



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Ecología

**Efectos interactivos de radiación UV y pulsos de nutrientes
sobre la red trófica microbiana: aproximación estructural,
estequiométrica y funcional**

TESIS DOCTORAL

Jose Antonio Delgado Molina

Granada 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Antonio Delgado Molina
D.L.: GR. 2601-2009
ISBN: 978-84-692-3878-3

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Ecología

**Efectos interactivos de radiación UV y pulsos de nutrientes
sobre la red trófica microbiana: aproximación estructural,
estequiométrica y funcional**

Memoria presentada por el Licenciado Jose Antonio Delgado Molina para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Granada

Doctorando

Fdo: Jose Antonio Delgado Molina

Directores

Fdo: Dra. Presentación Carrillo Lechuga
Departamento de Ecología
Universidad de Granada

Fdo: Juan Manuel Medina Sánchez
Departamento de Ecología
Universidad de Granada

Dra. Presentación Carrillo Lechuga, Profesora Titular de Ecología de la Universidad de Granada y Juan Manuel Medina Sánchez, Profesor de Ecología de la Universidad de Granada

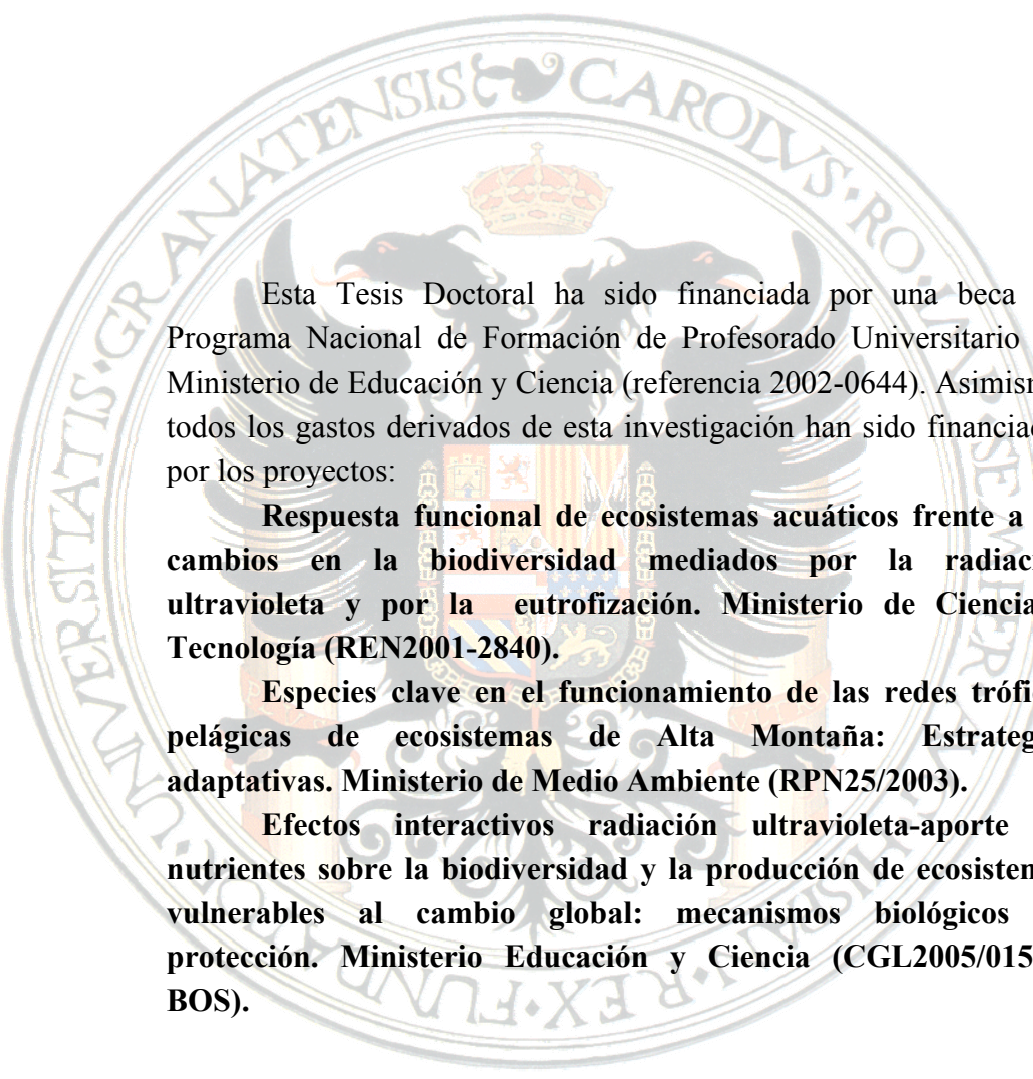
CERTIFICAN

Que los trabajos de investigación desarrollados en la Memoria de Tesis: “Efectos interactivos de radiación UV y pulsos de nutrientes sobre la red trófica microbiana: aproximación estructural, estequiométrica y funcional”, son aptos para ser presentados por el Ldo. Jose Antonio Delgado Molina ante el Tribunal que en su día se designe, para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente certificado a 5 de mayo de 2009.

Dra. Presentación Carrillo

Dr. Juan Manuel Medina Sánchez

The seal of the University of Granada is a large, circular emblem in the background. It features a central shield with a crown on top, flanked by two lions. The shield is surrounded by a circular border containing the Latin text 'UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS ROMANVS SEPTIMVS REX FLAVVS'.

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (referencia 2002-0644). Asimismo, todos los gastos derivados de esta investigación han sido financiados por los proyectos:

Respuesta funcional de ecosistemas acuáticos frente a los cambios en la biodiversidad mediados por la radiación ultravioleta y por la eutrofización. Ministerio de Ciencia y Tecnología (REN2001-2840).

Especies clave en el funcionamiento de las redes tróficas pelágicas de ecosistemas de Alta Montaña: Estrategias adaptativas. Ministerio de Medio Ambiente (RPN25/2003).

Efectos interactivos radiación ultravioleta-aporte de nutrientes sobre la biodiversidad y la producción de ecosistemas vulnerables al cambio global: mecanismos biológicos de protección. Ministerio Educación y Ciencia (CGL2005/01564/BOS).

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

Sostengo que un hombre debe luchar hasta el final en la medida del precio que le ha puesto a su propia vida. Robert Browning.
Inscrito en la tumba de Sir Ernest Shackleton.

I hold that man should strive to the uttermost for his life's set prize. Robert Browning. Inscribed on Sir Ernest Shackleton's grave.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	XV
Capítulo 1 Introducción general	1
Interacción de factores	2
Naturaleza de los efectos interactivos	6
Factores considerados en los estudios de efectos interactivos.....	8
Factores de cambio global importantes en lagos de alta montaña de la región mediterránea	9
Escala de estudio	11
Idoneidad del uso de mesocosmos para experimentación	12
El bucle microbiano como centro de atención	14
¿Qué preguntas quedan abiertas? Objetivos de la Tesis	16
Capítulo 2 Material y Métodos	21
Ecosistema estudiado	22
Aproximación experimental	23
Aproximación observacional	26
Variables estructurales	27
Mediciones in situ	27
Toma de muestras	27
Análisis en laboratorio	28
Determinación de compuestos de fósforo	28
Determinación de compuestos de nitrógeno	29
Determinación de la composición elemental de algas y de bacterias	30
Estructura biológica	30

VARIABLES FUNCIONALES	35
Producción primaria, excreción algal de carbono orgánico y su reasimilación bacteriana	35
Producción bacteriana y eficiencia de producción bacteriana	38
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	41

Capítulo 3 Factores responsables de los cambios estructurales y funcionales en la red trófica microbiana del lago de La Caldera43

Introducción	44
Material y métodos	47
Resultados	50
Análisis interanual	50
Caracterización estructural del lago: ambiente físico químico	54
Estructura biológica de la comunidad nanoplanctónica del lago	59
Estequiometría y función de la comunidad nanoplanctónica del lago	63
Control biótico y abiótico de la comunidad nanoplanctónica	66
Discusión	73
Estructura y función de la comunidad algal	74
Estructura y regulación del bucle microbiano	77

Capítulo 4 Interactive effects of phosphorus-input and ultraviolet radiation on algal diversity in a high mountain lake: Large-scale approach83

Abstract	84
Introduction	85
Material and methods	87
Study site	87
Field sampling and biological determinations	88
In situ experiment	89

Physical analyses	90
Chemical and biological analyses	91
Statistical analyses	93
Results	94
Lake conditions	94
Experimental conditions	96
Structure of nanoplanktonic community	97
Interactive UVR × P effect on aggregate and emergent variables ...	99
UVR and P effects on algal composition	103
Discussion	106
Interactive UVR × P effects on aggregate and emergent variables of algal community	106
Algal UVR tolerance	108
Implications	110

Capítulo 5 Interactive effects of phosphorus inputs and ultraviolet radiation on primary production and elemental composition of algae in a high mountain lake113

Abstract	114
Introduction	115
Material and methods	118
Results	121
Effects of P-enrichment and UVR on algae: Biomass, chl a and elemental composition	122
Effects of P-enrichment and UVR on algae: primary production and photosynthetic C release	127
Discussion	129
Effects of UVR and P-enrichment on algae: structural variables	129
Effects of UVR and P-enrichment on algae: functional variables	131
Sestonic C:P ratio links structural and functional responses in algae	132
Implications	134
Conclusion	135

Capítulo 6 Efectos interactivos de pulsos de fósforo y radiación UV sobre la estructura y regulación del bucle microbiano	137
Introducción	138
Material y métodos	141
Resultados	144
Efectos interactivos de UVR × P sobre la estructura del bucle microbiano	144
Efectos interactivos UVR × P sobre la producción bacteriana	151
Efectos interactivos UVR × P sobre la interacción productor - bucle microbiano	155
Factores de control de la producción bacteriana	163
Discusión	168
Respuesta del bucle microbiano al efecto interactivo UVR × P	168
Efecto interactivo UVR × P sobre la interacción productor-bucle microbiano	171
Conclusión	173
 Síntesis	 175
 Conclusiones	 183
 Bibliografía	 185
 Abreviaturas	 228

AGRADECIMIENTOS

Al cabo de estos años en los que esta Tesis Doctoral ha ido dejando de ser un proyecto hasta llegar a convertirse en una realidad tangible, y desde la perspectiva de este presente fugaz que me permite lanzar esa mirada hacia los momentos vividos, disfrutados y sufridos, quiero mostrar mi agradecimiento a las personas que afortunadamente se han cruzado en esta etapa de mi vida:

A Presentación Carrillo, mi directora de Tesis, que desde el primer momento se volcó conmigo. Gracias por esa combinación de libertad y de seguimiento que he recibido y que ha fructificado en forma de este trabajo. No olvidaré las largas horas de revisión conjunta de manuscritos y de capítulos, ni sus característicos ejemplos con los que consigue simplificar la comprensión del más complejo proceso ecológico. Siempre tendré presente su ejemplo de implicación en todos los aspectos, fomentando el trabajo en equipo y la unidad del grupo, así como su admirable forma de compaginar innumerables tareas y llevarlas a cabo simultáneamente. Su humanidad, más allá del ámbito académico, es un regalo que siempre llevaré conmigo.

A Juan Manuel Medina, mi co-director. Le doy las gracias por el esfuerzo en aportar lo mejor de sí mismo a esta Tesis y por su permanente disponibilidad cuando la he necesitado. Compañero infatigable de trabajo tanto técnico como intelectual y siempre con la mejor de las sonrisas. Agradezco sobre todo el ambiente de cordialidad y de amistad que genera y que es intrínseco a su persona.

A Manuel Villar Argaiz y a Francisco José Bullejos, compañeros de fatigas y de satisfacciones, inquietas fuentes inagotables de avaricia científica. Gracias por representar ese estímulo tan necesario y gracias por crear ese ambiente en el que el reparto de esta importante carga de trabajo, codo con codo, hace que los objetivos parezcan más fáciles de conseguir.

A María José Villalba, no solo por su apasionada ayuda en el trabajo de campo, sino por su ejemplo de humanidad, de sinceridad, de naturalidad y de ver siempre el lado bueno de todas las cosas.

A José Pino, subdirector del Parque Nacional de Sierra Nevada. Gracias por facilitar nuestro acceso hasta la laguna de La Caldera y así permitir el desarrollo de la compleja aproximación experimental, necesaria para abordar los objetivos de esta Tesis Doctoral. Gracias también a Jose Luis, Conrado, Isacio, Ángeles y Felipe, guardas del Parque Nacional, por su valiosa ayuda en el trabajo de campo. La dedicación a su labor y la alegría que me transmitieron me impresionaron muy gratamente.

A los Drs. Félix López Figueroa y José Aguilera. Gracias por la experiencia aportada y por el material prestado, imprescindible para la cuantificación de todo el espectro de radiación solar, variable fundamental en este estudio.

A los Drs. Gunnar Bratbak y Mikal Heldal, por la maravillosa acogida que me ofrecieron durante mis dos estancias en la ciudad de Bergen. En ellas me enseñaron amablemente la técnica de cuantificación de partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión y me permitieron analizar las muestras que finalmente desvelaron por primera vez el papel que juegan los virus en el lago de La Caldera. Gracias también al Dr. Runar Thyraug por sus inestimables consejos y a los demás amigos de Noruega por los inolvidables momentos que me regalaron.

Al Dr. Pedro Sánchez Castillo, por la ayuda desinteresada que me ha ofrecido en la fase de estudio de la estructura de la comunidad algal.

A Silvia Rosillo. Gracias porque tu admirable diligencia en la realización de análisis químicos me alivió el trabajo al final de la fase analítica de este estudio. Tu aparición supuso una entrada de aire fresco y de nueva organización en los laboratorios que todos te agradecemos.

Agradecimientos

A los responsables del laboratorio de Radiofarmacia, que permitieron el uso de su contador de centelleo mientras no hubo disponibilidad en la Facultad de Ciencias.

A Jaime Lazuén Alcón, cuyos consejos me condujeron a desarrollar el sistema de filtración de flujo inverso que permitió la purificación de las muestras destinadas a cuantificar los ciliados de este estudio.

A los Drs. Andrés González Carmona y Rocío Raya Miranda, profesores del departamento de Estadística e Investigación Operativa. Gracias por la inestimable ayuda en la resolución de las numerosas dudas en materia de estadística que han surgido a lo largo de estos años.

A los demás miembros del Departamento de Ecología que han contribuido a desarrollar un ambiente de cordialidad. Quiero mencionar especialmente a los sufridos becarios que han ido pasando por nuestras salas comunes de trabajo: Carolina, Irene, Jorge, Jose Luis, Asier, Luis Matías, Eva, Javi, Nathalie, Oti, Belén... Gracias por ese ambiente alegre que habéis generado, por esos momentos en los que se rompía el silencio para dar paso al sano debate de problemas comunes.

A mi madre, por ser una persona que nunca ha cuestionado ninguna de mis decisiones, especialmente aquellas que han ido determinando mis proyectos de vida. Gracias por mostrarme tu apoyo en todo momento y en todos los aspectos en que te ha sido posible.

A mi padre, cuyo ejemplo de lucha hasta conseguir los objetivos más difíciles ha estado siempre presente en mi vida, llevándome a afrontar retos con ese optimismo que te da el saber que todo es posible con voluntad y esfuerzo.

A mis hermanos y demás familiares que siempre me han apoyado, sin preguntar en exceso. Gracias por vuestra comprensión, a pesar del poco tiempo que os he dedicado.

A todos mis amigos; a todos los que no estáis relacionados directamente con este trabajo. Todos, tanto los que tenéis “los pies en la tierra” como los que gustáis de meter los pies bajo ella, o los que lucháis por objetivos que los ingenuos tildarían de imposibles. No os voy a nombrar, pero sabed que vuestra amistad ha sido importantísima para mí y, vuestro ejemplo, continua fuente de virtud y todo un referente de vida. Muy especialmente quiero agradecer a todos los que habéis sido cómplices de mis “pecados”; esas pequeñas experiencias que te enseñan la grandeza de la vida en todas sus facetas.

A José Luis Pérez de Arteaga, Ana Vega Toscano, José Luis García del Busto, Martín Llade, Jose Manuel Berea y tantos otros grandes y esforzados profesionales que han convertido a Radio Clásica en un valioso agente estimulador del estado de ánimo de este oyente. A lo largo de estos años, la música de esta emisora ha actuado para mí como un mecanismo nucleador a partir del que se organizan todas esas sensaciones originalmente demasiado entrópicas. Esta Música de todos los tiempos, de forma continuada me ha estado aportando algunos de esos elementos que llenan de belleza al día a día.

Gracias a todos.

1

Introducción General

Interacción de factores

El cambio global es el resultado de la acción de múltiples factores ambientales, que ejercen impactos acumulativos sobre la estructura y la función de los ecosistemas (Sala et al. 2000, Schindler 2001, Hansson y Brönmark 2002, Steffen et al. 2004, Christensen et al. 2006). Los factores ambientales pueden ser bióticos o abióticos y son considerados estresores cuando exceden su rango de variabilidad normal, afectando la fisiología de los organismos, las interacciones entre las especies y dinámica de las poblaciones (Barrett et al. 1976, Auerbach 1981). En el ambiente natural, los estresores bióticos y abióticos no operan independientemente, sino que a menudo interactúan para generar impactos combinados sobre los organismos (Frost et al. 1999, Schindler 2001, Vinebrooke et al. 2004). La comprensión de los efectos de múltiples estresores constituye un reto en el actual escenario de cambio global, sobre todo porque los efectos de la interacción de estresores no se pueden predecir en base a evidencias de estudios que consideran a un solo estresor aislado (Breitburg et al. 1999, Folt et al. 1999).

Con objeto de identificar la naturaleza de la interacción de múltiples estresores, Folt et al. (1999) han propuesto tres tipos de modelo: efectos individuales comparativos, efectos aditivos y efectos multiplicativos.

El **modelo de efectos individuales comparativos** predice que el efecto de los estresores en combinación es igual al efecto del estresor individual más fuerte o dominante (Bruland et al. 1991). Este es el más simple de los tres modelos tradicionales y describe situaciones donde un estresor individual tiene prioridad sobre otro en determinar su efecto combinado. Se trata de una situación parecida a la que ya fue propuesta al enunciar la conocida ley del mínimo de Liebig, según la cual el crecimiento de un organismo sólo se restringe por el nutriente más limitante. De forma similar, en el modelo de efectos comparativos, cuando un estresor fuerte está presente, los estresores más débiles no ejercen impacto adicional. Según este modelo de efectos individuales comparativos, los estresores en combinación son sinérgicos o antagónicos cuando sus efectos combinados son respectivamente mayores o menores que el efecto del estresor individual más fuerte. Para evitar confusión con otros

modelos, Folt et al. (1999) proponen no denominar a estas respuestas como sinergismo o antagonismo, sino como efectos del estrés incrementados o disminuidos (zonas A y B en Fig. 1-1). Ejemplo: Un experimento con dos estresores Q y R que afectan negativamente al desarrollo de una población de organismos. Asumiendo la ausencia de otros factores externos, bajo el estresor Q los organismos alcanzan un 60% del desarrollo óptimo (control sin estresores), mientras que el estresor R determina un desarrollo del 50%. En este caso, R es el estresor individual más fuerte. Cuando ambos estresores se aplican combinados, el modelo de efectos individuales comparativos predice que los organismos deberían alcanzar un desarrollo del 50%, equivalente a la aplicación del estresor R, que es el estresor individual más fuerte. Si el desarrollo de los organismos es $>50\%$ del óptimo, hay un efecto de estrés disminuido (zona A en Fig. 1-1), donde la interacción de los dos estresores ha reducido el efecto del estresor individual más fuerte. Si por el contrario el desarrollo de los organismos en el tratamiento con estresores combinados es $<50\%$ de la óptima, se dice que ha habido un efecto de estrés incrementado (zonas B en Fig. 1-1).

En el **modelo de efectos aditivos** ocurre sinergismo o antagonismo cuando el efecto combinado de múltiples estresores es mayor (sinergismo) o menor que (antagonismo) la suma de los efectos provocados por los estresores individuales (Hay et al. 1994, Folt et al. 1999). El modelo aditivo ha sido usado frecuentemente en estudios de pesticidas o metales tóxicos (Lichtenstein et al. 1973, Macek 1975, Parker 1979, Hoagaland et al. 1993), donde se supone que los efectos se acumulan aditivamente. También puede ser particularmente apropiado cuando los estresores afectan a diferentes procesos fisiológicos, puesto que este modelo asume que cuando un organismo está expuesto a varios estresores en combinación, los procesos están afectados igual que cuando está expuesto a cada estresor de forma aislada. Una limitación importante del modelo de efectos aditivos es que el sinergismo no puede ser detectado cuando la suma de los efectos individuales excede el 100% (Pennings 1996, zona F en Fig. 1-1). Debido a que es común que los efectos de los estresores individuales sean elevados, normalmente es difícil detectar sinergismo con el modelo aditivo. Ejemplo: Siguiendo con el ejemplo anterior, el modelo de efectos aditivos predice que el porcentaje de reducción del desarrollo en el tratamiento con los estresores combinados en relación a las condiciones óptimas sería igual a la suma de

las reducciones observadas para cada estresor de forma separada (habría una reducción del 40% del desarrollo de organismos causada por el estresor Q, además de un 50% de reducción causada por la escasez de nitrógeno). El porcentaje total de reducción del desarrollo de organismo en relación al óptimo sería del 90%. El modelo aditivo proporciona una forma conservativa para estimar efectos sinérgicos y es útil cuando los efectos individuales de los estresores no son elevados. El antagonismo ocurre cuando los efectos combinados del estrés son menores que los aditivos (cuando el desarrollo es $>10\%$; zona E de la Fig. 1-1). Por el contrario, el sinergismo ocurre cuando los efectos combinados del estrés son mayores que los aditivos (cuando el desarrollo es $<10\%$; zona F de la Fig. 1-1).

