daphnia* on microzooplankton communities. *J. Plankton Res.* **16**: 1499-1512.
- JAMIESON, C.D. 1980. The predatory feeding of copepodid stages III to adult *Mesocyclops leuckarti* (Claus), pp 518-537. En: W.C. KERFOOT, *Evolution and ecology of zooplankton communities*. University Press of New England, Hanover (N.H.), London.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical Histochemistry*. W.H. Freeman, San Francisco.
- JONES, J.C. 1979. A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in freshwater. *FBA Scientific Publication N° 39*.
- JOST, C. 2000. Predator-prey theory: hidden twins in ecology and microbiology. *Oikos* **90**: 202-208.
- JUDITH, L.L. & W.L. HIRAM. 1979. Species-specific factors affecting predator-prey interactions of the copepod *Acanthocyclops vernalis* with its natural prey. *Limnol. Oceanogr.* **24**: 613-626.
- KIRK, K.L. 1997. Life-history responses to variable environments: starvation and reproduction in planktonic rotifers. *Ecology* **78**: 434-441.
- KIRK, K.L., J. ELLIS & J. TAYLOR. 1999. Physiological responses to variable environments and respiration: storage and respiration in starving rotifers. *Freshwater Biol.* **42**: 637-644.
- KIRK, K.L. & J.J. GILBERT. 1990. Suspended clay and the population dynamics of planktonic rotifers and cladocerans. *Ecology* **71**: 1741-1755.
- KOSTE, W. 1978. *Rotatoria die rädertiere mitteleuropas, Monogononta*. Vol. II. Gebrüder Borntraeger, Stuttgart.
- KOT, M. 2001. *Elements of Mathematical Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge. 453 pp.
- KREUTZER, C. & W. LAMPERT. 1999. Exploitative competition in differently sized *Daphnia* species: A mechanistic explanation. *Ecology* **80**: 2348-2357.
- KUSCH, J. 1993. Predator-induced morphological changes in *Euplotes* (Ciliata): Isolation of the inducing substance released from *Stenostomum sphagnetorum* (Turbellaria). *J. Exp. Zool.* **265**: 613-618.
- KUSCH, J. & K. HECKMANN. 1992. Isolation of the *Lembadion*-factor, a morphogenetically active signal, that induces *Euplotes* cells to change from their ovoid form into a larger lateral winged morph. *Devel. Gen.* **13**: 241-246.
- LAIR, N. 1990. Effects of invertebrate predation on the seasonal succession of a zooplankton community: A two year study in Lake Aydat, France. *Intrazooplankton Predation* **198**: 1-12.

- LAMPERT, W. 1977. Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* De Geer as related to environmental conditions. IV. Determination of the "threshold" concentration as a factor controlling the abundance of zooplankton. *Arch. Hydrobiol.*, Supplement **48**: 361-368.
- LAMPERT, W. 1985. Food limitation and the structure of zooplankton communities. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **21**: V-VII.
- LAMPERT, W. 1989. The adaptive significance of diel vertical migration of zooplankton. *Funct. Ecol.* **3**: 21-27.
- LAMPERT, W. & K.O. ROTHHAUPT. 1991. Alternating dynamics of rotifers and *Daphnia magna* in a shallow lake. *Arch. Hydrobiol.* **120**: 447-456.
- LAMPERT, W. & U. SCHOBER. 1980. The importance of "threshold" food concentration, pp. 264-267. En: W. C. KERFOOT [ed.], *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. University Press of New England, Hanover.
- LAMPERT, W. & U. SOMMER. 1997. *Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press, New York. 382 pp.
- LAPESA, S., T.W. SNELL, D.M. FIELDS & M. SERRA. 2002. Predatory interactions between a cyclopoid copepod and three sibling rotifer species. *Freshwater Biol.* **47**: 1685-1695.
- LARSSON, P. & S. DODSON. 1993. Chemical communication in planktonic animals. *Arch. Hydrobiol.* **129**: 129-155.
- LEBLANC, J.S., W.D. TAYLOR & O.E. JOHANNSSON. 1997. The feeding ecology of the cyclopoid copepod *Diacyclops thomasi* in Lake Ontario. *J. Great Lakes Res.* **23**: 369-381.
- LEWITUS, A.J. & D.A. CARON. 1990. Relative effects of nitrogen or phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition, and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **61**: 171-181.
- LEWITUS, A.J., D.A. CARON & K.R. MILLER. 1991. Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *J. Phycol.* **27**: 578-587.
- LINDL, T. & J. BAUER. 1994. *Zell- und Gewebekultur*, 3. Aufl. Gustav Fischer Verlag.
- LINDSTROM, K. & B. PEJLER. 1975. Experimental studies on the seasonal variation of the rotifer *Keratella cochlearis* (Gosse). *Hydrobiologia* **46**: 191-197.
- LÜRLING, M. & E. VAN DONK. 1997. Life history consequences for *Daphnia pulex* feeding on nutrient-limited phytoplankton. *Freshwater Biol.* **38**: 693-709.

- M'RANI-ALAOU, M. 2000. Estudio a nivel celular de la germinación del polen, emisión y elongación del tubo polínico en el olivo (*Olea europaea* L.). *Tesis doctoral. Universidad de Granada*.
- MACISAAC, H.J. & J.J. GILBERT. 1990. Does exploitative or interference competition from *Daphnia* limit the abundance of *Keratella* in Loch Leven? A reassessment of May and Jones (1989). *J. Plankton Res.* **12**: 1315-1322.
- MACISAAC, H.J. & J.J. GILBERT. 1991a. Competition between *Keratella cochlearis* and *Daphnia ambigua*: effects of temporal patterns of food supply. *Freshwater Biol.* **25**: 189-198.
- MACISAAC, H.J. & J.J. GILBERT. 1991b. Discrimination between exploitative and interference competition between cladocera and *Keratella cochlearis*. *Ecology* **72**: 924-937.
- MAKAREWICZ, J.C. & G.E. LIKENS. 1979. Structure and function of the zooplankton community of Mirror Lake, New Hampshire. *Ecol. Monogr.* **49**: 109-127.
- MARTOJA, R. & M. MARTOJA-PIERSON. 1970. *Técnicas de Histología animal*. Toray-Masson, S.A., Barcelona.
- MATTSON, W.J. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **11**: 119-161.
- MATVEEV, V. 1993. An investigation of allelopathic effects of *Daphnia*. *Freshwater Biol.* **29**: 99-105.
- MAY, L. 1983. Rotifer occurrence in relation to water temperature in Loch Leven, Scotland. *Hydrobiologia* **104**: 311-315.
- MAY, L. 1987. Culturing freshwater, planktonic rotifers on *Rhodomonas minuta* var. *nannoplanktica* Skuja and *Stichococcus bacillaris* Nägeli. *J. Plankton Res.* **9**: 1217-1223.
- MCCALLUM, H. 2000. *Population Parameters: Estimation for Ecological Models*. LAWTON, J. H. FRS & G. E. LIKENS [eds.]. Blackwell Science, Oxford. 348 pp.
- MERRIMAN, J.L. & K.L. KIRK. 2000. Temporal patterns of resource limitation in natural populations of rotifers. *Ecology* **81**: 141-149.
- MEYER, J.S., C.G. INGERSOLL, L.L. McDONALD & M.S. BOYCE. 1986. Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. *Ecology* **67**: 1156-1166.
- MITCHELL, S.F., F.R. TRAINOR, P.H. RICH & C.E. GOULDEN. 1992. Growth of *Daphnia magna* in the laboratory in relation to the nutritional state of its food species, *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plankton Res.* **14**: 379-391.