El **modelo de efectos multiplicativos** es aplicable cuando el estrés ejercido por un factor puede afectar a los efectos de otro estresor. Ejemplo: Bajo el modelo multiplicativo, el desarrollo de los organismos en el tratamiento con estresores combinados es esperable que sea igual al producto de los efectos individuales. Si el estresor Q reduce la producción hasta un 60% del óptimo (reducción del 40%) y el estresor R hasta un 50% (reducción del 50%), el efecto interactivo se calcula mediante la multiplicación de las producciones como porcentaje del óptimo esperado de cada estresor aislado. El resultado es la producción esperada en el tratamiento con los dos factores combinados ($0,60 \times 0,50 \approx 0,30$). Por tanto, en este ejemplo se predice que el desarrollo de los organismos en el tratamiento con los dos factores combinados será un 30% respecto al óptimo.

Si el desarrollo de los organismos en el tratamiento de combinación de estresores es menor que la predicción multiplicativa (i.e., $<30\%$; zona D en Fig. 1-1), el efecto interactivo es mayor que el producto de los dos efectos individuales y se habla de sinergismo multiplicativo. De forma similar, un desarrollo $>30\%$ indica un antagonismo multiplicativo (zona C en Fig. 1-1). En este último caso el desarrollo de los organismos es mayor que lo predicho por el modelo multiplicativo, pero puede ser menor que bajo el estresor individual más fuerte (i.e., $<50\%$; zona donde coinciden B y C en Fig. 1-1). Así, un desarrollo entre el 30% y el 50% del óptimo indica un antagonismo multiplicativo más severo que el estresor individual más fuerte y los efectos están incrementados debido a la combinación de estresores.

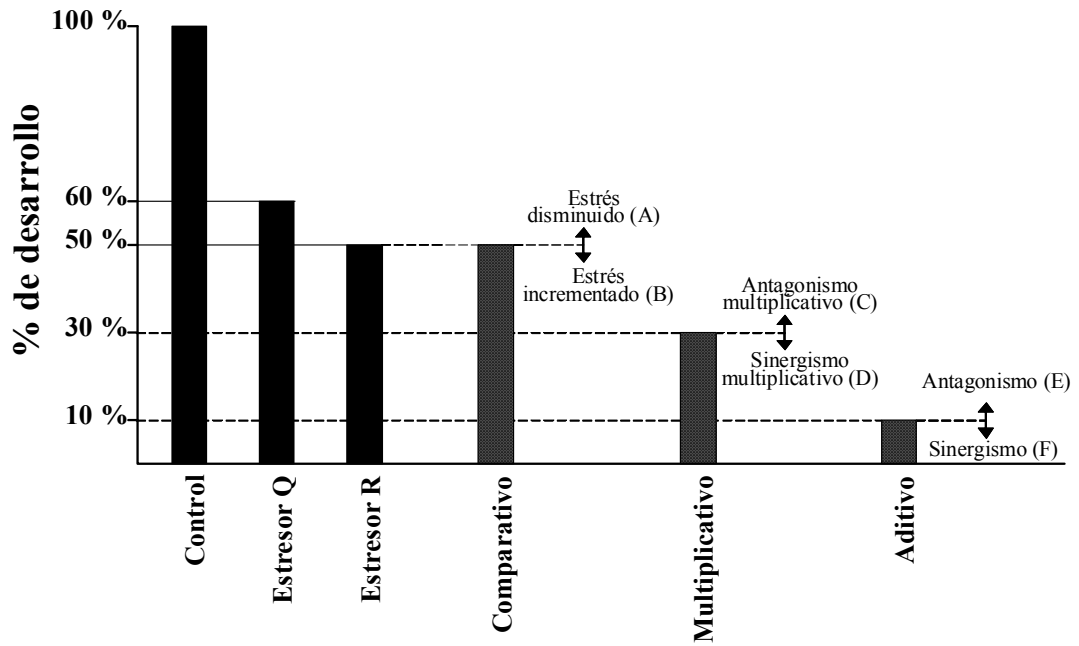


Figura 1-1. Modelo gráfico comparando efectos de múltiples estresores (barras verticales con textura) de acuerdo con tres modelos diferentes (modelo de efectos individuales comparativos, modelo de efectos multiplicativos y modelo de efectos aditivos) empleados para definir sinergismo y antagonismo. Las barras verticales indican el % del desarrollo que alcanzan los organismos. En color sólido se representa el desarrollo en condiciones óptimas (Control) y sometidos a un estresor Q y otro R de forma individual. Las zonas A y B están definidas por el modelo de efectos individuales comparativos. Las zonas C y D están definidas por el modelo de efectos multiplicativos. Las zonas E y F están definidas por el modelo de efectos aditivos. La zona F es la comprendida entre el 0% (ausencia de desarrollo) y el desarrollo alcanzado con efecto aditivo. Modelos y términos explicados en el texto.

El análisis ANOVA aplicado al estudio de la interacción de factores analiza el modelo aditivo y un resultado significativo del término interacción indica una desviación de los efectos aditivos esperados (Billick y Case 1994). Estas desviaciones tienen origen en procesos tales como interacciones multiplicativas o no lineales entre estresores.

Naturaleza de los efectos interactivos

El efecto de los estresores que actúan a través de mecanismos similares tiende a ser equivalente a la suma de los efectos individuales, generando efectos aditivos, mientras que los estresores que actúan mediante mecanismos diferentes, aunque dependientes, tienden a generar efectos no aditivos (Crain et al. 2008). Existe una alta probabilidad de que los estresores ejerzan efectos interactivos complejos no aditivos dada la ubicuidad de los *trade-offs* (respuestas compensatorias ecológicas) (Kneitel y Chase 2004), las tolerancias inducidas por el estrés (Blanck 2002), y las diferencias en la sensibilidad frente a los estresores entre los niveles tróficos (Vinebrooke et al. 2003, Petchey et al. 2004, Raffaelli 2004). Cuando en los organismos tienen lugar *trade-offs* frente a un conjunto de estresores normalmente se generan interacciones sinérgicas, por ejemplo cuando un organismo intenta contrarrestar o sacar ventaja de los efectos de un estresor determinado quedando más expuesto a los efectos de un segundo estresor. En cambio, la tolerancia de las especies inducida por el estrés genera interacciones antagónicas, puesto que el impacto acumulativo de los estresores en conjunto es menor que el esperado, es decir, que el impacto de un estresor determinado se atenúa en presencia de otro estresor (Folt et al. 1999, Christensen et al. 2006, Vinebrooke et al. 2004).

La predicción del tipo de interacción es compleja debido a la variedad de interacciones de orden superior (HOI: *high order interactions*; *sensu* Billick y Case 1994) que potencialmente pueden tener lugar:

- (i) Los estresores por sí mismos pueden interactuar, por lo que sus efectos cambian en presencia de estresores adicionales, por ejemplo, si las propiedades químicas de una toxina cambian a diferentes temperaturas.
- (ii) La respuesta de las especies a un estresor puede depender del contexto y por tanto ser modificada por estresores adicionales. Así, los sinergismos son más esperables con la presencia de un mayor número de estresores (ej., Przeslawski et al. 2005, Mora et al. 2007, Crain et al. 2008).
- (iii) El tipo de respuesta de las diferentes especies frente a un conjunto de estresores puede variar debido a tolerancias evolutivas o ecológicas, por

lo que esas respuestas dependerán de qué especies están presentes (Vinebrooke et al. 2004).

- (iv) La respuesta de la comunidad frente a un conjunto de estresores puede cambiar debido a interacciones cambiantes entre las especies presentes bajo diferentes escenarios de estrés, por ejemplo cuando las especies cambian desde interacciones competitivas a facilitativas bajo diferentes regímenes de salinidad (Crain et al. 2008).
- (v) Patrones temporales de actuación de los estresores (simultáneos vs. Consecutivos, frecuencia de actuación de los estresores, etc.), la intensidad del estresor (especialmente para respuestas no lineales), y qué variable respuesta es la que se mide (eg. Relyea y Hoverman 2006) también influyen en las estimas de los efectos acumulativos de estresores.

El nivel trófico puede ser clave para determinar el tipo de interacción, ya que los organismos con diferentes métodos de adquisición de energía, pueden responder de forma diferente a los estresores. Además, el efecto de los estresores tiende a ser mayor en los niveles tróficos superiores, debido a que su resiliencia disminuye como consecuencia de una menor diversidad taxonómica, fisiológica y genética (Crain et al. 2008).

El nivel de organización de la variable respuesta también es determinante en el efecto de los estresores. Así por ejemplo, a nivel individual son más esperables los sinergismos debido a que los organismos estresados son menos capaces de soportar un estrés adicional en comparación con individuos no estresados previamente (Myers 1995, Breitburg et al. 1998, Folt et al. 1999, Breitburg y Riedel 2005). La mayor parte de estudios de efectos interactivos se centran en una sola especie (Crain et al. 2008) pero, su utilidad para predecir la respuesta a nivel de comunidad o de ecosistema es limitada, sobre todo porque emergen aspectos como la interacción entre especies, resiliencia, redundancia funcional, historia ecológica o tipo de ecosistema (Vinebrooke et al. 2004). En concreto, la interacción entre especies, la resiliencia del ecosistema y la redundancia funcional tienden a atenuar el impacto de los estresores generando respuestas antagónicas (Crain et al. 2008), aunque existen otros factores que complican la predicción de la naturaleza de los efectos interactivos

resultantes como el tipo de ecosistema, la apertura del mismo, que puede influir en las dinámicas de recuperación tras perturbaciones, o la estocasticidad ambiental (Breitburg et al. 1998). Otras variables como la abundancia inicial, tasa de reproducción, magnitud del estresor o duración del experimento pueden ser responsables del tipo de interacción resultante. Por lo tanto existe un alto grado de incertidumbre para predecir los impactos acumulativos de estresores antropogénicos sobre los ecosistemas.

Desafortunadamente, nuestra comprensión de los efectos ecológicos del cambio global aún permanece limitada por la escasez tanto de estudios teóricos (Vinebrooke et al. 2004), como de evidencias experimentales que han sido obtenidas en estudios multifactoriales en ecosistemas terrestres (ej., Zavaleta et al. 2003, Hanson et al. 2005, Henry et al. 2005) y acuáticos (ej., Doyle et al. 2005, Persaud y Williamson 2005, Przeslawski et al. 2005). Dada la multiplicidad de estresores ambientales asociados con el cambio global, existe una gran demanda de estudios de interacción de estresores múltiples que permitan construir modelos realistas para predecir las respuestas de los ecosistemas frente a un ambiente cambiante.

Factores considerados en los estudios de efectos interactivos

Los factores considerados en estudios de efectos interactivos habitualmente están relacionados con estresores antropogénicos derivados generalmente del cambio global, que actúan tanto a escala local (fertilización), regional (sequía, acidificación) o global (temperatura, radiación UV). Los estresores analizados necesariamente dependen del tipo de ecosistema al que afectan. Así, en estudios sobre ecosistemas terrestres, ejemplos de combinaciones comunes de estresores son los propios de alteraciones sobre escalas locales como el incremento en la fertilización, la salinización o los contaminantes orgánicos sintéticos (Chapín et al. 1993). Sin embargo, otros trabajos más recientes incorporan el estudio de la interacción de estresores de escala global como el incremento en la concentración de CO₂, el incremento en la temperatura o la variación del régimen de precipitaciones (Hanson et al. 2005, Henry et al. 2005).

En ecosistemas acuáticos, estresores analizados en estudios de efectos interactivos, sobre una escala local, son metales tóxicos en lugares afectados por una fuerte contaminación de origen industrial (Riedel et al. 2003, Kashian et al. 2007), la fluctuación de la salinidad en zonas marinas costeras (Lenihan et al. 1999, Przeslawski et al. 2005), la concentración de carbono orgánico disuelto (Christensen et al. 2006, Frost et al. 2007) o la eutrofización con nutrientes inorgánicos (ej., Bintz et al. 2003, Boone et al. 2007, Ventura et al. 2008). Mientras, estresores propios de una escala global que han sido estudiados en este tipo de trabajos son la acidificación como consecuencia de la actividad industrial que provoca lluvia ácida (Horne y Dunson 1995, Christensen et al. 2006), el incremento de la temperatura simulando escenarios de calentamiento global (ej., Nougquier et al. 2007, Ventura et al. 2008) o la radiación UV (ej., Medina-Sánchez et al. 2006, Persaud y Williamson 2005, Xenopoulos y Frost 2003).

Factores de cambio global importantes en lagos de alta montaña de la región mediterránea

Concretamente, uno de los factores que ha recibido una especial atención en los estudios de interacción de estresores ha sido la radiación UV (UVR) (Tabla 1-1). Su interés radica en que sus flujos están incrementando debido a la disminución del espesor de la capa de ozono estratosférico, siendo un factor principal del cambio global (Perin y Lean 2004, Häder et al. 2007). Aunque la radiación UV supone menos del 5% del total de la radiación solar que alcanza la superficie de la Tierra, contiene longitudes de onda que son más energéticas que la radiación fotosintéticamente activa (PAR; 400-700 nm) y son también las más dañinas para los organismos (Diffey 2002). Dentro de la UVR se distingue la UVR-A (320-400 nm), cuyos flujos llegan a la superficie terrestre con una intensidad entre 20 y 50 veces mayor que la UVR-B (290-320 nm), debido a que la mayor parte atraviesa la capa de ozono independientemente de la concentración de ozono estratosférico. Sin embargo, la radiación UVR-B es absorbida en su mayor parte por la capa de ozono y en condiciones normales, sólo entre el 1-10% de la UVR-B alcanza la superficie terrestre, lo cual es suficiente para producir alteraciones en el ADN, proteínas y otras

moléculas relevantes de los organismos (Perin y Lean 2004). Desde el comienzo de los años 1980, la UVR ha incrementado entre un 6-14% en áreas localizadas en latitudes medias y altas tanto del hemisferio Norte como del Sur (Crutzen 1992, Madronich et al. 1998, Perin y Lean 2004). Además, la intensidad de UVR-B incrementa aproximadamente un 20% por cada 1000 m de elevación (Blumthaler et al. 1992). Por otra parte, la materia orgánica disuelta en los ecosistemas acuáticos usualmente disminuye a lo largo de un gradiente altitudinal (Laurion et al. 2000), por lo que la penetración de UVR en la columna de agua es mayor (Morris et al. 1995). Además, los ecosistemas acuáticos de alta montaña tienen una estructura biológica muy simple (Echevarría et al. 1990, Straškravobá et al. 1999a), lo que acentúa el potencial efecto negativo de UVR sobre el conjunto de la comunidad biológica. Por tanto los lagos de alta montaña son considerados sensores de cambio global.

En general el efecto de la radiación UV puede acentuarse ante la presencia de otros factores como por ejemplo un descenso de la temperatura (ej., Doyle et al. 2005, Nougulier et al. 2007, Gao et al. 2008) o la entrada de nutrientes inorgánicos (ej., Xenopoulos y Frost 2003, Huovinen et al. 2006, Marcoval et al. 2007, Medina-Sánchez et al. 2006). Este último factor es especialmente relevante en los lagos de alta montaña como los de Sierra Nevada, que son ecosistemas crónicamente pobres en nutrientes, fundamentalmente en P ($DIN/TP > 40$, Carrillo et al. 1996, Morales-Baquero et al. 1999, 2006).

Una importante vía de entrada natural de nutrientes a los ecosistemas acuáticos la constituye los aerosoles de polvo procedente de los desiertos, ya que contienen altas concentraciones de macro (P) (Prospero y Lamb 2003) y micronutrientes (Fe, Ca) (Jickells et al. 2005, Pulido-Villena et al. 2006). Los aerosoles procedentes del desierto de Sahara son transportados por vientos predominantemente del oeste hacia el océano Atlántico. En la región mediterránea, las máximas cargas tienen lugar durante primavera y verano (Moulin et al. 1997, Morales-Baquero et al. 2006). En la actualidad hay un considerable interés por los efectos de esta deposición de polvo atmosférico sobre la biogeoquímica del mar Mediterráneo (Guerzoni et al. 1999, Herut et al. 1999, 2002) y, en particular, sobre la disponibilidad de P transportado por aerosoles para los productores primarios

(Mignon y Sandroni 1999, Ridame y Guieu 2002, Markani et al. 2003). El efecto de tales entradas atmosféricas es particularmente significativo en aguas oligotróficas (Carrillo et al. 1990, Bergametti et al. 1992, Villar-Argaiz et al. 2001, Duarte et al. 2006), como ya había reconocido en los años 70 (Peters 1977).

Sierra Nevada (España) está localizada en un área donde la deposición de polvo atmosférico ha sido escasamente estudiada en comparación con el resto de la región Mediterránea. Este área es un lugar ideal para analizar la respuesta biogeoquímica de los lagos frente a la deposición de polvo porque (i) está próxima al desierto del Sahara (el 70% del transporte de polvo se deposita dentro de los primeros 2000 km; Jaenicke y Schütz 1978); (ii) tiene altitudes por encima de 3000 m sobre el nivel del mar y el principal transporte de polvo sahariano se produce entre 1500 y 4000 m de altitud (Talbot et al. 1986) y (iii) constituye la primera barrera natural para el transporte de polvo atmosférico en el continente europeo.

Escalas de estudio

La escala temporal en los estudios de interacción de factores es un aspecto fundamental a tener en cuenta al realizar el diseño experimental, puesto que la naturaleza de la interacción puede cambiar a lo largo del tiempo de experimentación (Darling y Côté 2008). Por ejemplo, la interacción UVR \times nutrientes puede generar una progresiva implantación de un antagonismo a medida que se desarrollan mecanismos de adaptación frente a UVR favorecidos por los nutrientes (Marcoval et al. 2007).

Es importante que la escala temporal se adecue a los tiempos de respuesta de los diferentes organismos frente a los estresores ensayados. En este sentido, las escalas suelen ser mayores (años) en los estudios sobre ecosistemas terrestres (ej., Zavaleta et al. 2003, Hanson et al. 2005, Henry et al. 2005) que sobre ecosistemas acuáticos, donde los procesos transcurren a mayor velocidad debido a los cortos tiempo de generación de los organismos que los habitan por ello los periodos de

experimentación son generalmente inferiores a un año (ej., Folt et al. 1999, Doyle et al. 2005, Nouguiet et al. 2007).

Tradicionalmente, el análisis de los efectos combinados de la radiación UV y de los nutrientes sobre la comunidad pelágica en ecosistemas naturales se ha realizado sobre escalas temporales cortas (horas; Pausz y Herndl 2002, Medina-Sánchez et al. 2006) o medias (días, semanas; Bergeron y Vincent 1999, Xenopoulos et al. 2002, Doyle et al. 2005). Sin embargo, no existen estudios que analicen el efecto combinado de estos dos factores sobre una escala temporal larga (meses).

A partir de esta información se pone de manifiesto la necesidad de realizar aproximaciones experimentales a largo plazo con objeto de (i) evidenciar posibles modificaciones de los efectos interactivos sobre los organismos influidas por el tiempo de incubación y, (ii) la interacción entre niveles tróficos

Idoneidad del uso de mesocosmos para experimentación

Gran parte del conocimiento de los efectos de la UVR sobre determinados organismos y procesos fisiológicos en los ambientes acuáticos se ha adquirido a partir de experimentos de laboratorio, en los que se alcanza un alto grado de control del sistema (Belzile et al. 2006 y referencias dentro), pero donde las interacciones ecológicas complejas resultan difíciles de reproducir (Behrenfeld et al. 1994, Litchman et al. 2002, MacFadyen et al. 2004, Shelly et al. 2005). También han contribuido al conocimiento de los impactos de la UVR, los estudios experimentales *in situ* en ecosistemas naturales, tales como sistemas pelágicos. Sin embargo, estos frecuentemente no presentan las condiciones más idóneas para probar hipótesis, puesto que en estos ambientes altamente dinámicos, influyen múltiples estresores y junto con las interacciones tróficas complejas pueden desdibujar la señal asociada al impacto de los estresores que son objeto de estudio. A causa de la posibilidad de conseguir un buen balance entre control, realismo y generalidad (Kemp et al. 2001, Petersen et al. 2003), se enfatiza el uso de mesocosmos para el estudio del impacto de la radiación UV, así como de otros estresores, sobre las comunidades

planctónicas, permitiendo obtener información útil como por ejemplo para conocer la respuesta de los ecosistemas al cambio global o para diseñar planes de conservación de reservas naturales (Benton et al. 2008).

Los mesocosmos, definidos como grandes encerramientos, generalmente con volúmenes superiores a 1 m³, han demostrado ser unas herramientas útiles para el estudio de la estructura y la función de los ecosistemas acuáticos y han proporcionado nuevas percepciones sobre el impacto de los cambios ambientales en ecosistemas marinos y de agua dulce. De forma semejante a otras aproximaciones experimentales, el análisis con mesocosmos tiene sus limitaciones, siendo los problemas de escala espacial los más importantes (Carpenter 1996). Sin embargo, estos encerramientos permiten experimentos controlados para el estudio de procesos al nivel de comunidad que de otro modo son difíciles o imposibles de investigar en laboratorio o *in situ* (Grice y Reeve 1982, Huston 1999).