- MOAL, J., V. MARTIN-JEZEQUEL, R.P. HARRIS, J.F. SAMAIN & S.A. POULET. 1987. Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. *Oceanol. Acta* **10**: 339-346.
- MONOD, J. 1950. La technique de culture continue; théorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur* **79**: 390-410.
- MORALES-BAQUERO, R. & J.M. CONDE-PORCUNA. 2000. Effect of the catchment areas on the abundance of zooplankton in high mountain lakes of the Sierra Nevada (Spain). *Int. Verh. Verein. Limnol.* **27**: 1804-1808.
- MÜLLER-NAVARRA, D.C. 1995a. Biochemical vs. mineral limitation in *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1209-1214.
- MÜLLER-NAVARRA, D.C. 1995b. Evidence that a highly unsaturated fatty acid limits *Daphnia* growth in nature. *Arch. Hydrobiol.* **132**: 297-307.
- MÜLLER-NAVARRA, D.C., M.T. BRETT, A.M. LISTON & C.R. GOLDMAN. 2000. A highly-unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* **403**: 74-77.
- MÜLLER-NAVARRA, D.C. & W. LAMPERT. 1996. Seasonal patterns of food limitation in *Daphnia galeata*: separating food quantity and food quality effects. *J. Plankton Res.* **18**: 1137-1157.
- MURPHY, J. & J.P. RILEY. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **27**: 31-36.
- NEILL, W.E. 1984. Regulation of rotifer densities by crustacean zooplankton in an oligotrophic montane lake in British Columbia. *Oecologia* **61**: 175-181.
- NOGRADY, T., R.L. WALLACE & T.W. SNELL. 1993. *ROTIFERA*, Vol. I: *Biology, Ecology and Systematics*. SPB Academic Publishing, Hague, 142 pp.
- NORLAND, S. 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria, pp. 303-307. En: P.F. KEMP, B.F. SHERR, E.B. SHERR, & J.J. COLE [eds.], *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton.
- NYGAARD, K. & A. TOBIESEN. 1993. Bacterivory in algae: A survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* **38**: 273-279.
- OCDE (VOLLENWEIDER, R.A. & J.J. KERÉKES). 1982. *Eutrophisation des eaux. Méthodes de surveillance, d'évaluation et de lutte*. OCDE, Paris.
- OJALA, A. 1993. Effects of temperature and irradiance on the growth of two freshwater photosynthetic cryptophytes. *J. Phycol.* **29**: 278-284.
- OOMS-WILMS, A.L., G. POSTEMA & R.D. GULATI. 1999. Population dynamics of planktonic rotifers in Lake Loosdrecht, the Netherlands, in relation to their potential food and predators. *Freshwater Biol.* **42**: 77-97.

- PACE, M.L. & J.D. ORCUTT, JR. 1981. The relative importance of protozoans, rotifers and crustaceans in a freshwater zooplankton community. *Limnol. Oceanogr.* **26**: 822-830.
- PAREJKO, K. & S.I. DODSON. 1990. Progress towards characterization of a predator/prey kairomone: *Daphnia pulex* and *Chaoborus americanus*. *Hydrobiologia* **198**: 51-59.
- PAUL, A.J. & D.W. SCHINDLER. 1994. Regulation of rotifers by predatory calanoid copepods (subgenus *Hesperodiatomus*) in lakes of the Canadian Rocky Mountains. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **51**: 2520-2528.
- PEJLER, B. 1957. Taxonomical and ecological studies on planktonic Rotatoria from central Sweden. *K. Svenska Vetensk. Handl.* **6**: 1-51.
- PEJLER, B. 1977. Experience with rotifer cultures based on *Rhodomonas*. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **8**: 264-266.
- PIVODA, B. 1977. Migration of planktonic rotifers in Lunzer Obersee (Austria). *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **8**: 50-52.
- PLAßMANN, T., G. MAIER & H.B. STICH. 1997. Predation impact of *Cyclops vicinus* on the rotifer community in Lake Constance in spring. *J. Plankton Res.* **19**: 1069-1079.
- PLATH, K. & M. BOERSMA. 2001. Mineral limitation of zooplankton: stoichiometric constraints and optimal foraging. *Ecology* **82**: 1260-1269.
- PORTER, K.G. & Y.S. FEIG. 1980. Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943-948.
- POURRIOT, R. 1963. Utilisation des algues brunes unicellulaires pour l'élevage des Rotifères. *C. R. ACAD. Sci. Paris* **256**: 1603-1605.
- POURRIOT, R. 1977. Food and feeding habits of Rotifera. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **8**: 243-260.
- POURRIOT, R. & C. ROUGIER. 1991. Importance volumétrique des oeufs chez les Rotifères planctoniques. *Annls. Limnol.* **27**: 15-24.
- RADWAN, S. 1984. The influence of some abiotic factors on the occurrence of rotifers of Leczna and Włodawa Lake District. *Hydrobiologia* **112**: 117-124.
- REYNOLDS, C.S. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge. 384 pp.
- RHIEL, E., D.P. HAEDER & W. WEHRMEYER. 1988a. Diaphototaxis and gravitaxis in a freshwater *Cryptomonas*. *Plant. Cell. Physiol.* **29**: 755-760.
- RHIEL, E., D.P. HAEDER & W. WEHRMEYER. 1988b. Photo-orientation in a freshwater *Cryptomonas* species. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2**: 123-132.

- RICE, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**: 223-225.
- RIEMANN, B., P. SIMONSEN & L. STENSGAARD. 1989. The carbon and chlorophyll content of phytoplankton from various nutrient regimes. *J. Plankton Res.* **11**: 1037-1045.
- ROBERTS, E.C. & J. LAYBOURN-PARRY. 1999. Mixotrophic cryptophytes and their predators in the Dry Valley Lakes of Antarctica. *Freshwater Biol.* **41**: 737-746.
- ROCHA, O. & A. DUNCAN. 1985. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *J. Plankton Res.* **7**: 279-294.
- ROCHE, K. 1990a. Prey features affecting ingestion rates by *Acanthocyclops robustus* (Copepoda: Cyclopoda) on zooplankton. *Oecologia* **83**: 76-82.
- ROCHE, K. 1990b. Some aspects of vulnerability to cyclopid predation of zooplankton prey individuals. *Hydrobiologia* **198**: 153-162.
- RODINA, A.G. 1972. *Methods in aquatic microbiology*. University Park Press, Baltimore and Butterworth and CO LTD.
- ROTHHAUPT, K.O. 1990a. Differences in particle-size dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 16-23.
- ROTHHAUPT, K.O. 1990b. Population growth rates of two closely related rotifer species: effects of food quality, particle size, and nutritional quality. *Freshwater Biol.* **23**: 561-570.
- ROTHHAUPT, K.O. 1990c. Resource competition of herbivorous zooplankton: a review of approaches and perspectives. *Arch. Hydrobiol.* **118**: 1-29.
- ROTHHAUPT, K.O. 1993. Rotifers and continuous culture techniques: model systems for testing mechanistic concepts of consumer-resource interactions, pp. 178-192. En: N. WALZ [ed.], *Plankton Regulation Dynamics*. Springer-Verlag, Berlin.
- ROTHHAUPT, K.O. 1995. Algal nutrient limitation affects rotifer growth rate but not ingestion rate. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1201-1208.
- ROTHHAUPT, K.O. & W. LAMPERT. 1992. Growth-rate dependant feeding rates in *Daphnia pulex* and *Brachionus rubens*: Adaptation to intermediate time-scale variations in food abundance. *J. Plankton Res.* **14**: 737-751.
- RUTTNER-KOLISKO, A. 1974. *Plankton Rotifers, biology and taxonomy*. Binnengewässer 26 Suppl.
- RUTTNER-KOLISKO, A. 1975. The vertical distribution of plankton rotifers in a small alpine lake with a sharp oxygen depletion (Lunzer Obersee). *Verh. Int. Ver. Limnol.* **19**: 1286-1294.