Cuando se emplean mesocosmos transparentes inmersos en el agua, la atenuación de la irradiancia debe ser similar a la del ambiente natural de manera que se mantengan semejantes propiedades óptica dentro y fuera del encerramiento. Efectos de sombreado ocasionados por estructuras que rodeen los mesocosmos deberían ser minimizados (Belzile et al. 1998). La atenuación adicional ocasionada por los efectos de sombreado y por el propio material del mesocosmos es importante porque, por ejemplo, disminuye la cantidad de radiación UV integrada en la columna de agua hasta un nivel menor del que podría ocurrir en el ambiente natural. Esto podría explicar parcialmente por qué algunos incrementos relativamente elevados del flujo de radiación UV tienen escaso impacto sobre el plancton encerrado en mesocosmos (Belzile et al. 2006).

Además, en el diseño de los mesocosmos debe permitir el desplazamiento vertical de los organismos, de forma que se logre mimetizar las condiciones naturales de la columna de agua del ecosistema estudiado (Villafañe et al. 2007). Esto es de especial relevancia puesto que los efectos de la exposición a la radiación solar son una función directa de la posición y el tiempo de residencia de los organismos dentro de la zona fotoactiva, donde la radiación UV usualmente juega un importante papel, siendo considerada esta zona como la comprendida entre la superficie y la

profundidad alcanzada por el 10% de la UVR medida en superficie (Neale et al. 2003).

A raíz de esta información, ante el objetivo de estudiar el efecto de un estresor determinado en combinación con la radiación UV, surge la conveniencia de llevar a cabo aproximaciones experimentales sobre una escala temporal larga (meses), usando mesocosmos con un volumen suficiente como para permitir las interacciones complejas entre los diferentes niveles tróficos y una profundidad que refleje las condiciones del sistema.

El bucle microbiano como centro de atención

Los estudios de efectos interactivos de dos o más estresores sobre organismos de ecosistemas acuáticos, analizan generalmente un solo eslabón trófico, predominando los que consideran los productores primarios tanto en cultivos de laboratorio (ej., Behrenfeld et al. 1994, Gao et al. 2008, Lotze y Worm 2002) como *in situ* en ecosistemas naturales (ej., Petersen et al. 1997, Bintz et al. 2003, Ventura et al. 2008). Son menos frecuentes los que analizan los efectos interactivos sobre el zooplancton herbívoro (Folt et al. 1999, MacFadyen et al. 2004, Persaud y Williamson 2005, Williamson et al. 2002), bacterias (Pausz y Herndl 2002, Hall y Cotner 2007) o ciliados (Sanders et al. 2005) y muy escasos aquellos que incluyen dos eslabones tróficos como fitoplancton y bacterias (Bergeron y Vincent 1999, Medina-Sánchez et al. 2006), fitoplancton y zooplancton (Christensen et al. 2006). Igualmente son escasos los que incorporan al conjunto de la red trófica microbiana (Breitburg et al. 1999, Elser et al. 2003), aunque en ningún han incluido niveles tróficos parásitos como los virus. Particularmente, los estudios de interacción UVR × nutrientes con un mayor número de eslabones tróficos incorporan sólo bacterias y fitoplancton (Bergeron y Vincent 1999, Medina-Sánchez et al. 2006). **Por lo tanto existe una completa ausencia de trabajos que evidencien el efecto interactivo UVR × Nutrientes sobre el conjunto de la red trófica pelágica.**

La red trófica microbiana está compuesta por pico- y nanoplancton autótrofo y otros eslabones heterotróficos como virus, bacterias, nanoflagelados heterotróficos (HNF) y ciliados (Pomeroy 1974, Azam et al. 1983). Ésta es una red paralela a la cadena de pastoreo (fitoplancton y zooplancton) y converge en ella a través del consumo (i) de bacterias, HNF y ciliados por parte del zooplancton, o (ii) de bacterias por parte de algas mixótrofas que producen un cortocircuito en el bucle y incrementa la eficiencia en el flujo del carbono (Medina-Sánchez et al. 2004). Como consecuencia del desarrollo del concepto de bucle microbiano, se ha discutido la relevancia de estos organismos en los ecosistemas acuáticos con especial énfasis sobre su contribución en el reciclado de nutrientes, su papel como vínculos hacia niveles tróficos superiores (Cotner y Biddanda 2002 y sus referencias) o como disipadores de energía (Ducklow et al. 1986, del Giorgio et al. 1997).

Es conocido que las bacterias, y el bucle microbiano heterotrófico por extensión, presentan su mayor contribución a la biomasa nanoplanctónica en los ecosistemas oligotróficos (Cho y Azam 1988, Ducklow y Carlson 1992, Legendre y Rassoulzadegan 1995, Gasol et al. 1997, Cotner 2000, Biddanda et al. 2001). Ante este tipo de evidencias se propuso que la estructura biológica y el funcionamiento de las redes tróficas en los ecosistemas acuáticos dependían del balance entre la energía (luz) y la concentración de nutrientes limitantes, que regulan la composición elemental de los organismos autótrofos (razón carbono:nitrógeno:fósforo, C:N:P), con consecuencias sobre todos los eslabones de la red trófica y las interacciones entre los mismos (Hipótesis Luz-Nutrientes, HLN; Sterner et al. 1997). La HLN ha sido testada y corroborada parcialmente en estudios posteriores donde se ha controlado la cantidad de radiación solar incidente (ej., Chrzanowski et al. 2001, Frost y Elser 2002, Elser et al. 2003, Urabe et al. 2002). Sin embargo, la calidad de la luz (razón UVR:PAR) puede jugar un papel importante, puesto que juega un papel adicional en la alteración de la composición elemental de los productores primarios (Xenopoulos et al. 2002) con implicaciones para la cadena de pastoreo y la red trófica microbiana.

A partir de la información expuesta se justifica la realización de una aproximación experimental en la que: (i) se analicen los efectos interactivos de la radiación UV y de las entradas de nutrientes limitantes (mimetizando entradas

naturales de polvo atmosférico) sobre la estructura y el funcionamiento del bucle microbiano en ecosistemas potencialmente sensibles a ambos factores de estrés; (ii) se utilicen encerramientos que reflejen las características ópticas del ecosistema y permitan la migración vertical de los organismos y (iii) se incluya en el diseño una escala temporal larga donde se pueda analizar la propagación de los efectos interactivos sobre distintos niveles de organización de las comunidades..

¿Qué preguntas quedan abiertas? Objetivos de la Tesis

¿Cuáles son las respuestas estructurales y funcionales, sobre una escala temporal media-larga, de los productores primarios y del bucle microbiano heterotrófico frente a la exposición a la radiación UV, las entradas de pulsos de nutrientes limitantes y la interacción de ambos factores?

¿Existe relación entre las respuestas a nivel estructural (composición elemental [C:N:P], composición taxonómica, abundancia de especies, biomasa) de distintos grupos funcionales y las respuestas a nivel funcional (producción, productividad, tasa de crecimiento)?

¿Cómo interactúan los cambios en la exposición a la radiación UV y el enriquecimiento en nutrientes sobre el flujo de C, N y P entre productores primarios y bucle microbiano heterotrófico? ¿Qué patrones generales se pueden establecer?

Tabla 1-1. Revisión de estudios sobre efectos combinados de múltiples factores.

Referencia	Uso de mesocosmos	Ecosistema	Escala temporal	Niveles tróficos estudiados	Factores ensayados
Hanson et al. 2005	—	Bosque	6 años	Árboles	CO ₂ Agua Temperatura Ozono
Henry et al. 2005	—	Pradera	6 años	Plantas	CO ₂ Temperatura Nutrientes
Luo et al. 2008	—	Bosque Pradera	14 años	Plantas	Agua Temperatura
Tilman y Downing 1994	—	Matarral Pradera	11 años	Plantas	Agua Estacionalidad hídrica Nutrientes Sequía
Zavaleta et al. 2003	—	Pradera	3 años	Plantas	CO ₂ Nutrientes
Behrenfeld et al. 1994	—	Cultivo	6 días	Algas	UVR Nutrientes
Dickman et al. 2006	—	Cultivo	2 días	Algas	Luz Nutrientes
Folt et al. 1999	—	Cultivo	7 días	Zooplancton	Nutrientes Temperatura Toxinas
Gao et al. 2008	—	Cultivo	<1 días	Algas	Alimento Temperatura UVR
Hall y Cotner 2007	—	Cultivo	8 días	Bacterias	Temperatura Nutrientes
Heraud et al. 2005	—	Cultivo	55 días	Algas	UVR Nutrientes (P)
Shelly et al. 2005	—	Cultivo	151 días	Anfibios Mosquitos Algas	pH Metales DOC
Horne y Dunson 1995	Sí	Cultivo	151 días		

Referencia	Uso de mesocosmos	Ecosistema	Escala temporal	Niveles tróficos estudiados	Factores ensayados
Huovinen et al. 2006	—	Cultivo	3 + 10 días	Macroalgas	UVR Nutrientes (N) Temperatura Pesticidas
Jacobson et al. 2007	—	Cultivo	63 días	Anfipodos	UVR Nutrientes (N) UVR
Korbee-Peinado et al. 2004	—	Cultivo	6 días	Algas	UVR Nutrientes (N) UVR
Litchman et al. 2002	—	Cultivo	7 días	Algas	UVR Nutrientes (N) UVR
Lotze y Worm 2002	—	Cultivo	28 días	Macroalgas	UVR Temperatura Nutrientes Depredación UVR Nutrientes
Marcoval et al. 2007	—	Cultivo	6-8 días	Algas	UVR
MacFadyen et al. 2004	—	—	5, 10, 20 días	Zooplancton	Temperatura UVR
Sanders et al. 2005	—	Cultivo	4 días	Ciliados	Temperatura UVR
Sobrinho y Neale 2007	—	Cultivo	7 días	Algas	Temperatura UVR
Villafañe 2004	—	Cultivo	14 días	Algas	Temperatura UVR
Williamson et al. 2002	—	Cultivo	10 días	Zooplancton	Nutrientes (N) UVR
Przeslawski et al. 2005	—	Mar	3 días	Gasterópodos	Temperatura UVR
Lenihan et al. 1999	—	Mar	210 días	Ostras	Temperatura Salinidad Velocidad del agua Temperatura Salinidad
Nouguier et al. 2007	Sí	Mar	13 días	Nutrientes (NH ₄ ⁺)	Oxígeno UVR
Pausz y Herndl 2002	—	Mar	<1 días	Bacterias	Temperatura UVR Nutrientes

Referencia	Uso de mesocosmos	Ecosistema	Escala temporal	Niveles tróficos estudiados	Factores ensayados
Breitburg et al. 1999	Sí	Estuario	28 días	Bacterias Algas HNF's Zooplankton Peccs Zoobentos	Nutrientes Oligoelementos
Petersen et al. 1997	Sí	Estuario	29, 46, 51 días	Algas	Nutrientes Encerramiento
Riedel et al. 2003	Sí	Río	28 días	Algas	Nutrientes Elementos tóxicos
Kashian et al. 2007	—	Arroyo	10 días	Macroinvertebrados	UVR Metales
Frost et al. 2007	—	Arroyo	30 días	Perifiton	DOM UVR
Bergeron y Vincent 1999	—	Lago	6-9 días	Bacterias Algas	UVR Nutrientes
Bintz et al. 2003	Sí	Lago	119 días	Algas	Temperatura Nutrientes
Boone et al. 2007	Sí	Lago	83 días	Anfibios	Insecticidas Eutrofización
Doyle et al. 2005	—	Lago	7 días	Fitoplankton	UVR Nutrientes Temperatura
Elser et al. 2003 Urabe et al. 2002	Sí	Lago	26 días	Zooplankton Algas HNF's	Luz Nutrientes
Medina-Sánchez et al. 2006	—	Lago	<1 día	Bacterias Algas	UVR Nutrientes
Christensen et al. 2006	Sí	Lago	10, 30, 50 días	Bacterias Algas Zooplankton	Temperatura DOC Acidificación
Frost y Elser 2002	—	Lago	42 días	Epliton	Luz Nutrientes

Referencia	Uso de mesocosmos	Ecosistema	Escala temporal	Niveles tróficos estudiados	Factores ensayados
Persaud y Williamson 2005	—	Lago	7 días	Zooplancton	UVR Temperatura
Ventura et al. 2008	Sí	Lago	>1 año	Algas Macroinvertebrados	Temperatura Nutrientes
Xenopoulos et al. 2002	—	Lago	3 días	Algas	UVR Nutrientes
Xenopoulos y Frost 2003					

2

Material y métodos

Ecosistema estudiado

La Caldera es un lago oligotrófico remoto de alta montaña, localizado en Sierra Nevada (Sur de España, 36°55'–37°15'N, 2°31'–3°40'W) en un circo glaciar a una altitud de 3050 m, por encima de la línea de árboles, con sustrato rocoso de naturaleza silíceo. El lago, que normalmente está cubierto de hielo desde Noviembre hasta mediados de Julio, tiene un área superficial de aproximadamente 20.000 m² y una profundidad máxima muy variable (2,5-14 m), dependiendo del régimen anual de precipitaciones. En el periodo estudiado osciló desde 12 m hasta 7 m al final de la estación libre de hielo. La cuenca de drenaje es muy pequeña, siendo la razón entre la superficie de la cuenca de drenaje y la superficie del lago de 7,3 en el periodo 1996-97 (Villar- Argaiz et al. 2001). Carece de entradas o salidas de agua visibles, así como de vegetación litoral y macrófitos, por lo que las entradas de carbono orgánico son muy reducidas.



Por su localización, el lago está expuesto a una intensidad considerable de radiación ultravioleta (Carrillo et al. 2002), que penetra profundamente en la columna de agua, dada la gran transparencia de sus aguas (profundidad de disco de Secchi alcanza y >10% de la radiación fotosintéticamente activa [PAR, 400–700 nm] penetra hasta la máxima profundidad). Los valores de clorofila son inferiores a 2 µg L⁻¹. Tiene un baja concentración de carbono orgánico disuelto (DOC, < 1 mg L⁻¹), en su mayor parte de origen autóctono (Reche et al. 2001). La concentración de fósforo total es usualmente <10 µg L⁻¹ y, durante 2003 la razón (peso:peso) nitrógeno inorgánico disuelto:fósforo total (DIN:PT) fue mayor de 100, por lo que la comunidad algal estuvo fuertemente limitada por P (Morris y Lewis 1988), rasgo característico de este ecosistema (Carrillo et al. 1996; Medina-Sánchez et al. 1999;

Villar-Argaiz et al. 2001). No obstante, debido a la proximidad del continente africano, este ecosistema experimenta esporádicas entradas de polvo atmosférico de origen sahariano con alto contenido en P, con una razón molar NT:PT promedio en la deposición total de polvo comprendida entre 10 y 50 (Morales-Baquero et al. 2006).

La comunidad pelágica es relativamente simple, con total ausencia de peces (Carrillo et al. 1996; Reche et al. 1996; Medina-Sánchez et al. 1999; Villar-Argaiz et al. 2001, 2002), sin solapamiento de tamaños entre los distintos niveles tróficos (Echevarría et al. 1990), por lo que se pueden separar fácilmente mediante filtración serial. Un rasgo característico de la estructura pelágica es la ausencia de picoplancton autótrofo $<2 \mu\text{m}$ (Carrillo et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2002, 2004, Carrillo et al. 2006).

Aproximación experimental

La aproximación experimental realizada *in situ* desde el 1 de agosto hasta el 10 de octubre de 2003 consistió en un diseño factorial 2×5 no replicado (Fig. 2-2), con dos tratamientos de luz, incluyendo luz completa (+UVR) y exclusión de radiación ultravioleta (-UVR), y cinco tratamientos de nutrientes, que simulan un gradiente natural de entradas P asociado a deposición de polvo atmosférico de origen sahariano. Los diez tratamientos se construyeron mediante diez mesocosmos, cada uno consistente en un tubo de 1 m de diámetro y 7 m de profundidad (volumen de 2700 litros) anudado y fijado a un peso en la base, con objeto de mantener la verticalidad de los mismos. El material utilizado fue polietileno, que transmite la mayor parte del espectro de radiación solar (transmitancia comprendida entre el ~60% a 280 nm y >80% a 700 nm de longitud de onda, Fig. 2-3A). En la parte superior de cada mesocosmos se colocaron dos flotadores, de forma que la abertura quedaba 20 cm por encima de la superficie del lago, evitando así entradas incontroladas de agua a los encerramientos. Los encerramientos se llenaron bombeando agua del lago sin filtrar tomada a una profundidad de dos metros, dentro de la capa fótica que recibe >5% de UVB. Los diez encerramientos se separaron en dos conjuntos (cinco para +UVR y cinco para -UVR) mediante dos plataformas de 3

× 3 m² construidas con tubo de cloruro de polivinilo (PVC) de 3 cm de diámetro. Los dos conjuntos se colocaron con más de 50 m de distancia entre sí para evitar el sombreado entre ellos. A cada una de las dos plataformas se le fijó un conjunto de boyas para mantener la flotación y se anclaron al fondo del lago mediante una cuerda.

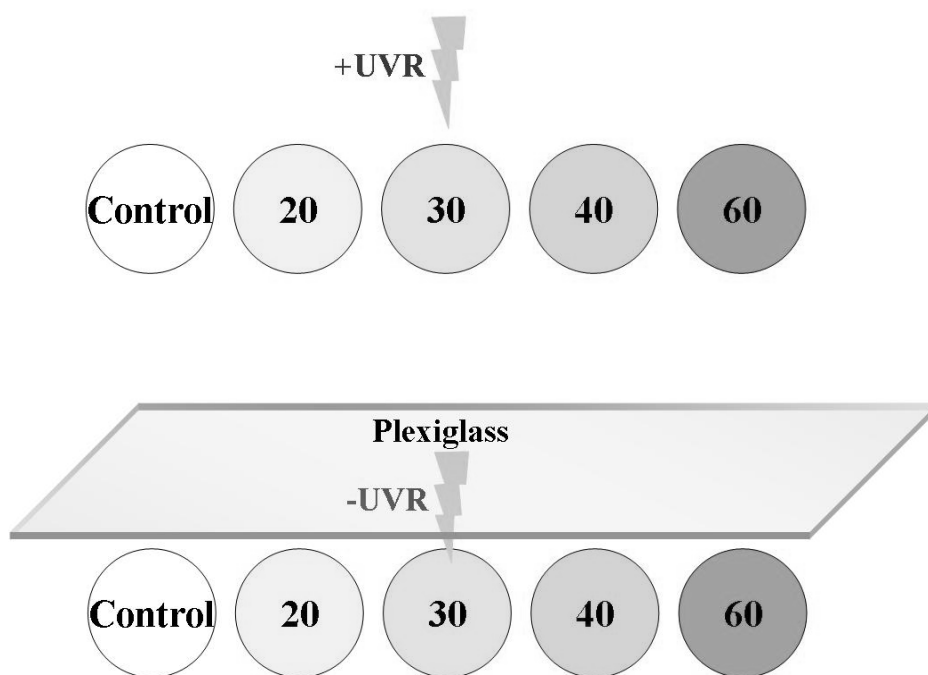


Figura 2-2. Diseño experimental: Cinco niveles de enriquecimiento con nutrientes (unidades en $\mu\text{g P l}^{-1}$) y dos tratamientos de radiación solar (+UVR: arriba, -UVR: abajo).

El tratamiento -UVR se obtuvo usando una cubierta de Plexiglás UF3, material plástico que transmite ~90% de PAR y bloquea la UVR (<390 nm) (Fig. 2-3B). Además, se colocaron láminas de plexiglás de 1 m de longitud rodeando la plataforma que agrupaba a los cinco mesocosmos -UVR, así como en el espacio no ocupado por los encerramientos en el interior de la plataforma. De esta forma se aumentaba la protección frente a la UVR evitando su incidencia como consecuencia de la refracción de la radiación solar en esa zona. Los tratamientos +UVR se

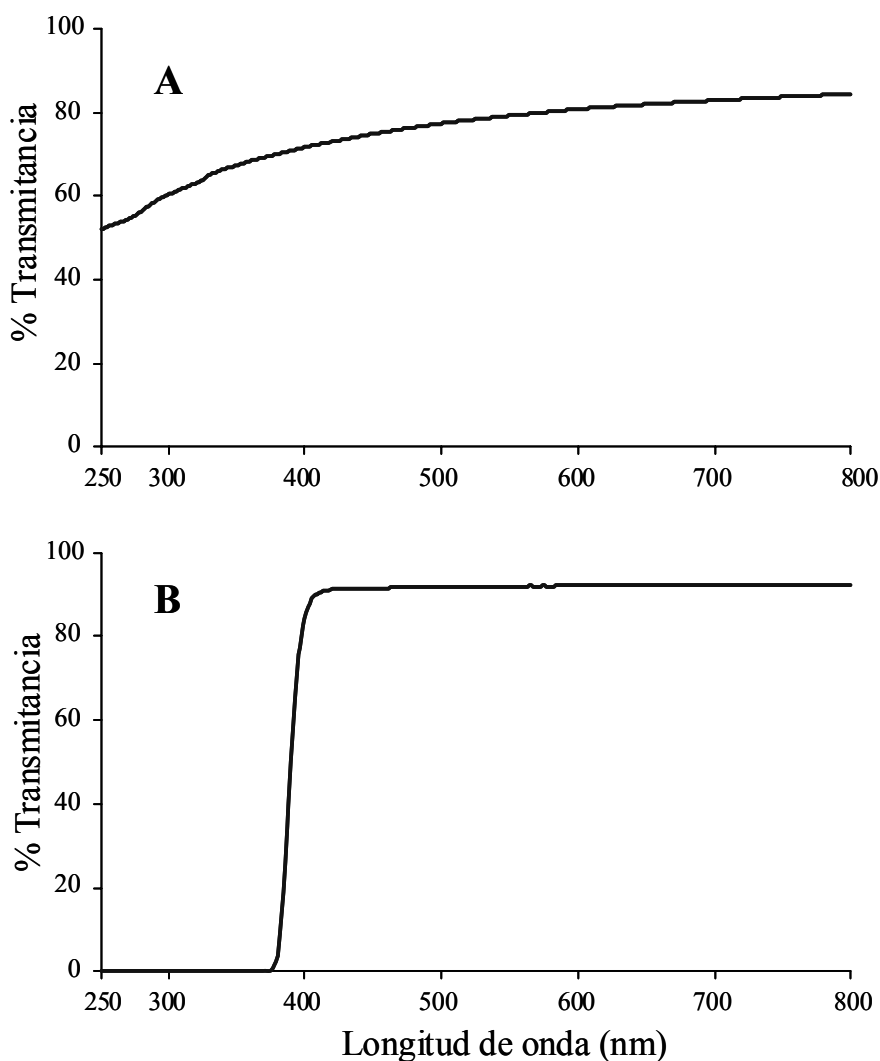


Figura 2-3. Porcentaje de transmitancia del polietileno (A) empleado en la construcción de los mesocosmos y del plexiglás (B) usado para excluir la radiación UV (< 400 nm).

cubrieron con tapaderas fabricadas con polietileno para evitar entradas de P atmosférico incontroladas al interior de los mesocosmos.