- SANDERS, W.R. & K.G. PORTER. 1988. Phagotrophic phytoflagellates. *Adv. Microb. Ecol.* **10**: 167-192.
- SARNELLE, O. 1997. *Daphnia* effects on microzooplankton: comparisons of enclosure and whole-lake responses. *Ecology* **78**: 913-928.
- SCHINDLER, D.W. 1972. Production of phytoplankton and zooplankton in Canadian Shield lakes, pp. 311-331. En: Z. ZAJAK & A. HILLBRICHT-ILKOWSKA [eds.], *Productivity problems of freshwater*. PWN.
- SCHNEIDER, D.W. 1990. Direct assessment of the independent effects of exploitative and interference competition between *Daphnia* and rotifers. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 916-922.
- SCHOENER, T.W. 1983. Field experiments on interspecific competition. *Am. Nat.* **122**: 240-285.
- SCHULZ, K.L. & R.W. STERNER. 1999. Phytoplankton phosphorus limitation and food quality for *Bosmina*. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1549-1556.
- SCHULZE, P.C., H.E. ZAGARESE & C.E. WILLIAMSON. 1995. Competition between crustacean zooplankton in continuous cultures. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 33-45.
- SCHUURMAN, J.F.M. 1932. A seasonal study of the microflora and microfauna of Florida Lake, Johannesburg, Transvaal. *Trans. Roy. Soc. South Africa* **20**: 333-386.
- SELIG, U., T. HÜBENER & M. MICHALIK. 2002. Dissolved and particulate phosphorus forms in a eutrophic shallow lake. *Aquat. Sci.* **64**: 97-105.
- SHIEL, R.J. & W. KOSTE. 1993. Rotifera from Australian inland waters, IX. Gastropodidae, Synchaetidae, Asplanchnidae (Rotifera: Monogononta). *Trans. R. Soc. S. Aust.* **117**: 111-139.
- SIH, A. 1987. Predators and prey lifestyles: an evolutionary and ecological overview, pp. 203-224. En: W.C. KERFOOT & A. SIH [eds.], *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatics Communities*. University Press of New England, Hanover.
- SKINNER, R.H. & A.C. COHEN. 1994. Phosphorus nutrition and leaf age effects on sweet potato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *Environ. Entomol.* **23**: 693-698.
- SKULBERG, O.M. & R. SKULBERG. 1990. Research with algal cultures. NIVA's culture collection of algae. *NIVA-report ISBN 82-551743-6*.
- SMITH, V.H. 1991. Competition between consumers. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 820-823.

- SNELL, T.W. 1998. Chemical ecology of rotifers. *Hydrobiologia* **387/388**: 267-276.
- SNELL, T.W. & M.J. CARMONA. 1995. Comparative toxicant sensitivity of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**: 415-420.
- SNELL, T.W. & R. RICO-MARTÍNEZ. 1996. Characteristics of the mate-recognition pheromone in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* **27**: 143-151.
- SNELL, T.W., M.J. CHILDRESS & B.C. WINKLER. 1988. Characteristics of the mate recognition factor in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **89A**: 481-485.
- SOKAL, R.R. & F.J. ROHLF. 1995. *Biometry*, 3^a ed. W. H. Freeman & Company, New York. 887 pp.
- SOMMER, U. 1984. The paradox of the plankton: Fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. *Limnol. Oceanogr.* **29**: 633-636.
- SOMMER, U. 1989. *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*. Springer-Verlag, Berlin. 369 pp.
- SOMMER, U. 1992. Phosphorus-limited *Daphnia*: Intraspecific facilitation instead of competition. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 966-973.
- SOMMER, U., Z.M. GLIWICZ, W. LAMPERT & A. DUNCAN. 1986. The Plankton Ecology Group model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. Hydrobiol.* **106**: 433-472.
- STARKWEATHER, P.L. 1980. Aspects of the feeding behavior and trophic ecology of suspension feeding rotifers. *Hydrobiologia* **73**: 63-72.
- STARKWEATHER, P.L. 1987. Rotifera, pp. 159-183. En: T.J. PANDIAN & F.J. VERNBERG [eds.], *Animal Energetics*, vol. 1: *Protozoa through Insects*. Academic Press, Florida.
- STELZER, C.P. 1998. Population growth in planktonic rotifers. Does temperature shift the competitive advantage for different species? *Hydrobiologia* **387/388**: 349-353.
- STELZER, C.P. 2001. Resource limitation and reproductive effort in a planktonic rotifer. *Ecology* **82**: 2521-2533.
- STEMBERGER, R.S. 1981. A general approach to the culture of planktonic rotifers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 721-724.