Los cinco niveles de enriquecimiento en P se obtuvieron mediante la adición de NaH_2PO_4 (en un único pulso al comienzo del periodo experimental) a una concentración final de 0, 20, 30, 40 y $60 \mu\text{g P L}^{-1}$. Los encerramientos sin adición de

P se usaron como controles. Para asegurar que el P permaneciese como nutriente limitante en los encerramientos, se añadió además N inorgánico (como NH_4NO_3) hasta alcanzar una razón N:P molar de 30, por lo tanto reflejando el valor promedio de la razón NT:PT encontrada en la deposición de polvo atmosférico (Morales-Baquero et al. 2006). La cantidad de P y N añadida se calculó a partir de la concentración de P disuelto total encontrada en la columna de agua el día anterior del comienzo del experimento.

Este diseño experimental permitió una evaluación razonable del efecto interactivo UVR \times P sobre la comunidad pelágica, porque el gradiente de nutrientes se correspondió con los niveles naturales de deposición de P atmosférico medidos en este ecosistema (Villar-Argaiz et al. 2001, Morales-Baquero et al. 2006), y los tratamientos +UVR reprodujeron las condiciones ópticas naturales de la columna de agua

Tras el pulso de P, el agua de los mesocosmos se agitó vigorosamente mediante repetidos movimientos verticales de un recipiente de plástico agujereado, lastrado y controlado con una cuerda. A continuación se tomaron muestras de varios mesocosmos elegidos al azar para controlar las condiciones iniciales del experimento. La periodicidad de muestreo se adecuó a los tiempos de generación de los diferentes grupos de organismos estudiados (desde bacterias a zooplancton). Así, con una periodicidad gradualmente mayor, se tomaron muestras los días 1, 3, 11, 20, 32, 43, 56 y 71 del periodo de incubación.

Aproximación observacional

Con objeto de enmarcar y extrapolar los resultados experimentales a las condiciones del medio, se llevó a cabo un seguimiento estacional del lago a lo largo de toda la estación libre de hielo de 2003, con medición de todas las variables estructurales y funcionales descritas a continuación.

Variables estructurales

Mediciones in situ

Durante cada día de muestreo, y coincidiendo con la máxima verticalidad del sol, se midieron los perfiles verticales de atenuación (i) del espectro completo de la radiación solar (300 y 700 nm) en la columna de agua usando un espectrorradiómetro “LI-8000 spectroradiometer” (LI-COR, Lincoln, NE); y (ii) del espectro de radiación fotosintéticamente activa (PAR, 400-700) en el interior de los mesocosmos, usando un contador esférico de fotones “LiCor LI 193SA” (LI-COR, Lincoln, NE).

Los coeficientes de atenuación difusa de la radiación incidente (K_d) se determinaron calculando la pendiente de la regresión lineal entre los logaritmos naturales de la radiación incidente con la profundidad para cada rango de longitudes de onda.

Además se midieron los perfiles verticales de temperatura (T), pH, concentración de oxígeno (%O₂) y potencial de oxidación-reducción (red-ox) tanto del lago como de los mesocosmos, usando una sonda multiparamétrica (Turo Water Quality Analysis T-611).

Toma de muestras

Las muestras de agua para cuantificar las variables de la estructura química y biológica de los mesocosmos se tomaron por triplicado, previa agitación y homogeneización de la columna de agua. Las muestras del lago se tomaron por triplicado a partir de la mezcla de agua procedente de distintas profundidades, que fue obtenida usando una botella Van Dorn horizontal de 6 L de capacidad. De estas muestras se tomaron las siguientes alícuotas:

- 50 ml recogidos en botes de vidrio Pyrex[®] para el análisis del fósforo total (PT) y nitrógeno total (NT);

- Un volumen mínimo de 900 ml en botellas de PET para la determinación de clorofila *a* sobre filtros de 0,7 μm de tamaño de poro (GF/F, Whatman[®]);
- 900 ml en botellas de PET para el análisis de la composición elemental de fitoplancton y bacterias;
- 130 ml de agua fijada con Lugol alcalino (aprox. 2% v/v de concentración final) para la cuantificación de fitoplancton y nanoflagelados heterotróficos;
- 20 ml en botes esterilizados (tipo penicilina), fijadas con formaldehído neutralizado y filtrado por 0,2 μm (concentración final 2%), para la cuantificación del bacterioplancton;
- 20 ml de agua fijados con paraformaldehído (1% c.f.) y paraformaldehído (0,6 c.f.) y congelados (-20 °C), para la cuantificación de partículas virales;
- 1000 ml de agua fijada con Lugol (aprox. 1% v/v de concentración final) para la cuantificación de ciliados;
- A partir del agua filtrada por 0,7 μm , se tomaron sendas alícuotas de 50ml para los análisis de fósforo disuelto total (PDT), nitrógeno disuelto total (NDT), fósforo reactivo soluble (SRP), nitratos (NO_3^-) y alcalinidad.

Análisis en laboratorio

Determinación de compuestos de fósforo

El fósforo reactivo soluble (SRP) se analizó siguiendo el método de Murphy y Riley (1962). El ión fosfato reacciona con molibdato amónico en medio ácido y produce ácido fosfomolibdico que a continuación se reduce con ácido ascórbico a azul de molibdeno, cuya coloración es azul y se mide espectrofotométricamente a 885 nm de longitud de onda. En el método se incluyó la adición de tartrato de antimonio y potasio para evitar la interferencia potencial de otros aniones,

especialmente los silicatos (APHA 1992). Las muestras se midieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40 conectado a un ordenador equipado con el software UV-WINLAB y se usaron cubetas de cuarzo de 10 cm para aumentar la sensibilidad. El límite de detección de este método es de $0,9 \mu\text{g P L}^{-1}$.

El fósforo total (PT) y fósforo disuelto total (PDT) se determinaron espectrofotométricamente previa oxidación con una mezcla oxidante (persulfato potásico, ácido bórico e hidróxido sódico) en autoclave (a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm y 30 minutos). Tras la oxidación se procedía a la reducción de la muestra con una mezcla reductora (ácido ascórbico) y posteriormente se adicionaba una mezcla de reactivos incluyendo molibdato amónico. De forma similar al método anterior, se produce un color azul. La lectura se realizó a 882 nm en cubetas de 10 cm (APHA 1992). El límite de detección de este método es de $1 \mu\text{g P L}^{-1}$.

Determinación de compuestos de nitrógeno

Las muestras para el análisis de nitrógeno total (NT) y disuelto total (NDT) fueron digeridas en autoclave en presencia de una mezcla oxidante siguiendo el mismo procedimiento señalado para el fósforo total. Tras la digestión, las muestras se acidificaron con 1 ml de HCl 1 N y posteriormente se realizó la lectura a 220 nm en espectrofotómetro (APHA 1992). Debido a la escasa concentración de carbono orgánico disuelto no se realizó la lectura a 275 nm, propuesta para corregir el efecto de la materia orgánica absorbiendo a 220 nm de longitud de onda.

Las muestras de agua para la determinación de la concentración de nitratos se acidificaron con 1 ml de HCl 1 N e inmediatamente después se procedió a su lectura mediante espectrofotometría a 220 nm de longitud de onda (APHA 1992).

Determinación de la composición elemental de algas y de bacterias

A partir de agua prefiltrada por 40 μm se siguió una filtración en serie. La primera filtración se realizó a baja presión (<100 mm de Hg) a través de filtros combustionados (500 $^{\circ}\text{C}$, 1 hora) GF/B Whatman de 1 μm de tamaño de poro. Estos filtros fueron empleados para el análisis del contenido de P, N y C en el fitoplancton. El agua filtrada se volvió a filtrar a través de 0,2 μm para la retención de bacterias. Los filtros empleados para ello fueron de policarbonato (Nuclepore, Whatman) para la determinación del P bacteriano y de óxido de aluminio ANODISC (Whatman) precombustionados (500 $^{\circ}\text{C}$, 1 hora) para analizar el contenido de C y N en bacterias.

El P de ambas fracciones, fitoplanctónica y bacteriana, se analizó mediante espectrofotometría, tras la previa digestión del contenido de los respectivos filtros con mezcla oxidante, siguiendo la técnica del molibdato de forma similar al análisis del PT (APHA 1992).. Tras la digestión de las muestras para la determinación del P fitoplanctónico, éstas fueron filtradas de nuevo (GF/B Whatman) para eliminar turbidez, antes de proceder con la adición del resto de reactivos.

Los filtros para el análisis de C y N se mantuvieron a -20°C (Whatman GF/B) o en campana de desecación (ANODISC, Whatman) hasta que se procesaron en un analizador elemental CNH Perkin-Elmer, modelo 2400 (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA).

Para todos los procedimientos analíticos se prepararon blancos (controles), mediante el uso de los correspondientes filtros y volúmenes de agua bidestilada, que fueron tratados de forma idéntica que las muestras.

Estructura biológica

La determinación de la concentración de clorofila *a* se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Jeffrey y Humphrey (1975). Brevemente, la clorofila retenida sobre filtros Whatman GF/F (0,7 μm de tamaño de poro) fue extraída en

acetona (90%) durante 24 horas, a 4 °C y en oscuridad. Posteriormente se midió con un espectrofluorímetro LS 55 Luminiscence Spectrometer (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) a una longitud de onda de excitación de 460 nm y de emisión a 670 nm. Previamente se realizó una curva de calibración con extracto puro de clorofila de espinaca para transformar los valores de fluorescencia en concentración de clorofila.

La cuantificación de la abundancia de fitoplancton y nanoflagelados heterotróficos se realizó siguiendo el método propuesto por Uthermöl (1958). De cada muestra se sedimentó una alícuota variable entre 5 y 50 ml en una cámara Uthermöl durante 48 horas para asegurar la sedimentación de las células más pequeñas (Margalef 1969). En un microscopio óptico invertido (Leitz, Labovert) se contaron al menos 400 individuos de la especie más abundante. El cálculo de la abundancia celular se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

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

donde N es el número de células por mililitro, C es el número de células contadas, S_1 es la superficie efectiva de la cámara de sedimentación (mm^2), S_2 es la superficie de campo óptico (mm^2) y V es el volumen corregido de la muestra sedimentada (ml).

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

La tasa de crecimiento (r) se calculó como:

$$r = \ln (A_1/A_0) \times T^{-1}$$

donde A_1 y A_0 son las abundancias o biomásas en dos días consecutivos de muestreo y T es el tiempo (en días) transcurrido entre la recogida de ambas muestras.

El índice de diversidad Shannon-Wiener (H') y la equitatividad (E) se calcularon para la comunidad fitoplanctónica mediante las siguientes expresiones:

$$H' = -\sum_1^x p_i \log_2 p_i \quad E = \frac{H'}{\log_2(x)}$$

donde x es el número de taxones y p_i es la abundancia relativa del taxón i ($\sum p_i = 1$).

Para la cuantificación de ciliados, debido al gran desarrollo que experimentó la comunidad fitoplanctónica, se hizo necesario diseñar un sistema de filtración de flujo inverso con objeto de purificar cada muestra de 1000 ml, eliminando las partículas inferiores a 8 μm . Esta técnica requirió de la previa acidificación de las muestras con HCl fumante (37%) a una concentración final del 10% v/v y a continuación un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para conseguir la separación de las células fitoplanctónicas unidas entre sí por sustancias mucilaginosas. Una vez purificada la muestra, se volvió a teñir con lugol alcalino (aprox. 1% v/v de concentración final) y se sedimentó durante 48 horas en una cámara Uthermöl. Por cada muestra se contaron al menos 100 campos usando un microscopio óptico invertido (Leitz, Labovert). El cálculo de la abundancia de ciliados se obtuvo a partir de la misma expresión usada para el fitoplancton. El biovolumen se estimó mediante análisis de imágenes (Leica, Quantimet 500) de un máximo de 20 células, ajustando su forma a una esfera. El volumen celular fue corregido con un factor de 1,4 debido a la contracción de la fijación con lugol (Möller y Geller 1993) y convertido a carbono usando un factor de conversión de 140 fg C μm^{-3} (Putt y Stoecker 1989).

El cálculo de la abundancia bacteriana se realizó siguiendo el método de Porter y Feig (1980). Cada alícuota de muestra (5-10 ml) se tiñó con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración final mínima de 0,2 %, durante 15 minutos. A continuación se filtró a través de un filtro de 0,2 μm de policarbonato negro (Nuclepore®). En un microscopio óptico de epifluorescencia (Leitz, Fluovort FS) equipado con un bloque de filtros Ernst Leitz (BP 340-380/DM 400/LP 425), se

contaron al menos 400 células por muestra. La abundancia de bacterias se obtuvo a partir de la siguiente expresión (Jones 1979):

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

donde **N** es el número de células por mililitro, **Y** es el número medio de células por retícula, **A** es el área efectiva de filtración (mm²), **a** es el área de la retícula (mm²) y **V** es el volumen corregido filtrado de la muestra.

El biovolumen bacteriano se estimó a partir de análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), aproximando cada célula a su forma geométrica más ajustada (Medina-Sánchez et al. 1999). Alícuotas concentradas de muestra para bacterias se depositaron sobre rejillas de microscopía electrónica (rejilla 400Cu) recubiertas con una película de “colloidon”. Posteriormente se tiñeron con uranil acetato al 1% c.f. Las bacterias se examinaron a 20.000× y se fotografiaron junto con las rejillas estándar de calibración. El biovolumen se calculó midiendo el diámetro celular (**D**) en las formas cocoides, o el ancho (**A**) y longitud (**L**) en las formas bacilares y filamentosas. El volumen de los cocos (**V**, μm³ cél⁻¹) se determinó aproximando su forma a una esfera:

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

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

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

La biomasa bacteriana (**C**, fg C cél⁻¹) se calculó de acuerdo con la relación alométrica entre el volumen celular y el contenido en carbono según la expresión de Norland (1993):

$$C = \pi LA^2 / 6$$

El cálculo de la abundancia de virus se realizó según el método descrito previamente en Bratbak et al. (1990) y en Børsheim et al. (1990). Las partículas virales se recogieron directamente sobre una rejilla de MET mediante ultracentrifugación. Los tubos de centrífuga (Polyallomer centrifuge tube, Beckmann®) se modificaron mediante el moldeado de un fondo plano con una resina de dos componentes de endurecimiento lento. Después de añadir la resina, los tubos se centrifugaron a $80000 \times g$ durante 30 minutos para conseguir una superficie plana y eliminar las burbujas de aire de la resina. A continuación, los tubos se mantuvieron verticales toda la noche durante el endurecimiento de la resina.

De cada una de las muestras, una alícuota de 10 ml se vertió en un tubo de centrífuga. Se introdujeron rejillas de MET (de níquel, de malla 400) cubiertas con una película de Formvard impregnada con carbono y se colocaron sobre la superficie plana del fondo del tubo con la película de Formvard hacia arriba. Las muestras se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckmann L8-70M usando un rotor SW41-Ti a 30000 rpm durante 20 minutos a 20 °C. Tras la centrifugación, el sobrenadante se eliminó con una pipeta y las rejillas se secaron al aire. Las rejillas se tiñeron con acetato de uranilo y se examinaron con una magnificación de $\times 100.000$ en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1011. Se contaron las partículas virales de al menos 100 campos de visión seleccionados al azar. La abundancia de partículas virales se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$N = A \times (K \times \pi \times (d/M)^2)^{-1}$$

$$K = (R^2 - r^2) / 2R$$

donde **N** es el número de partículas virales por mililitro, **A** es el número promedio de partículas en cada campo de visión, **d** es el radio de la pantalla del MET, **M** es la magnificación, **R** es la diferencia entre el radio máximo del rotor y la altura del fondo plano de resina dentro del tubo de centrífuga, **r** es la diferencia entre el radio máximo del rotor y la suma de la altura del agua mas la altura del fondo plano de resina dentro del tubo de centrífuga.

La biomasa viral se estimó usando el factor de conversión 0,6 fg C virus⁻¹ determinado para partículas virales con un promedio de 60 nm de diámetro (comunicación personal de Gunnar Bratbak, Bratbak et al. 1992).

Variables funcionales

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

La producción primaria se midió utilizando la técnica del ¹⁴C (Steemann-Nielsen, 1952). Para cada determinación se añadió 2,5 µCi de NaH¹⁴CO₃ de una ampolla de 10 µCi ml⁻¹ (actividad específica = 8,4 mCi mmol⁻¹, NEN Dupont) a cada una de las botellas experimentales (tres botellas claras de cuarzo y una oscura, de 40 ml). Éstas se incubaron *in situ* a una profundidad de 5 m fuera de los mesocosmos, con el objetivo de estandarizar las condiciones de radiación solar para todos los tratamientos. Así, las incubaciones de los tratamientos –UVR se realizaron bajo una misma estructura de tubos de PVC cubiertos con placas de plexiglás UF3, mientras que las correspondientes a los tratamientos +UVR se realizaron bajo una estructura semejante sin proteger. Al posicionar las botellas se evitó el sombreado entre sí. Estas botellas se mantuvieron en posición horizontal durante 4 horas, en torno al momento de máxima verticalidad del sol. Seguidamente fueron fijadas con formaldehído neutralizado (2% c.f.).

La actividad total (AT), ¹⁴C disponible, se midió tomando una alícuota de 1 ml de la muestra, a la que se le añadía 1 ml de NaOH 1N para evitar la liberación de ¹⁴C inorgánico al añadir el líquido de centelleo (con pH más ácido).

La producción primaria (PP) se midió como carbono orgánico particulado >1 µm (POC₁) y se determinó filtrando una alícuota de 35 ml a través de un filtro Nuclepore de 1,0 µm de tamaño de poro. El filtrado (filtración en serie) se filtró a través de un filtro de 0,2 µm (carbono orgánico particulado 0,2-1 µm, POC₂). Los filtros se dispusieron en viales de centelleo de 20 ml que, tras acidificar con 100 µl

PRODUCCIÓN PRIMARIA

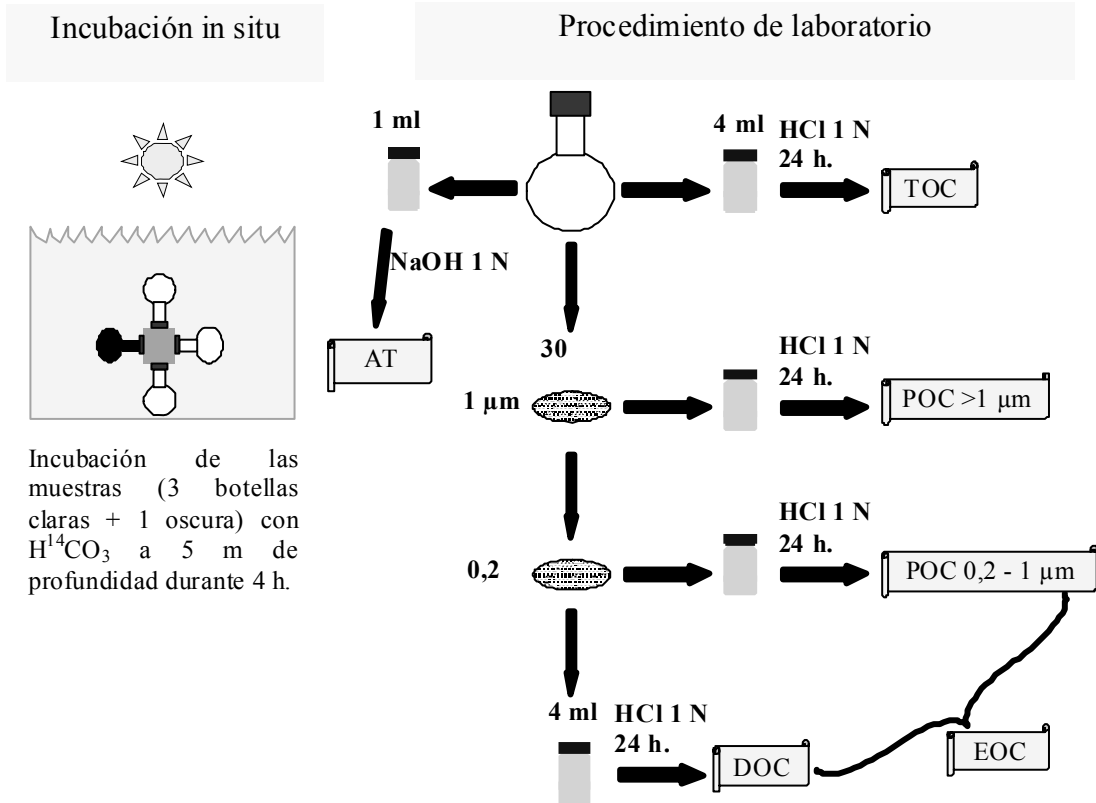


Figura 2-4. Procedimiento analítico de la producción primaria. TOC: carbono orgánico total; POC: carbono orgánico particulado; DOC: carbono orgánico disuelto; EOC: Excreción de carbono orgánico.

de HCl 1N (pH <2), se dejaban abiertos en una campana extractora durante 24 horas para retirar los restos de ^{14}C inorgánico, tal y como Lignell (1992) recomienda. Por último, para la determinación del carbono orgánico disuelto producido (DOC), se tomó una alícuota de 4 ml del filtrado resultante <0,2 µm en un vial de centelleo de 20 ml al que se le añadió 100 µl de HCl 1N con objeto de retirar los restos de ^{14}C inorgánico. Posteriormente se añadió líquido de centelleo (Beckman Ready Safe a todos los viales y se midieron en un contador de centelleo provisto de autocalibración (Beckman LS 6000TA). El carbono orgánico producido se calculó siguiendo la expresión:

$$\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1} = \text{dpm} \times \text{CO}_2 \times 1,05 \times 1,06 \times k_1 \times k_2 \times k_3 \times \text{AT}^{-1}$$

donde **dpm** representa la diferencia entre los valores de dpm de las botellas claras – dpm de la botella oscura, **CO₂** es el ¹²CO₂ total disponible expresado en mg L⁻¹, **1,05** es un factor que corrige la velocidad de asimilación entre el isótopo 12 y 14 del C, **1,06** es un factor que corrige pérdidas de respiración, **k₁**, **k₂** y **k₃** son tres factores que permitan ajustar el volumen filtrado a un litro, el tiempo de incubación a una hora y las unidades respectivamente, **AT** es la actividad total (dpm ml⁻¹, ¹⁴C disponible). El ¹²CO₂ total del agua se estimó a partir de las medidas de alcalinidad y pH (APHA 1992).