- STEMBERGER, R.S. 1988. Reproductive costs and hydrodynamic benefits of chemically induced defenses in *Keratella testudo*. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 593-606.
- STEMBERGER, R.S. 1990. Food limitation, spination and reproduction in *Brachionus calyciflorus*. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 33-44.
- STEMBERGER, R.S. & M.S. EVANS. 1984. Rotifer seasonal succession and copepod predation in Lake Michigan. *J. Great Lakes Res.* **10**: 417-428.
- STEMBERGER, R.S. & J.J. GILBERT. 1985. Body size, food concentration, and population growth in planktonic rotifers. *Ecology* **66**: 1151-1159.
- STEMBERGER, R.S. & J.J. GILBERT. 1987a. Defenses of planktonic rotifers against predators, pp. 227-239. En: KERFOOT W.C. & A. SIH [eds.], *Predation: Direct and Indirect Impacts on Aquatic Communities*. University Press of New England, Hanover.
- STEMBERGER, R.S. & J.J. GILBERT. 1987b. Rotifer threshold food concentrations and the size-efficiency hypothesis. *Ecology* **68**: 181-187.
- STERNER, R.W. 1993. *Daphnia* growth on varying quality of *Scenedesmus*: mineral limitation of zooplankton. *Ecology* **74**: 2351-2360.
- STERNER, R.W., D.D. HAGEMEIERS, W.L. SMITH & R.F. SMITH. 1993. Phytoplankton nutrient limitation and food quality for *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **38**: 857-871.
- STERNER, R.W. & D.O. HESSEN. 1994. Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **25**: 1-29.
- STERNER, R.W. & J.L. ROBINSON. 1994. Thresholds for growth in *Daphnia magna* with high and low phosphorus. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 1228-1232.
- STERNER, R.W. & K.L. SCHULZ. 1998. Zooplankton nutrition: recent progress and a reality check. *Aquat. Ecol.* **32**: 261-279.
- STEVENS, S.E. JR, D.A.M. PAONE & D.L. BALKILL. 1981. Accumulation of cyanophycin granules as a result of phosphate limitation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Plant. Physiol.* **67**: 716-719.
- STEWART, L.J. & D.G. GEORGE. 1987. Environmental factors influencing the vertical migration of plankton rotifers in a hypereutrophic tarn. *Hydrobiologia* **147**: 203-208.
- STICH, H. & W. LAMPERT. 1981. Predator evasion as an explanation of diurnal vertical migration by zooplankton. *Nature* **293**: 396-398.
- TALLING, J.F. & D. DRIVER. 1961. Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. *Proceedings of a Conference on Primary Productivity*

- Measurements, Marine and Freshwater*. US Atomic Energy Comm. Public. TID-7633, pp. 142-146.
- THRELKED, S.T. 1976. Starvation and the size structure of zooplankton communities. *Freshwater Biol.* **6**: 489-496.
- TOLLRIAN, R. & E. VON ELERT. 1994. Enrichment and purification of *Chaoborus* kairomone from water: further steps forward its chemical characterization. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 788-796.
- TRANVIK, L.J., K.G. PORTER & J.M. SEIBURTH. 1989. Occurrence of bacterivory in *Cryptomonas*, a common freshwater phytoplankters. *Oecologia* **78**: 473-476.
- URABE, J. 1992. Midsummer succession of rotifer plankton in a shallow eutrophic pond. *J. Plankton Res.* **14**: 851-866.
- URABE, J., T.B. GURUNG, T. YOSHIDA, T. SEKINO, M. NAKANISHI, M. MARUO & E. NAKAYAMA. 2000. Diel changes in phagotrophic by *Cryptomonas* in Lake Biwa. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1558-1563.
- VAN DEN HOEK, C., D.G. MANN & H.M. JAHNS. 1995. *Cryptophyta*. En: *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press.
- VAN DONK, E., M. LÜRLING, D.O. HESSEN & B. LOKHORST. 1997. Changed cell wall morphology in nutrient deficient phytoplankton and the significance for grazers. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 357-364.
- VILLAR-ARGAIZ, M. & R.W. STERNER. 2002. Phosphorus limited algae induced life history bottlenecks in *Diatomus clavipes*. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 1229-1233.
- VON ELERT, E. & C.J. LOOSE. 1996. Predator-induced diel vertical migration in *Daphnia*: enrichment and preliminary chemical characterization of a Kairomone exuded by fish. *J. Chem. Ecol.* **22**: 885-895.
- VON ELERT, E. & P. STAMPFL. 2000. Food quality for *Eudiaptomus gracilis*: the importance of particular highly unsaturated fatty acids. *Freshwater Biol.* **45**: 189-200.
- WALZ, N. 1987. Comparative population dynamics of the rotifers *Brachionus angularis* and *Keratella cochlearis*. *Hydrobiologia* **147**: 209-213.
- WALZ, N. 1993. Life history strategies of rotifers, pp 193-214. En: N. WALZ [ed.], *Plankton Regulation Dynamics*. Springer-Verlag, Berlin.
- WALZ, N. 1995. Rotifer populations in plankton communities: Energetics and life history strategies. *Experientia* **51**: 437-453.
- WALZ, N., H.J. ELSTER & M. MEZGER. 1987. The development of the rotifer community structure in Lake Constance during its eutrophication. *Arch Hydrobiol. Suppl.* **74**: 452-487.