El hecho de que no se encontrara picoplancton autótrofo < 1 μm y que la filtración a través de 1 μm (máximo de 100 ml por filtro) no supusiera una retención significativa de bacterias (*t*-test para muestras dependientes, *p*>0,2, *n*=6, Medina-Sánchez et al. 2002), implica que el ¹⁴C retenido sobre los filtros de 0,2 μm se correspondió básicamente con los exudados de origen fotosintético incorporados por las bacterias heterotróficas.

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

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

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

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

La eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (**%PEA**) se calculó como:

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

Producción bacteriana y eficiencia de producción bacteriana

La producción bacteriana heterotrófica (PB) se determinó utilizando la técnica de incorporación en el ADN bacteriano de timidina marcada (Fuhrman y Azam 1982, modificado según Servais et al. 1987). Este procedimiento está basado en la incapacidad de las algas eucarióticas y cianobacterias para capturar timidina disuelta a la concentración normalmente empleada (nM), debido a que carecen o tienen baja actividad de la enzima timidín-kinasa (Fuhrman y Azam 1982; Bern 1985; Robarts y Wicks 1989).

Se añadió [metil-³H] timidina (actividad específica = 82 Ci mmol⁻¹, Amersham Pharmacia) a cada uno de los viales experimentales de 1,5 ml de muestra (6 réplicas + 6 blancos para cada mesocosmos) hasta una concentración final de 11,05 nM. Los viales experimentales se incubaron *in situ* durante 60 minutos en oscuridad. La concentración final de ³H-timidina fue saturante (>10,9 nM) (para inhibir la síntesis de timidina *de novo* a partir de precursores no radiactivos) y el tiempo de incubación adecuado (la asimilación de ³H-timidina es lineal durante este período) según cinéticas previas realizadas para este mismo sistema (Reche et al. 1996). Tras la incubación, el proceso de incorporación de timidina se detuvo con la adición de NaOH (concentración final de 0,25 N) que provoca la hidrólisis alcalina del ARN. Los blancos fueron fijados con NaOH (0.25 N, c.f.) previamente a la adición del radiotrazador. Posteriormente, en el laboratorio, se realizaron los siguientes tratamientos sobre las muestras:

1. Tratamiento con TCA frío. Permite cuantificar la cantidad de ³H-timidina incorporada en el total de macromoléculas bacterianas. A cada muestra se le añadió ácido tricloroacético (TCA) hasta una concentración final del 5% p/v (pH ~ 2) y se dejó actuar durante 20' en un lecho de hielo picado. El TCA provoca la precipitación de las proteínas y del ADN, precipitado que es recogido mediante centrifugación (14000 rpm, 10 minutos) (EBA 12 Hettich Zentrifugen). Posteriormente, se enjuagaron los viales 2 veces con 2 ml de TCA (5%) para retirar posibles restos de radioactividad no incorporada.

PRODUCCIÓN BACTERIANA

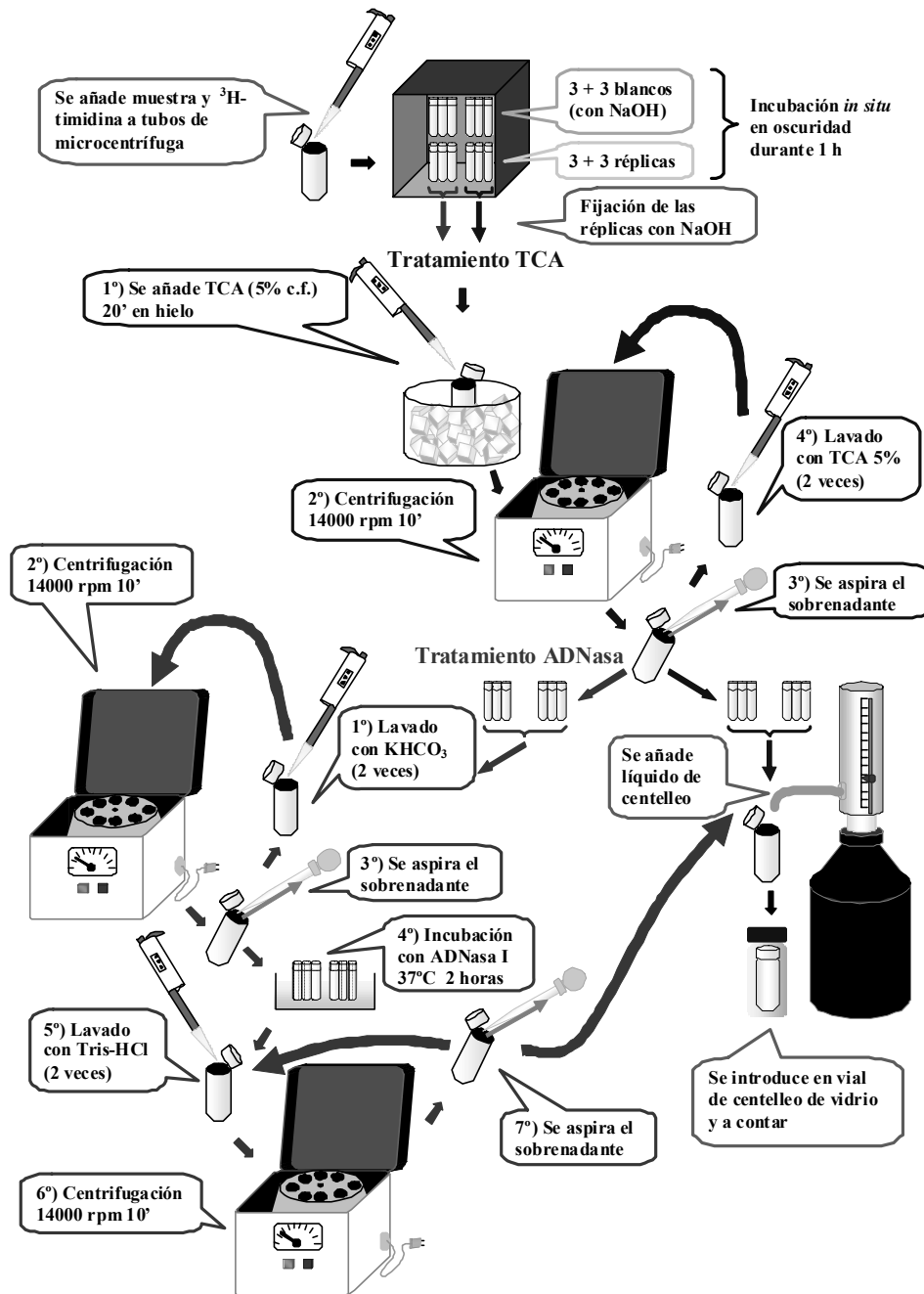


Figura 2-5. Procedimiento analítico de la producción bacteriana.

Finalmente, a la mitad de los viales se les añadió líquido de centelleo (Beckman Ready Safe) para su posterior medida en un contador de centelleo provisto de autocalibración (Beckman LS 6000TA).

2. Tratamiento enzimático con ADNasa I (Robarts et al. 1986). Permite cuantificar la cantidad de ^3H -timidina incorporada en macromoléculas bacterianas distintas del ADN. En la otra mitad de los viales se realizó una digestión enzimática con ADNasa I (Boehringer Mannheim). Para ello se neutralizaron los viales con KHCO_3 10 nM (2 veces con 2 ml) y a continuación se les añadió la solución enzimática de DNAasa I (en tampón Tris-HCl, pH 7,5), que se dejó actuar durante 2 horas en agitación a 37 °C. Finalmente, los viales se enjuagaron 2 veces con 2 ml de solución tampón Tris-HCl y se les añadió líquido de centelleo para su posterior medida en el contador de centelleo.

La tasa de incorporación de ^3H -timidina (**IT**) se calculó por diferencia entre los tratamientos TCA y ADNsa I (Servais et al. 1987, Torreton y Bouvy 1991), a partir de la siguiente expresión:

$$\text{IT (nmoles } ^3\text{H-timidina l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{dpm} \times k_1 \times k_2 \times (2,22 \times 10^6 \times \text{S.A.})^{-1}$$

donde **dpm** representa a los dpm que corresponden al ADN recién sintetizado ((dpm de tratamiento TCA – dpm de tratamiento ADNasa)-(dpm TCA blanco – dpm ADNasa blanco)), **k₁** es un factor que ajusta la medida de producción a una hora, **k₂** es un factor que corrige el volumen de la muestra a un litro, **S.A.** es la actividad específica del material radioactivo, $2,22 \times 10^6$ es el factor que convierte los dpm en μCi .

El número de bacterias producidas por mol de ^3H -timidina incorporado se estimó usando el factor de conversión de $1,07 \times 10^{18}$ cél mol⁻¹, calculado experimentalmente para este sistema (Carrillo et al. 2002). Finalmente, la cantidad de carbono producida se estimó utilizando el factor de 2×10^{-14} g C cél⁻¹ (Lee y Fuhrman 1987).

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

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

donde **PB** es la producción bacteriana, **POC₂** es el C orgánico asimilado por la fracción bacteriana y **EOC** es el C orgánico excretado por las algas.

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

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

Esta variable permite cuantificar la interacción alga-bacteria puesto que relaciona el C bacteriano producido y calculado usando un factor de conversión propio del sistema (Carrillo et al. 2002) con la disponibilidad de C orgánico de origen fotosintético, obtenidas ambas variables a partir de una misma comunidad planctónica y sometida a las mismas condiciones experimentales.

Análisis estadísticos

Debido a la ausencia de réplicas para los tratamientos individuales en la aproximación experimental, el efecto del enriquecimiento en nutrientes sobre variables estructurales químicas y biológicas, se analizó mediante un análisis de regresión lineal de valores promedio para cada período considerado frente al nivel de enriquecimiento de P. Cuando la regresión fue significativa, el efecto de la UVR se analizó mediante un análisis de la covarianza. Cuando ambas pendientes de las rectas de regresión no fueron homogéneas (ausencia de interacción), el efecto de la UVR se analizó mediante las diferencias en las intersecciones con el eje y. Cuando las pendientes de las rectas de regresión fueron distintas en los dos tratamientos de luz (interacción con la covariable), las diferencias significativas en cada nivel de

enriquecimiento en P se determinaron gráficamente examinando el solapamiento de los intervalos de confianza al 95% de las líneas de regresión.

Cuando no se encontró relación lineal entre el enriquecimiento en P y las variables estudiadas, se emplearon modelos no lineales (logarítmicos o exponenciales). Para detectar el efecto de la UVR sobre estas variables en cada nivel de enriquecimiento en P se usaron análisis t-test pareados de muestras dependientes. La interacción de UVR y P se detectó examinando gráficamente la modificación del efecto UVR a lo largo del gradiente de enriquecimiento en P.

Análisis ANOVA de dos vías para muestras repetidas en el tiempo se realizaron sobre variables funcionales procedentes de aproximaciones experimentales propias de dichas variables. Estas aproximaciones experimentales incluían réplicas independientes que permitían el uso de este análisis para detectar los efectos de la UVR, del P y de la interacción de ambos factores sobre este grupo de variables. Se realizaron comparaciones *post-hoc* entre los tratamientos de luz mediante el test de Bonferroni para cada nivel de enriquecimiento en P.

En todos los análisis estadísticos se verificaron las asunciones de normalidad y homocedasticidad de los análisis paramétricos (regresión lineal y análisis ANOVA) mediante el test *W* de Shapiro-Wilks (normalidad) y test de Levene (homocedasticidad). Cuando los datos no cumplieron estas asunciones se transformaron logarítmicamente. El software utilizado para los análisis estadísticos fue Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2005).

3

Factores responsables de los cambios estructurales y funcionales en la red trófica microbiana del lago de La Caldera

Introducción

La red trófica pelágica está compuesta por un conjunto de productores y consumidores que canalizan los flujos de materia y energía a través de dos cadenas tróficas principales: la cadena de pastoreo y el bucle microbiano (Pomeroy 1974, Azam et al. 1983, Cotner y Biddanda 2002). Estas dos cadenas están constituidas en su base por la comunidad algal y la comunidad bacteriana respectivamente.

Los organismos autótrofos son un nivel trófico clave que puede suponer la principal vía de entrada de energía en forma de carbono orgánico, especialmente en lagos oligotróficos de alta montaña de aguas claras (Straškrabová et al. 1999a, Carrillo et al. 2006). Dentro de este nivel trófico pueden encontrarse distintos grupos funcionales de algas, desde autótrofos estrictos hasta flagelados mixotróficos. Por tanto, conocer la diversidad de la comunidad algal, así como los grupos dominantes de algas es esencial para comprender el funcionamiento del ecosistema. Así por ejemplo, las algas mixotróficas pueden ser una causa principal de mortalidad bacteriana en ambientes con bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos (Havskum y Riemann 1996, Medina-Sánchez et al. 2004). Los mixótrofos pueden llegar a dominar la comunidad fitoplanctónica en lagos oligotróficos y distróficos (Salonen y Jokinen 1988, Jansson et al. 1996), de altas latitudes (Duthie y Hart 1987, Eloranta 1989, 1995, Lepistö y Rosenström 1998, Izaguirre et al. 1998) y de alta montaña (Martínez 1977, Sánchez-Castillo et al. 1989, Carrillo et al. 1990, 1991, 1995, De Hoyos et al. 1998, Díaz et al. 1998, Medina-Sánchez et al. 1999, Villar-Argaiz et al. 2001), lo cual apoya la idea de que la mixotrofia es una estrategia favorable en ambientes donde la comunidad algal está limitada por nutrientes minerales. Sin embargo, los mixótrofos, por su menor tasa de crecimiento derivada de sus mayores costes metabólicos, pueden verse desplazados por los autótrofos estrictos cuando aumenta la disponibilidad de nutrientes, como por ejemplo tras a un incremento de procesos de resuspensión de sedimentos, de entradas de nutrientes alóctonos o del reciclado desde el zooplancton (Carrillo et al. 1995, 1996; Villar-Argaiz et al. 2002) o bien debido a enriquecimientos experimentales (Jansson et al. 1996). De ahí la importancia del estudio de la sucesión de especies en la comunidad algal y la necesidad de conocer el grupo funcional de algas que domina en el

ecosistema en cada momento. En este sentido se conoce que el cambio de especies potencialmente mixotróficas a autótrofas estrictas constituye un patrón muy documentado en el lago de La Caldera (Martínez 1977, Carrillo et al. 1995, Medina-Sánchez et al. 1999, 2004).

Por otra parte, la comunidad microbiana heterótrofa está compuesta por los principales consumidores de carbono orgánico en los ecosistemas acuáticos (Sherr y Sherr 1996, Azam 1998), por lo que el conocimiento de la proporción contribución que representa la comunidad algal en relación a la comunidad microbiana heterotrófica, y las causas determinantes de esta contribución relativa, constituye otro objetivo clave para comprender la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas. Previas observaciones muestran un predominio de la biomasa bacteriana (y del bucle microbiano por extensión) sobre la de algas en ecosistemas oligotróficos (Cho y Azam 1988, Ducklow y Carlson 1992, Legendre y Rassoulzadegan 1995, Gasol et al. 1997, Cotner 2000, Biddanda et al. 2001), característica destacada en una revisión sobre el papel de los microorganismos heterotróficos en los ecosistemas pelágicos (Cotner y Biddanda 2002).

La mayor contribución de la comunidad bacteriana en ecosistemas oligotróficos de alta razón luz:nutrientes se explicó en el marco de la Hipótesis Luz \times Nutrientes (LNH) (Sterner et al. 1997), según la cual en estos ecosistemas, los productores primarios tienden a estar limitados por los nutrientes minerales, generándose razones C: P elevadas (Sterner et al. 1997). En estas condiciones se produce un desacople entre fotosíntesis y producción que resulta en la excreción de carbono orgánico por las algas (Berman-Frank y Dubinsky 1999, Carrillo et al. 2002), generando una alta disponibilidad de C para las bacterias, por lo que éstas tienden a estar limitadas por nutrientes minerales (Sterner et al. 1997). El mayor desarrollo bacteriano en relación a las algas vendría determinado por la baja razón superficie:volumen de las bacterias, que les confiere ventaja competitiva respecto a las algas en la captura de nutrientes limitantes cuando éstos son escasos en el medio (Currie 1990, Cotner y Wetzel 1992, Cotner y Biddanda 2002). Sin embargo, esta tendencia general no se cumple en el lago de La Caldera (Medina-Sánchez et al.

1999, 2004). Para explicar el escaso desarrollo del bucle microbiano en este ecosistema se ha propuesto la existencia de:

- (i) posibles restricciones debidas a factores abióticos característicos de este ecosistema como los altos flujos de radiación UV (Carrillo et al. 2002), la limitación crónica de nutrientes (Carrillo et al. 1996, Morales-Baquero et al. 1999), o las bajas temperaturas (Felip et al. 1996). Sin embargo, se ha demostrado que la exposición a la radiación solar completa estimula la producción bacteriana (PB) (Medina-Sánchez et al. 2002), mientras que las variaciones en la actividad o biomasa bacteriana no se explican por la concentración de fósforo total (PT) o fósforo disuelto (PDT) (Reche et al. 1997, Medina-Sánchez et al. 1999, Carrillo et al. 2002).
- (ii) factores bióticos como la interacción con organismos bacterívoros mixotróficos (Medina-Sánchez et al. 2004) o heterótrofos (Duarte et al. 2005), aunque no se puede descartar un control por competencia o comensalismo resultante de la interacción alga-bacteria (Chrzanowski y Grover 2001, Villar-Argaiz et al. 2002, Carrillo et al. 2008b). Así, las algas pueden tener ventaja competitiva frente a las bacterias en la captación de P limitante cuando éste entra al ecosistema de forma pulsada (Bergeron y Vincent 1997, Villar-Argaiz et al. 2001, 2002), pero también pueden limitar el crecimiento bacteriano dependiente de los exudados de carbono fotosintético (Daufresne y Loreau 2001, Aota y Nakajima 2001).

A partir de la información de la que disponemos, en el presente capítulo nos proponemos como objetivos:

- 1) Identificar los factores que determinan cambios en la estructura y función de las algas, comunidad que domina la biomasa nanoplanctónica en el lago de La Caldera.
- 2) Analizar los mecanismos de regulación que potencialmente determinan el escaso desarrollo del bucle microbiano en este ecosistema.

El desarrollo de estos objetivos servirá como marco de referencia para los resultados experimentales de esta Tesis Doctoral.

Material y métodos

Con objeto de contextualizar históricamente los resultados de la dinámica de la comunidad nanoplanctónica del periodo libre de hielo del año 2003, se muestran datos de las tendencias temporales anuales tanto de los porcentajes de los diferentes grupos que componen la comunidad nanoplanctónica desde 1992, como de la proporción de algas flageladas y no flageladas desde 1973, año en que comenzó el estudio de este lago de alta montaña. Así mismo, se analizan las relaciones entre los cambios en la profundidad máxima del lago y los valores promedio de cada año de la concentración de fósforo total (PT), así como la relación entre estas variables y la razón alga:bacteria, además del porcentaje de algas flageladas.

El procedimiento tanto de la medida de variables *in situ*, como de la toma de muestras y su posterior análisis está básicamente descrito en el capítulo 2.

Las variables físicas y químicas, así como las correspondientes a la estructura de la comunidad algal y la estequiometría de la fracción particulada $>1 \mu\text{m}$, se analizaron a lo largo de la estación libre de hielo, desde el 27 de junio hasta el 10 de octubre. La estructura de los demás niveles tróficos nanoplanctónicos y la estequiometría de la fracción particulada $<1 \mu\text{m}$ se analizaron a partir del 1 de agosto. Las variables funcionales se midieron desde el 1 de agosto hasta el 10 de septiembre, coincidiendo con el periodo central del verano en el que los procesos se desarrollan a mayor velocidad.

En este capítulo se analizó la tendencia temporal de (i) los perfiles verticales de la penetración de la radiación UV-A, UV-B y radiación fotosintéticamente activa (PAR) y de temperatura; (ii) variables estructurales algales como la abundancia, clorofila *a* (chl *a*), composición taxonómica, diversidad y equitatividad; (iii) abundancias de virus, bacterias, HNFs y ciliados; (iv) porcentaje de C en cada uno de los componentes de la fracción nanoplanctónica; (v) variables estequiométricas de las fracciones particuladas $>1 \mu\text{m}$ y $<1 \mu\text{m}$; y (vi) variables funcionales relacionadas con los productores primarios y con la comunidad bacteriana heterotrófica.

Análisis estadísticos

La identificación de los factores que controlan la estructura, estequiometría y función de la comunidad algal y bacteriana, así como la estructura de la comunidad viral, se realizó mediante análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados. En la Tabla 3-1 se muestran las variables respuesta y sus potenciales predictores.

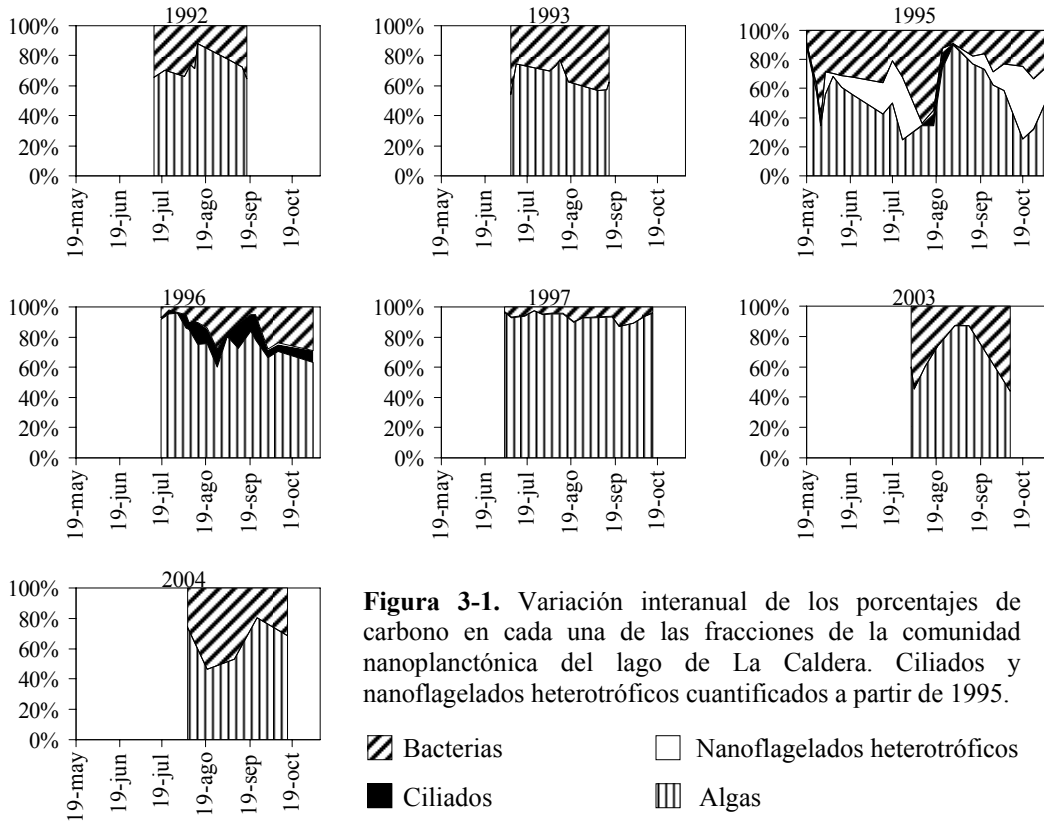
Tabla 3-1. Listado de análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados con objeto de conocer los factores que afectan a variables estructurales, estequiométricas y funcionales de la comunidad algal, bacteriana y viral. NT= concentración de nitrógeno total, NDT= nitrógeno disuelto total, NO₃⁻= nitrato, PT= fósforo total, PDT= fósforo disuelto total, SRP= fósforo reactivo soluble, Kd= coeficiente de atenuación vertical de la radiación incidente, UVA= radiación ultravioleta-A, UVB= radiación ultravioleta-B, PAR= radiación fotosintéticamente activa, r= tasa de crecimiento, TOC= producción primaria total, PP= producción primaria particulada, EOC= excreción de carbono orgánico fotosintético, %EOC= porcentaje de EOC respecto a TOC, %CUEb= eficiencia de uso de carbono fotosintético por las bacterias, %PEA= eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias, PB= producción bacteriana. Los superíndices identifican a las variables predictoras de cada variable respuesta.

Objetivo	Variables respuesta	Variables predictoras
Estructura y estequiometría	Clorofila <i>a</i> ¹	NT ¹
	Abundancia algal ¹	NDT ¹
	Biomasa algal ¹	NO ₃ ⁻¹
	Clorofila:biomasa algal ¹	PT ^{1, 2, 3}
	Abundancia y biomasa de cada grupo taxonómico algal ¹	P particulado >1 μm ^{1, 2}
	% algas flageladas ¹	PDT ^{1, 2, 3}
	Diversidad ¹	SRP ^{1, 2, 3}
	Equitatividad ¹	NO ₃ ⁻ :SRP ^{1, 2, 3}
	C:P >1 μm ¹	NO ₃ ⁻ :PT ^{1, 2, 3}
	N:P >1 μm ¹	Kd _{UVA} ^{1, 2, 3}
	Alga:bacteria (biomasa) ¹	Kd _{UVB} ^{1, 2, 3}
	Abundancia bacteriana ²	Kd _{PAR} ¹
	Biomasa bacteriana ²	Temperatura ^{1, 2, 3}
	Abundancia viral ³	P particulado <1 μm ^{2, 3}
		N:P <1 μm ^{2, 3}
	Abundancia bacteriana ³	
	Biomasa bacteriana ³	
	r (abundancia bacteriana) ³	
	r (biomasa bacteriana) ³	
	PB ³	

3 Factores responsables de cambios en la red trófica microbiana de La Caldera

Objetivo	Variables respuesta	Variables predictoras
Función	r (abundancia algal) r (biomasa algal) TOC ¹ PP ¹ EOC ¹ %EOC ¹ TOC:biomasa algal ¹ TOC:clorofila ¹ PP:biomasa algal ¹ PP:clorofila ¹ PP:PB ¹ r (abundancia bacteriana) r (biomasa bacteriana) PB ²	NT ¹ NDT ¹ NO ₃ ⁻¹ PT ^{1,2} P particulado >1 μm ¹ PDT ^{1,2} SRP ^{1,2} NO ₃ ⁻ :SRP ^{1,2} NO ₃ ⁻ :PT ^{1,2} Kd _{UVA} ^{1,2} Kd _{UVB} ^{1,2} Kd _{PAR} ¹ Temperatura ^{1,2} Abundancia algal ¹ Biomasa algal ¹ r (abundancia algal) r (biomasa algal) P particulado <1 μm ² N:P <1 μm ² Abundancia bacteriana ² Biomasa bacteriana ²
Interacción alga-bacteria	PB ¹ %PEA ²	Abundancia algal ¹ Biomasa algal ¹ PP ¹ EOC ¹ %CUEb ^{1,2}

Cuando una variable respuesta fue explicada por distintas variables que implican mecanismos distintos de control, estudiamos el peso relativo de estas variables predictoras mediante análisis de regresión múltiple por pasos. Se verificó la linealidad entre cada predictor y la variable respuesta, así como la multiortogonalidad entre las variables predictoras, mediante un análisis previo de correlación. La redundancia de los predictores se controló especificando un valor de 0,6 como la tolerancia mínima aceptable (StatSoft, Inc. 2005).



Resultados

Análisis interanual

El análisis de la estructura de la comunidad nanoplanctónica desde 1973 hasta 2004 muestra la dominancia de la fracción autotrófica (Fig. 3-1), que representa más del 50% del carbono total (CT). La razón alga:bacteria, que es la variable que mide la contribución relativa de los dos grupos tróficos principales, ha variado desde un valor promedio anual mínimo de 2,06 en 1993 hasta un máximo de 18,7 en 1997, situándose en la mayoría de los años en un valor comprendido entre 2 y 3 (Figs. 3-1 y 3-5 A, B).

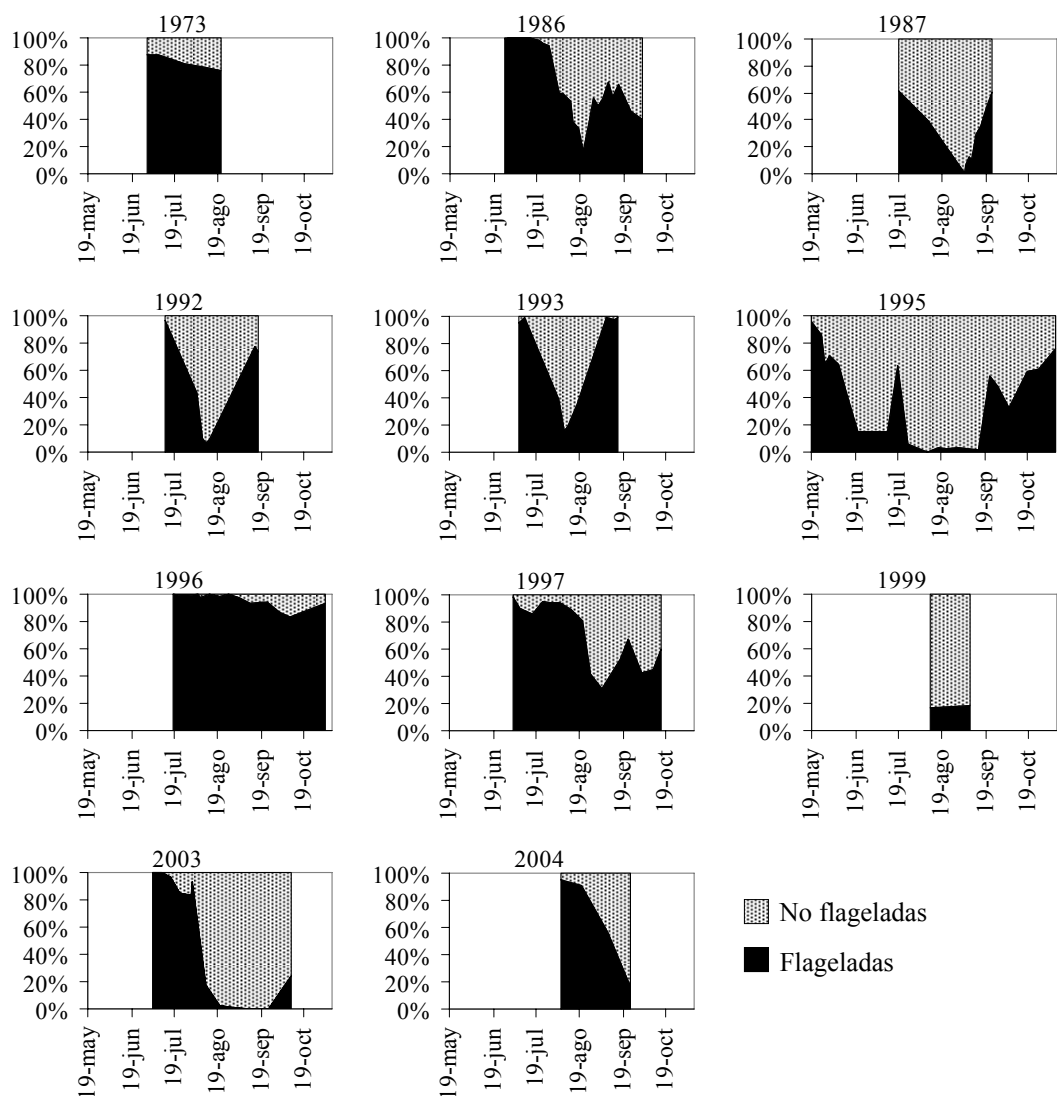


Figura 3-2. Variación interanual de los porcentajes de algas flageladas y no flageladas en términos de carbono, en el lago de La Caldera.

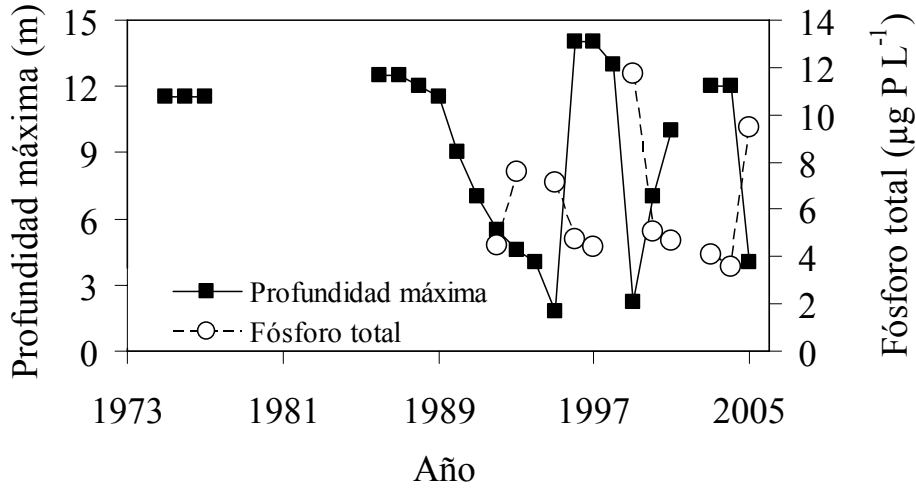


Figura 3-3. Dinámica interanual de la profundidad máxima y de los valores promedio de concentración de fósforo total registrados en el lago de La Caldera.

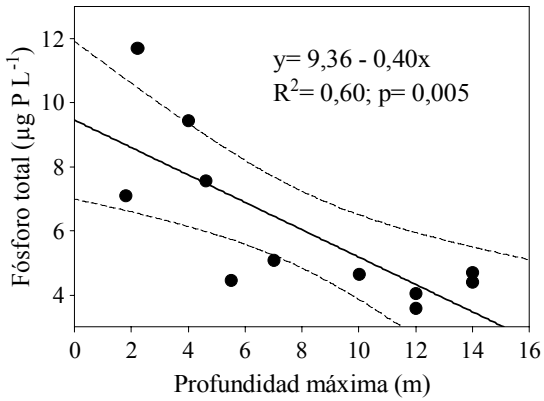


Figura 3-4. Relación entre las profundidades máximas registradas en el lago de La Caldera y los valores promedio de concentración de fósforo total. Cada punto indica un año de estudio. Las líneas sólidas representan a las rectas de regresión, mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados.

La figura 3-2 muestra la sucesión estacional de los principales grupos metabólicos que constituyen la comunidad de autótrofos. Existe un marcado patrón, con un cambio desde una comunidad compuesta mayoritariamente por algas flageladas tras el deshielo, hasta una dominada por algas no flageladas en el periodo central de la estación libre de hielo. En algunos de los años estudiados, las algas flageladas vuelven a dominar al final del periodo libre de hielo. El promedio anual de

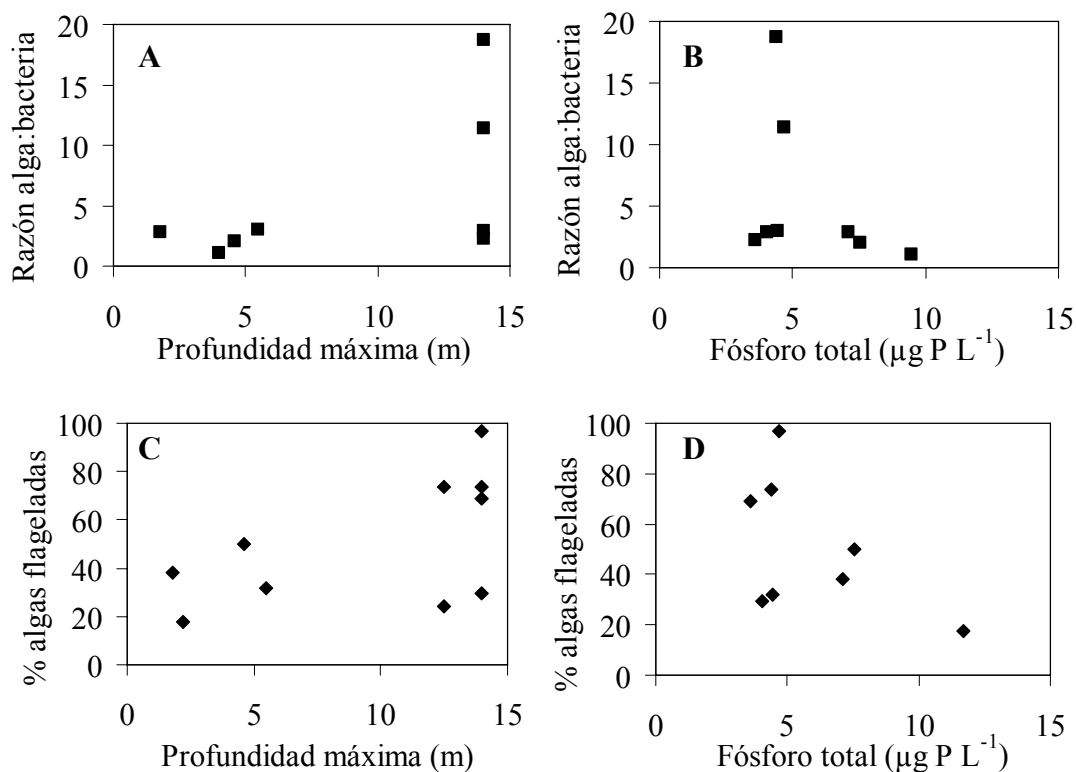


Figura 3-5. Profundidad máxima registrada en el lago de La Caldera y valores promedio de concentración de fósforo total frente a la razón alga:bacteria y al porcentaje de algas flageladas respecto al total de carbono algal. Cada punto indica un año de estudio.

la proporción relativa de algas flageladas (en biomasa) es altamente variable, con valores generalmente comprendidos entre el 20-75%, y llegando a valores extremos de hasta el 97,7% en 1996.

Interesantemente, a lo largo de estos años de estudio se ha evidenciado una importante variación en la profundidad máxima del lago que oscila desde valores mínimos de 1,8 m en 1995 hasta un máximo de 14 m en los años de máxima profundidad de la laguna (Fig. 3-3). Dentro de las variables químicas, el PT sigue una dinámica temporal con oscilaciones de los valores promedio anuales que van desde $3,6 \mu\text{g P L}^{-1}$ en 2004 hasta $11,7 \mu\text{g P L}^{-1}$ en 1999 (Fig. 3-3). Ambas variables estuvieron significativa y negativamente correlacionadas (Fig. 3-4). Los valores

promedio anuales tanto de la razón alga:bacteria como del % de algas flageladas siguen una tendencia (no significativa) positiva con las variaciones en la profundidad máxima (Fig. 3-5 A, C) y negativa con la concentración promedio de PT (Fig. 3-5 B, D).

Caracterización estructural del lago: ambiente físico químico

A lo largo del año 2003, la profundidad de la laguna de La Caldera osciló entre 12 metros en el deshielo y 7 metros hacia el final del periodo libre de hielo. La profundidad del disco de Secchi fue inicialmente de 5,3 m y aumentó a lo largo del periodo de estudio hasta que el 1 de agosto alcanzó la máxima profundidad del lago, manteniéndose así hasta el final de la estación libre de hielo. La irradiancia incidente sobre la superficie del lago de las distintas regiones del espectro de radiación solar, varió entre 452-1091 W m⁻² de PAR, 31-90,9 W m⁻² de radiación UVA y 1-2,9 W m⁻² de radiación UVB (Tabla 3-2).

Tabla 3-2. Radiación solar incidente sobre la superficie del lago de La Caldera a lo largo del periodo de estudio. Radiación ultravioleta-B (UVB: 300-319 nm), radiación ultravioleta-A (UVA: 320-399 nm) y radiación fotosintéticamente activa (PAR: 400-800 nm).