- WEBER, A. 2001. Interactions between predator kairomone and food level complicate the ecological interpretation of *Daphnia* laboratory results. *J. Plankton Res.* **23**: 41-46.
- WEERS, P.M.M. & R.D. GULATI. 1997a. Effect of the addition of polyunsaturated fatty acids to the diet on the growth and fecundity of *Daphnia galeata*. *Freshwater Biol.* **38**: 721-729.
- WEERS, P.M.M. & R.D. GULATI. 1997b. Growth and reproduction of *Daphnia galeata* in response to changes in fatty acids, phosphorus, and nitrogen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1584-1589.
- WETZEL, R.G. 1983. *Limnology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 767 pp.
- WILLIAMSON, C.E. 1983. Invertebrate predation on planktonic rotifers. *Hydrobiologia* **104**: 385-396.
- WILLIAMSON, C.E. 1984. Laboratory and field experiments on the feeding ecology of the cyclopoid copepod, *Mesocyclops edax*. *Freshwater Biol.* **14**: 575-585.
- WILLIAMSON, C.E. 1987. Predator-prey interactions between omnivorous diaptomid copepods and rotifers: The role of prey morphology and behavior. *Limnol. Oceanogr.* **32**: 167-177.
- WILLIAMSON, C.E. 1993. Linking predation risk models with behavioural mechanisms: identifying population bottlenecks. *Ecology* **74**: 320-331.
- WILLIAMSON, C.E. & N.M. BUTLER. 1986. Predation on rotifers by the suspension-feeding calanoid copepod *Diaptomus pallidus*. *Limnol. Oceanogr.* **31**: 393-402.
- WILLIAMSON, C.E. & J.J. GILBERT. 1980. Variation among zooplankton predators: The potential of *Asplanchna*, *Mesocyclops*, and *Cyclops* to attack, capture, and eat various rotifer prey, pp. 509-517. En: W.C. KERFOOT [ed.], *Evolution and ecology of zooplankton communities*. University Press of New England, Hanover (N.H.) London.
- WILLIAMSON, C.E. & R.E. MAGNIEN. 1982. Diel vertical migration in a *Mesocyclops edax*: Implications for predation rate estimates. *J. Plankton Res.* **4**: 329-339.
- YAN, N.D., W. KELLER, H.J. MACISAAC & L.J. MCEACHERN. 1991. Regulation of zooplankton community structure of an acidified lake by *Chaoborus*. *Ecol. Appl.* **1**: 52-65.
- YOSHIDA, T., S. BAN, T. TAKENOUCI, T. AONO, Y. ISHIKAWA, H. MIKAMI, K. TAKANO, K. IMADA, R. YASUTOMI & K. TAKEUCHI. 2000. Top-down control of population dynamics of the dominant rotifers in two mesotrophic lakes in Hokkaido, Japan. *Arch. Hydrobiol.* **148**: 481-498.
- YOSHINAGA, T., A. HAGIWARA & K. TSUKAMOTO. 2000. Effect of periodical starvation

on the life history of *Brachionus plicatilis* O.F. Müller (Rotifera): a possible strategy for population stability. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **253**: 253-260.

YÚFERA, M., L.M. LUBIÁN & E. PASCUAL. 1983. Efecto de cuatro algas marinas sobre el crecimiento poblacional de dos cepas de *Brachionus plicatilis* (Rotifera: Brachionidae) en cultivo. *Inv. Pesq.* **47**:325-337.

ZIMMERMANN, V.C. 1974. Die pelagischen Rotatorien des Sempachersees, mit spezieller Berücksichtigung der Brachioniden und der Ernährungsfrage. *Schweiz. Z. Hydrol.* **36**: 205-300.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053396



**Embalse de Iznájar,
Córdoba.**