Irradiancia en superficie (W m ⁻²)			
Fecha	UVB	UVA	PAR
23-jul	2,9	87,7	1030
01-ago	2,0	47,3	669
03-ago	2,8	87,7	1017
20-ago	1,0	31,6	452
01-sep	2,8	90,9	1047
11-sep	1,8	62,4	820
24-sep	2,4	85,1	1091

Los valores del coeficiente de atenuación difusa de la radiación incidente (Kd) fueron elevados al comienzo del periodo de estudio para todas las calidades de

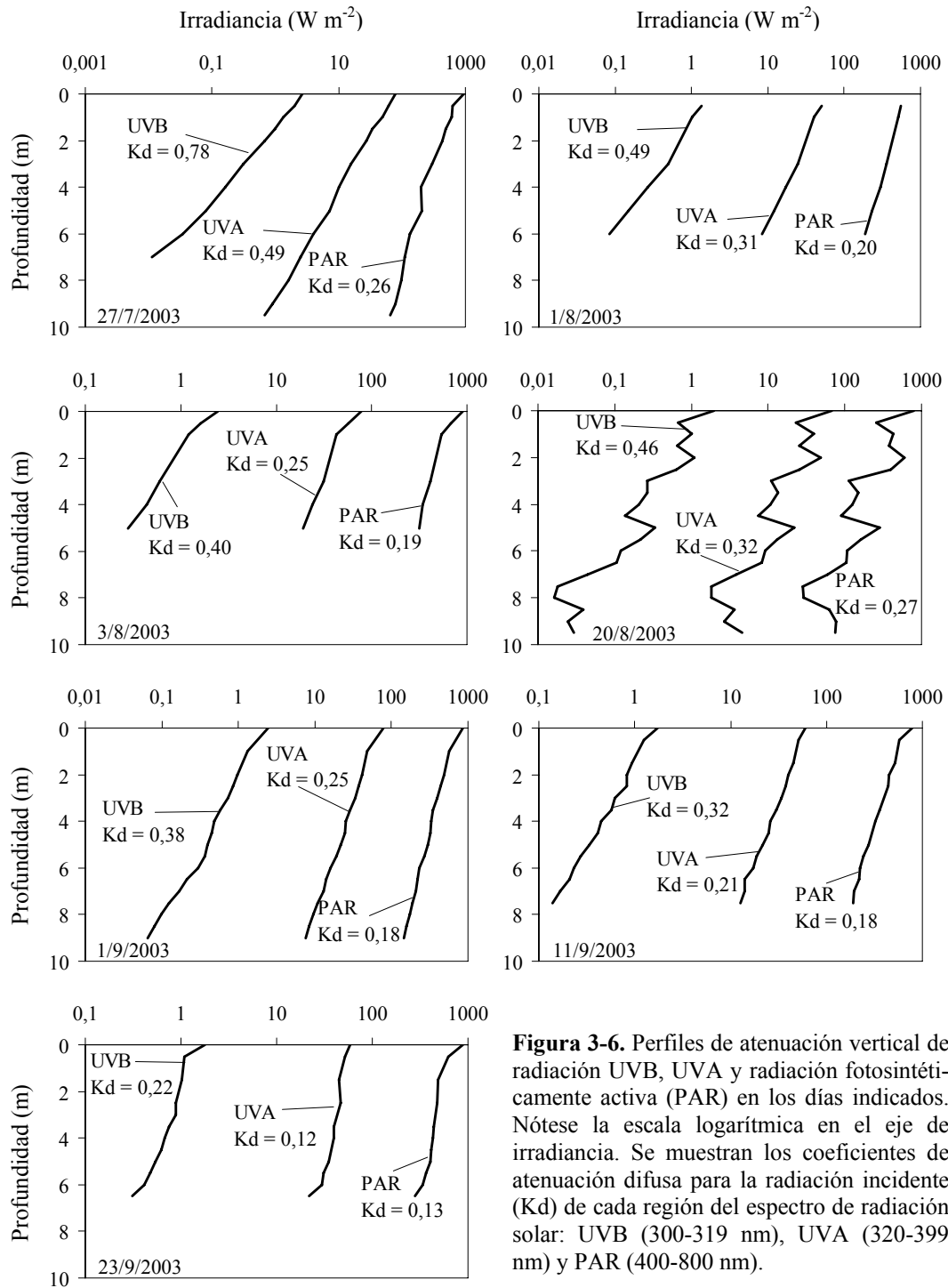


Figura 3-6. Perfiles de atenuación vertical de radiación UVB, UVA y radiación fotosintéticamente activa (PAR) en los días indicados. Nótese la escala logarítmica en el eje de irradiancia. Se muestran los coeficientes de atenuación difusa para la radiación incidente (K_d) de cada región del espectro de radiación solar: UVB (300-319 nm), UVA (320-399 nm) y PAR (400-800 nm).

radiación solar, especialmente para radiación UVA y UVB ($K_{d_{UVB}} = 0,78 \text{ m}^{-1}$; $K_{d_{UVA}} = 0,49 \text{ m}^{-1}$; $K_{d_{PAR}} = 0,26 \text{ m}^{-1}$). Sin embargo, desde el día 1 de agosto disminuyeron y se mantuvieron con valores relativamente bajos ($K_{d_{UVB}} \leq 0,47 \text{ m}^{-1}$; $K_{d_{UVA}} \leq 0,32 \text{ m}^{-1}$) (Fig. 3-6).

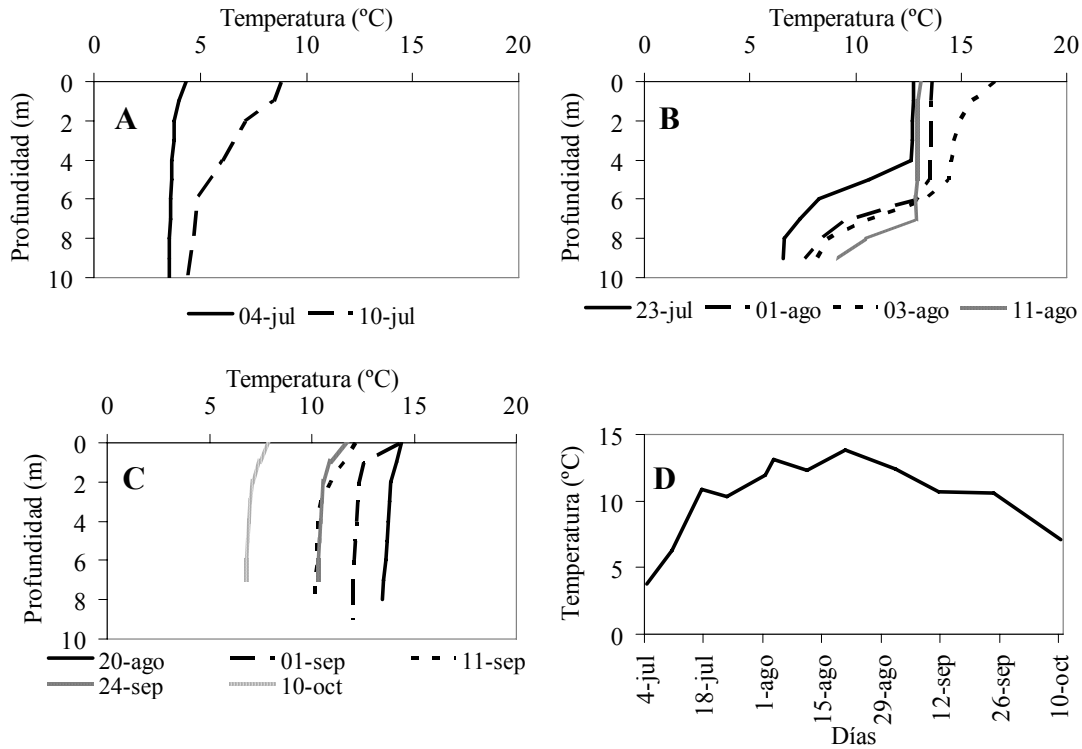


Figura 3-7. Variación espacial y estacional de la temperatura en La Caldera. Se muestran los perfiles verticales durante el periodo de deshielo (A), durante el periodo central del verano (B), con una estratificación térmica y durante el final del periodo libre de hielo (C), con la columna de agua mezclada. Además se muestra la temperatura promedio de la columna de agua a lo largo del periodo libre de hielo.

La temperatura promedio de la columna de agua fue inicialmente de $\sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$, pero a partir del día 17 de julio osciló dentro de un estrecho margen ($11,8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), excepto al final del periodo estudiado, cuando se observó un acusado descenso hasta un valor mínimo de $7 \text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 3-7D). Se estableció una estratificación térmica con

diferencias máximas de temperatura entre la superficie y el fondo de entre 4-8 °C, que se mantuvo desde el 10 de julio hasta el 11 de agosto (Fig. 3-7).

Tabla 3-3. Variaciones estacionales de concentración de oxígeno (O₂), potencial de oxido-reducción (Red-ox), conductividad y pH en La Caldera durante la estación libre de hielo. Valores promedio de la columna de agua de la fecha indicada. Entre paréntesis se muestra el rango de variación entre profundidades. n.m. no medido.

Fecha	O ₂ (%)	Red-ox (mV)	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)	pH
04-jul	n.m.	n.m.	28 (28; 28)	7,37 (7,26; 7,69)
10-jul	n.m.	n.m.	27,3 (25; 30)	7,77 (7,56; 8,41)
17-jul	n.m.	n.m.	28,0	8,59
23-jul	101,0 (77; 125)	60,5 (35; 92)	30,6 (28; 31)	7,70 (6,6; 8,8)
01-ago	97,0 (75,6; 130)	31,5 (-24; 83)	n.m.	8,31 (7,51; 9,64)
03-ago	105,2 (80,3; 139)	-16,1 (-34; -4)	29,7 (28; 31)	8,44 (7,83; 9,76)
11-ago	95,9 (76; 135)	-62,8 (-80; -46)	30,5 (28; 31)	9,67 (8,8; 10,64)
20-ago	82,5 (74,4; 89,4)	n.m.	30,6 (30; 31)	9,60 (9,32; 10,09)
01-sep	80,6 (71,8; 89)	276,9 (249; 288)	28,2 (27; 32)	9,23 (8,73; 9,55)
11-sep	81,3 (72,1; 90)	230,8 (214; 241)	32,7 (32; 33)	10,08 (10; 10,1)
24-sep	77,5 (70,8; 84,3)	166,7 (150; 173)	31,0 (28; 33)	9,49 (9,27; 9,75)
10-oct	82,1 (76,8; 89,8)	246,2 (241; 252)	30,9 (30; 31)	8,74 (8,69; 8,8)

La Tabla 3-3 muestra los valores registrados de concentración de O₂, potencial de oxido-reducción, conductividad y pH en la columna de agua a lo largo del periodo de estudio. Hasta la primera mitad del mes de agosto, los valores

promedio de concentración de O₂ estuvieron próximos al 100% de saturación, coincidiendo con los valores más bajos detectados del potencial de oxido-reducción, que incluso llegaron a ser negativos. Desde el 20 de agosto hasta el final de la estación libre de hielo, la concentración de O₂ se situó alrededor del 80% de saturación, mientras que el potencial de oxido-reducción presentó valores promedio comprendidos entre 160 mV y 276 mV. En relación a la conductividad, sus valores se mantuvieron muy estables durante todo el periodo de estudio, estando comprendidos entre 25 y 33 $\mu\text{S cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los valores promedio de pH registrados en la columna de agua incrementaron a lo largo del periodo de estudio, desde 7,37 el 4 de julio hasta alcanzar el máximo de 10,08 el 11 de septiembre. A partir de ahí descendieron hasta 8,74 al final de la estación libre de hielo.

Tabla 3-4. Datos de nutrientes en La Caldera durante la estación libre de hielo. Valores promedio del integrado de la columna de agua junto con su desviación estándar. n.m.: no medido. NT: concentración de nitrógeno total; NDT: concentración de nitrógeno disuelto total; NO₃⁻: concentración de nitrato; PT: concentración de fósforo total; PDT: concentración de fósforo disuelto total; SRP: concentración de fósforo inorgánico; DIN: nitrógeno inorgánico disuelto.

Fecha	NT ($\mu\text{g N l}^{-1}$)	NDT ($\mu\text{g N l}^{-1}$)	NO ₃ ⁻ ($\mu\text{g N l}^{-1}$)	PT ($\mu\text{g P l}^{-1}$)	PDT ($\mu\text{g P l}^{-1}$)	SRP ($\mu\text{g P l}^{-1}$)	DIN:PT
27-jun	n.m.	n.m.	332 ± 4,7	2,5 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2	331,9
04-jul	n.m.	n.m.	302 ± 5,1	3,6 ± 0,3	<1	<1	168,2
10-jul	n.m.	n.m.	285 ± 5,8	4,1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,3	138,8
17-jul	n.m.	n.m.	280 ± 2,3	7,5 ± 0,2	2,1 ± 1	1 ± 0,04	73,4
23-jul	431 ± 63	n.m.	256 ± 5,4	3,1 ± 0,4	<1	<1	160,0
31-jul	331 ± 25	331 ± 220	245 ± 6,2	8,9 ± 1,0	2,9 ± 0,4	<1	60,7
01-ago	421 ± 137	238 ± 48	238 ± 29	7,4 ± 2,5	2,7 ± 0,2	<1	71,3
03-ago	400 ± 81	270 ± 53	270 ± 3,3	6,6 ± 1,6	2,5 ± 0,5	<1	91,2
11-ago	367 ± 100	210 ± 35	210 ± 13	3,6 ± 0,4	<1	<1	130,0
20-ago	359 ± 235	315 ± 29	212 ± 14	2,3 ± 2,1	<1	<1	203,0
01-sep	228 ± 18	228 ± 123	149 ± 4,3	1,4 ± 0,6	<1	<1	228,7
11-sep	261 ± 231	261 ± 134	130 ± 2,2	<1 ± 0,4	<1	<1	560,2
24-sep	286 ± 19	286 ± 130	106 ± 6	3,2 ± 1,4	1,2 ± 0,4	<1	72,9
10-oct	242 ± 23	242 ± 109	83 ± 3,1	2,2 ± 0,5	1,6 ± 1	<1	84,2

La Tabla 3-4 muestra los valores promedio de la concentración de nutrientes en la columna de agua. Se observó una disminución de la concentración de nitrógeno a lo largo del tiempo, más apreciable en la fracción inorgánica disuelta (NO_3^-) que pasó desde $332 \mu\text{g N L}^{-1}$ tras el deshielo hasta $83 \mu\text{g N L}^{-1}$ al final de la estación libre de hielo. La proporción de NO_3^- se situó generalmente entre el 50-65% respecto al total, excepto en la última fase del periodo de estudio (tras el 24 de septiembre) en que representó <40%.

La concentración de PT osciló desde <1 hasta $8,9 \mu\text{g P L}^{-1}$, siendo su valor promedio de $4,1 \mu\text{g P L}^{-1}$. La proporción de fósforo disuelto (PDT) alcanzó los valores más elevados en el deshielo y al final de la estación libre de hielo, representando respectivamente un 75 – 72% del PT, pero fue muy variable a lo largo de todo el periodo estudiado. El fósforo inorgánico soluble (SRP), con valores comprendidos entre $<1 - 1,7 \mu\text{g P L}^{-1}$, varió entre un 6 – 69% del PT, siendo la proporción más elevada en el deshielo y la más baja en el periodo central del verano. La razón DIN:PT fue >60 a lo largo de todo el periodo de estudio.

Estructura biológica de la comunidad nanoplanctónica del lago

La estructura biológica de la comunidad algal se estudió sobre variables de agregación (abundancia, concentración de clorofila), y sobre variables que representan propiedades emergentes al incluir información de la composición taxonómica (diversidad, equitatividad).

Considerando variables de agregación, la estructura de la comunidad algal mostró una acusada variación estacional (Fig. 3-8), con valores comprendidos entre un mínimo observado tras el deshielo ($0,7 \mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$, $<200 \text{ células ml}^{-1}$), hasta el máximo observado en dos momentos diferentes (23 de julio: $3,5 \mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$, $\sim 12000 \text{ células ml}^{-1}$; 1 de septiembre: $3,5 \mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$, $\sim 12500 \text{ células ml}^{-1}$). Tras el máximo detectado el 1 de septiembre, los valores disminuyeron hasta $0,8 \mu\text{g Chl } a \text{ L}^{-1}$ y $\sim 2000 \text{ células ml}^{-1}$ al final del periodo de estudio (Fig. 3-8).

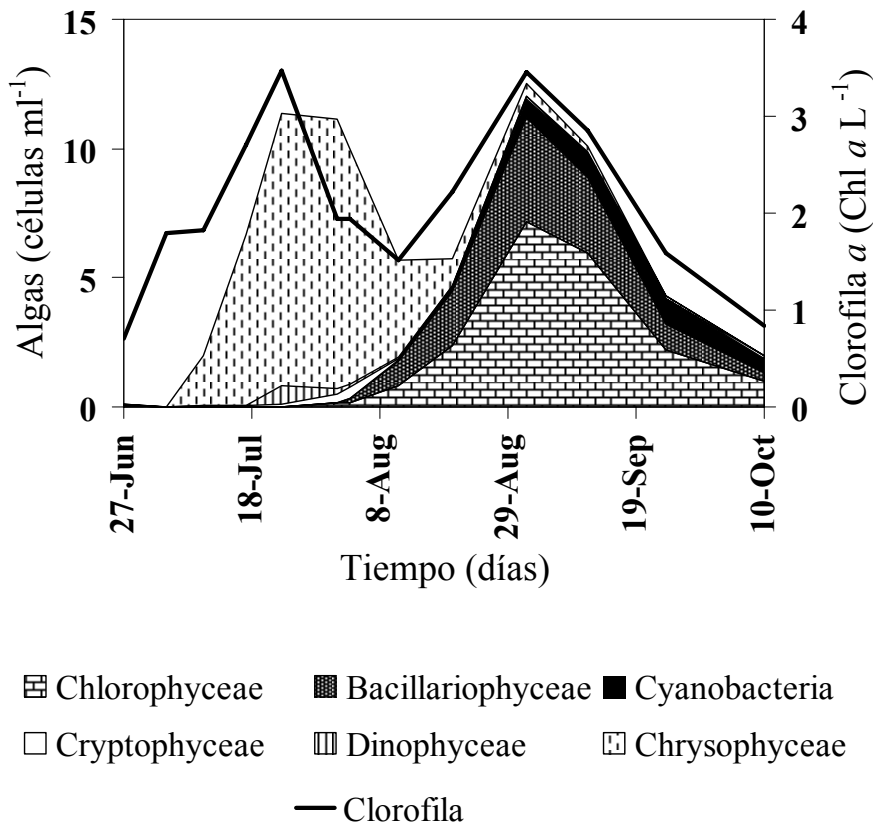


Figura 3-8. Abundancia de los diferentes grupos de algas y concentración de clorofila *a* en el lago de La Caldera a lo largo del periodo de estudio.

La comunidad algal en el lago de La Caldera estuvo compuesta por especies nanoplánctónicas. Al comienzo de la estación libre de hielo, las especies que se observaron fueron el dinoflagelado *Amphydinium sp.* ($\sim 23 \mu\text{m}^3$), la criptoficea *Rhodomonas sp.* ($\sim 53 \mu\text{m}^3$) y formas de resistencia identificadas como quistes de crisofíceas, que suponían el 30% del total de las formas algales. Desde principios de julio la desaparición de las formas de resistencia dio paso al incremento en la abundancia de la crisofíceas flagelada *Chromulina nevadensis* (tamaño promedio celular de $7,15 \pm 2,98 \mu\text{m}^3$), que a mediados julio constituyó más del 90% del total de células. A principios de agosto, la composición específica de la comunidad algal cambió hacia la dominancia de algas no flageladas, donde la especie más abundante

fue la cloroficea *Dictyosphaerium chlorelloides* (tamaño promedio celular de $5,95 \pm 1,60 \mu\text{m}^3$), seguida de la bacilarioficea *Cyclotella sp.* ($\sim 97 \mu\text{m}^3$) y la cianobacteria *Cyanarcus sp.* ($\sim 8 \mu\text{m}^3$). Así, a mediados de agosto, *D. chlorelloides* y *Cyclotella sp.* representaron el 41% y el 37% respectivamente de la abundancia total de la comunidad, mientras que *Cyanarcus sp.* incrementó su proporción hasta el 28% hacia el final del periodo de estudio.

Tanto la diversidad como la equitatividad de la comunidad algal mostraron fuertes fluctuaciones durante el primer mes del periodo de estudio (Fig. 3-9), pero los valores de ambas variables se estabilizaron a comienzos de agosto, cuando se alcanzaron los valores más elevados, situándose generalmente el índice de Shannon a partir de ese momento entre 1,5 y 2 bits ind^{-1} (Fig. 3-9).

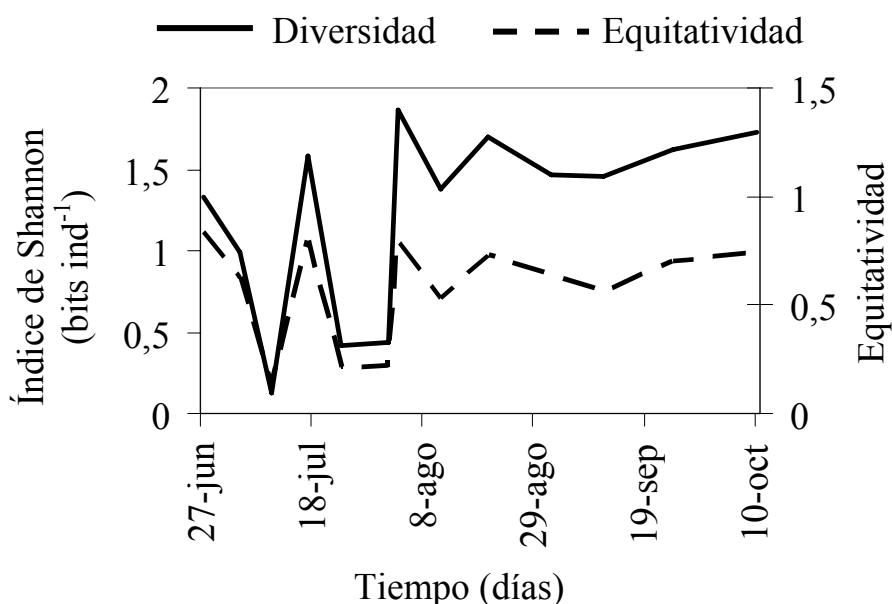


Figura 3-9. Variación estacional de la diversidad (índice de Shannon) y equitatividad algal en el lago de La Caldera a lo largo del periodo de estudio.

En relación con la estructura del bucle microbiano heterotrófico, la comunidad viral estuvo compuesta por partículas de 60 nm de diámetro en promedio, mientras que la comunidad de bacterias heterotróficas estuvo compuesta por

pequeñas células, principalmente por formas cocoides libres ($0,28 \mu\text{m}$ de diámetro promedio, $0,01 \pm 0,004 \mu\text{m}^3$) y secundariamente por formas bacilares ($0,9 \mu\text{m}$ de longitud media y $0,3 \mu\text{m}$ de anchura media; $0,05 \pm 0,02 \mu\text{m}^3$) y por bacterias filamentosas ($0,18 \pm 0,07 \mu\text{m}^3$) casi inexistentes. Durante el mes de agosto, las abundancias bacteriana y viral alcanzaron respectivamente valores de hasta $\sim 3 \times 10^6$ bacterias ml^{-1} y $\sim 4 \times 10^6$ partículas virales ml^{-1} , mostrando una tendencia hacia una menor abundancia durante el mes de septiembre, de forma que al final del periodo de estudio se encontraron $\sim 1,6 \times 10^6$ bacterias ml^{-1} y $\sim 1,9 \times 10^6$ partículas virales ml^{-1} (Fig. 3-10).

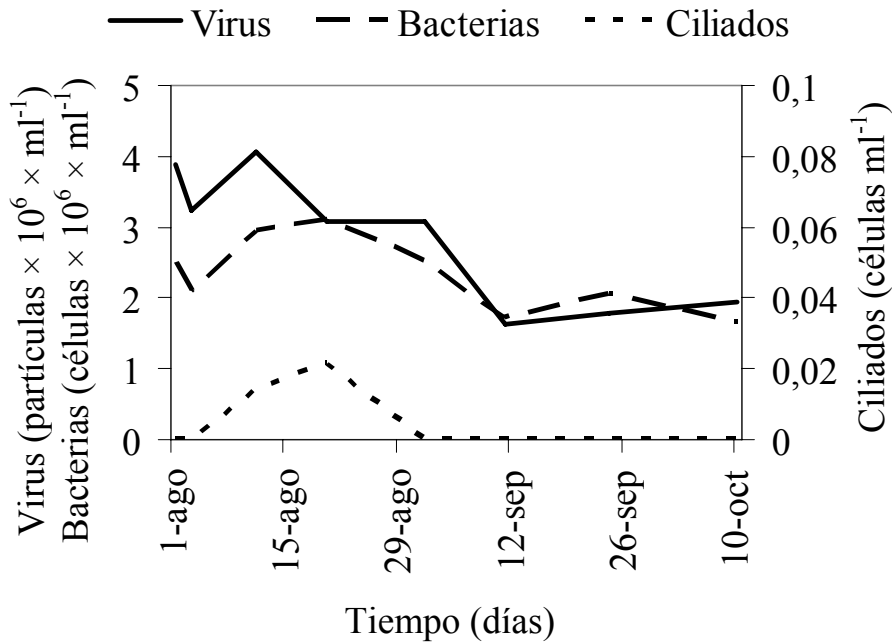
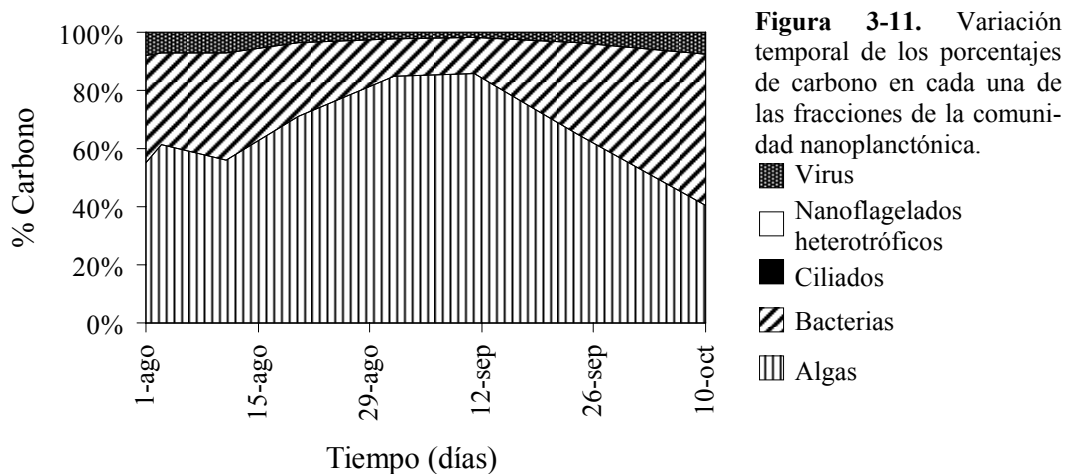


Figura 3-10. Abundancia de partículas virales, bacterias y ciliados en el lago de La Caldera a lo largo del periodo de estudio.

La comunidad de protistas heterotróficos tuvo una menor representación, puesto que no se detectaron nanoflagelados heterotróficos en todo el periodo de estudio y la comunidad de ciliados (*oligotrichidae*) sólo fue detectable los días 11 y 20 de agosto, con abundancias siempre inferiores a 1 célula ml^{-1} (Fig. 3-10).

Proporción del carbono entre los componentes de la red trófica microbiana

Generalmente, más del 50% de la biomasa total de la comunidad nanoplanctónica estuvo contenido en la fracción algal (Fig. 3-11), superando el 85% de la biomasa total durante la fase central del periodo libre de hielo. Las bacterias representaron entre el 12 y el 37% del biomasa total de la comunidad nanoplanctónica (excepto el 10 de octubre con ~50% de la biomasa total). Los ciliados no superaron el 0,01% de la biomasa total, mientras que las partículas virales representaron entre el 1,6 y 8,1% de la biomasa nanoplanctónica, con una contribución relativa mayor coincidiendo con el menor dominio algal (Fig. 3-11).



Estequiometría y función de la comunidad nanoplanctónica del lago

La concentración de P de la fracción particulada >1 μm fue < 2 $\mu\text{g P L}^{-1}$, la razón C:P estuvo comprendida entre 180 y 320, mientras que la razón N:P se situó entre 31 y 65. Los valores de ambas razones fueron generalmente más altos en la segunda mitad del periodo de estudio (Tabla 3-5).

En relación a la fracción particulada <1 μm , la concentración de P generalmente fue <1 $\mu\text{g P L}^{-1}$. Los valores de la razón N:P estuvieron comprendidos

entre 30 y 90, con importantes fluctuaciones a lo largo del periodo de estudio (Tabla 3-5).

Mientras que las variables estructurales y estequiométricas fueron cuantificadas a lo largo de todo el periodo libre de hielo, las funcionales (PP, PB) solo pudieron ser medidas durante el periodo central del mismo. Los valores de producción primaria total (TOC) y producción primaria particulada (PP) fueron máximos el 1 de agosto (TOC= 5,75 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; PP= 2,4 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y mínimos el 11 de septiembre (TOC= 2,52 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; PP= 0,6 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Los valores de excreción de carbono orgánico de origen fotosintético (EOC) más elevados tuvieron lugar el día 1 de agosto con 3,2 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Al comienzo del periodo de estudio, los valores de EOC fueron superiores a los de PP, por lo que el %EOC fue >50%. Los valores más bajos de EOC se registraron el 1 de septiembre con 0,28 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, representando un 10,5% respecto al TOC (Tabla 3-6).

Tabla 3-5. Variaciones estacionales de concentración fósforo, razón C:P y razón N:P de la fracción particulada >1 μm , así como de concentración fósforo y razón N:P de la fracción particulada <1 μm en lago de La Caldera durante la estación libre de hielo. Valores promedio del integrado de la columna de agua junto con su desviación estándar. n.m. no medido.

Fecha	P particulado >1 μm ($\mu\text{g P L}^{-1}$)	C:P particulado >1 μm	N:P particulado >1 μm	P particulado <1 μm ($\mu\text{g P L}^{-1}$)	N:P particulado <1 μm
27-jun	0,7 ± 0,09	252,9 ± 22,7	77,8 ± 9,7	nm	nm
04-jul	1,7 ± 0,08	234,9 ± 20,0	63,0 ± 7,6	nm	nm
10-jul	1,5 ± 0,09	263,7 ± 9,8	48,4 ± 5,8	nm	nm
17-jul	1,8 ± 0,13	252,9 ± 22,7	49,6 ± 9,7	nm	nm
23-jul	1,8 ± 0,06	187,7 ± 8,2	42,8 ± 8,0	nm	nm
01-ago	1,8 ± 0,41	191,8 ± 26,3	45,0 ± 2,1	1,1 ± 0,10	47,14 ± 2,24
03-ago	1,6 ± 0,08	266,3 ± 3,9	43,9 ± 7,6	0,7 ± 0,04	31,75 ± 9,06
11-ago	1,2 ± 0,04	186,1 ± 20,0	37,0 ± 7,3	1,1 ± 0,17	29,33 ± 0,01
20-ago	1,7 ± 0,08	228,8 ± 6,4	44,2 ± 0,6	0,8 ± 0,01	66,82 ± 8,91
01-sep	1,3 ± 0,40	278,2 ± 49,2	61,4 ± 12,8	0,5 ± 0,27	64,09 ± 5,78
11-sep	1,2 ± 0,15	265,3 ± 3,9	55,1 ± 10,1	0,2 ± 0,12	41,92 ± 2,24
24-sep	1,2 ± 0,06	248,3 ± 32,1	51,9 ± 8,7	0,4 ± 0,15	89,76 ± 2,97
10-oct	1,3 ± 0,09	289,2 ± 29,4	77,0 ± 16,5	0,7 ± 0,07	35,07 ± 5,94

Tabla 3-6. Variaciones estacionales de producción primaria total (TOC) y particulada (PP), tasa de excreción de carbono orgánico de origen fotosintético (EOC) y %EOC en relación a TOC, en lago de La Caldera durante la estación libre de hielo. Valores promedio del integrado de la columna de agua junto con su desviación estándar.

Fecha	TOC ($\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	PP ($\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	EOC ($\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	%EOC
01-ago	5,75 \pm 1,28	2,43 \pm 0,36	3,22 \pm 0,58	56,7 \pm 4,4
03-ago	3,89 \pm 0,30	2,12 \pm 0,53	1,74 \pm 0,26	77,1 \pm 0,4
11-ago	2,57 \pm 1,36	0,99 \pm 0,41	0,57 \pm 0,05	24,0 \pm 11,1
20-ago	5,48 \pm 0,78	1,98 \pm 0,12	2,27 \pm 0,18	43,4 \pm 13,2
01-sep	2,83 \pm 0,27	1,72 \pm 0,03	0,28 \pm 0,19	10,5 \pm 7,8
11-sep	2,52 \pm 0,43	0,64 \pm 0,08	0,79 \pm 0,06	31,9 \pm 5,7

Tabla 3-7. Variaciones estacionales de producción bacteriana (PB), eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA), eficiencia de uso de carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb) y requerimientos de carbono de origen fotosintético por las bacterias (CARB), en lago de La Caldera durante la estación libre de hielo. Valores promedio del integrado de la columna de agua junto con su desviación estándar.

Fecha	PB ($\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	%PEA ($\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	%CUEb ($\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	CARB ($\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
01-ago	0,026 \pm 0,005	5,8 \pm 3,1	0,01 \pm 0,001	0,39 \pm 0,27
03-ago	0,034 \pm 0,005	6,4 \pm 2,2	0,02 \pm 0,001	0,44 \pm 0,24
11-ago	0,029 \pm 0,000	7,1 \pm 1,9	0,05 \pm 0,004	0,39 \pm 0,03
20-ago	0,028 \pm 0,003	6,0 \pm 1,6	0,02 \pm 0,010	0,39 \pm 0,07
01-sep	0,071 \pm 0,003	16,2 \pm 1,6	0,22 \pm 0,096	0,45 \pm 0,05
11-sep	0,065 \pm 0,005	3,0 \pm 0,4	0,08 \pm 0,006	2,21 \pm 0,27

La producción bacteriana permaneció estable en torno a valores de $0,03 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ hasta el día 20 de agosto, duplicando su actividad ($0,07 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) hacia el final del periodo estudiado (Tabla 3-6). La eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA) y la eficiencia de uso de carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb) mostraron valores bajos al comienzo del periodo de estudio (%PEA=5,8%, %CUEb=0,01), incrementando hasta un valor máximo el 1 de

septiembre (%PEA=16,2%, %CUEb=0,22). Tras ese momento, los valores experimentaron un fuerte descenso hasta un 3% de %PEA y un 0,08 de %CUEb al final del periodo de estudio de estas variables. Los requerimientos de carbono orgánico de origen fotosintético por las bacterias (CARB) fueron de $<1 \mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ excepto al final del periodo de estudio cuando se encontraron requerimientos de $2,21 \mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Tabla 3-7).

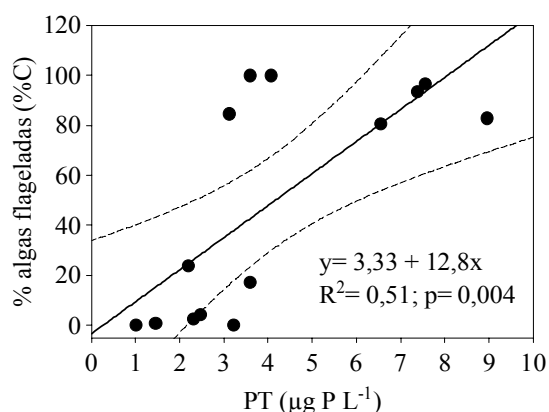


Figura 3-12. Relación entre la concentración de fósforo total (PT) y el porcentaje de algas flageladas respecto al total de carbono algal. La línea sólida representa a la recta de regresión, mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados.

Control biótico y abiótico de la comunidad nanoplanctónica

La respuesta de la comunidad algal frente a factores bióticos y abióticos fue distinta a nivel estructural, funcional y fisiológico. El porcentaje (en biomasa) de algas flageladas, variable estructural relacionada con la composición específica de la comunidad algal, estuvo significativa y positivamente relacionado sólo con la concentración de PT (Fig. 3-12). Entre las variables estructurales de agregación, la biomasa algal tuvo una relación negativa no significativa con el PT y fósforo reactivo soluble (SRP), siendo significativa con este último (Fig. 3-13 A, B). Sin embargo, en el caso de variables funcionales de la comunidad algal, la producción primaria se relacionó directa y significativamente con la concentración de P particulado $>1 \mu\text{m}$ (Fig. 3-13 C). El diferente signo de estas relaciones según si la variable algal es

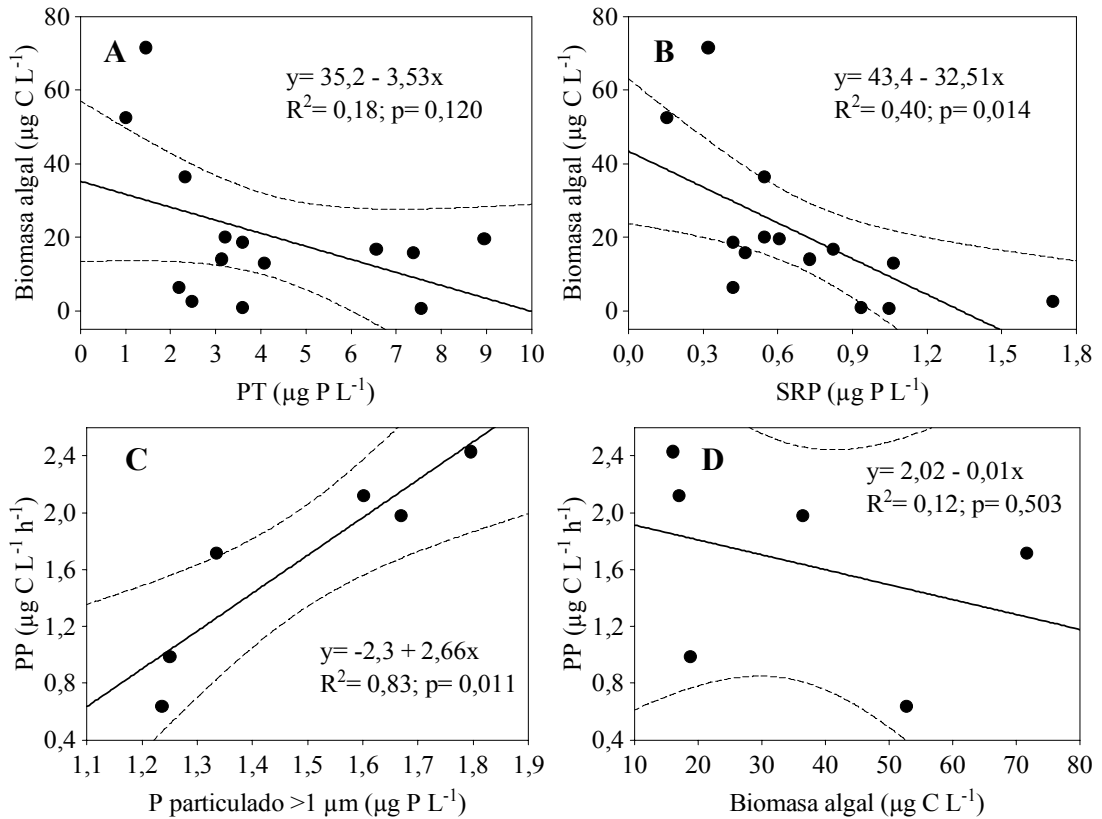


Figura 3-13. Relaciones entre la concentración de fósforo total (PT) y fósforo reactivo soluble (SRP) frente a biomasa algal, entre fósforo particulado $>1 \mu\text{m}$ y producción primaria (PP) y entre la biomasa algal y PP. Las líneas sólidas representan a las rectas de regresión, mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados.

biomasa (negativo) o PP (positivo), tuvo reflejo en la ausencia de relación entre la biomasa algal y la producción primaria (Fig. 3-13 D). Las variables indicadoras del estado fisiológico de las algas se relacionaron solo con el coeficiente de atenuación vertical de la luz entre todos los factores abióticos analizados. Así, los coeficientes de atenuación vertical (K_d) de la radiación UV-A y UV-B estuvieron relacionados directa y significativamente con la razón clorofila:biomasa algal y con la tasa de crecimiento (Fig. 3-14).

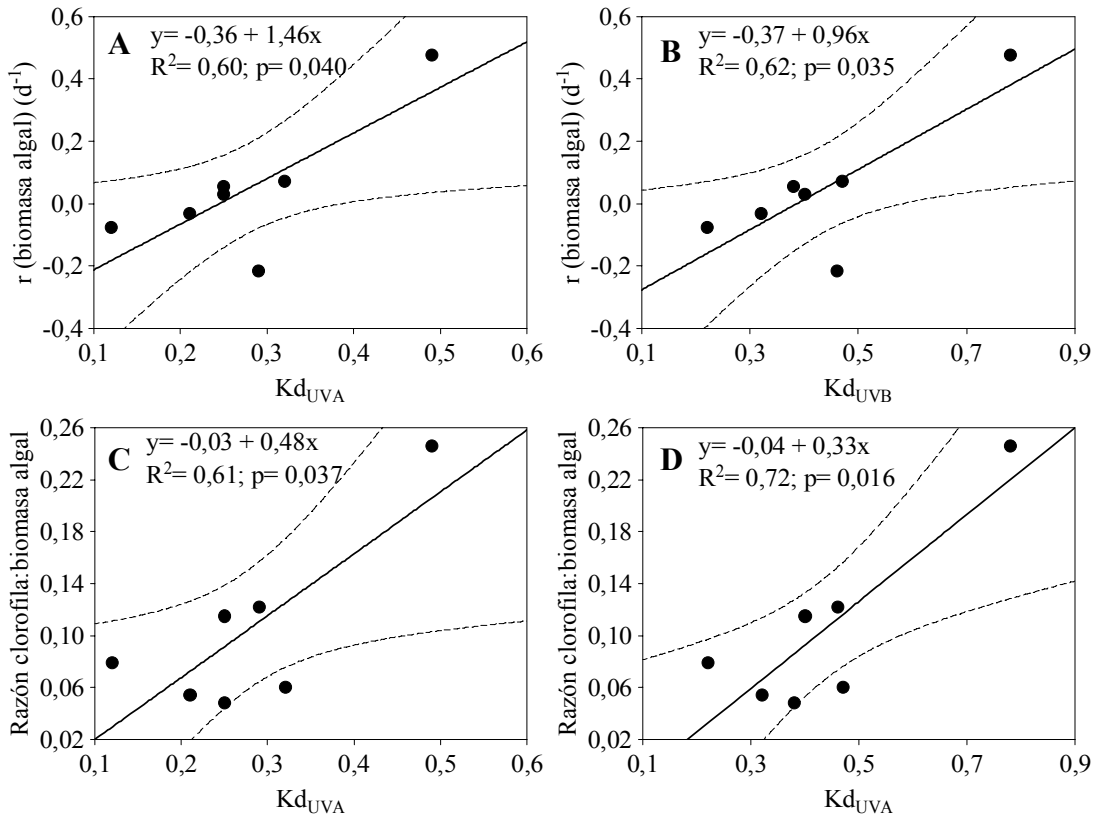


Figura 3-14. Relación entre el coeficiente de atenuación vertical de radiación UV-A (Kd_{UVA}) y de radiación UV-B (Kd_{UVB}) frente a la tasa de crecimiento (r) de biomasa algal y a la razón clorofila:biomasa algal. Las líneas sólidas representan a las rectas de regresión, mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados.

Dentro del bucle microbiano heterotrófico, la abundancia de virus estuvo correlacionada positiva y significativamente con variables bióticas como la abundancia bacteriana y el P particulado $<1 \mu m$, así como con variables abióticas como la Kd de la radiación UV-B (Fig. 3-15). Un análisis de regresión múltiple desveló que Kd_{UVB} es la variable que explica una mayor varianza de la abundancia viral (Tabla 3-8).

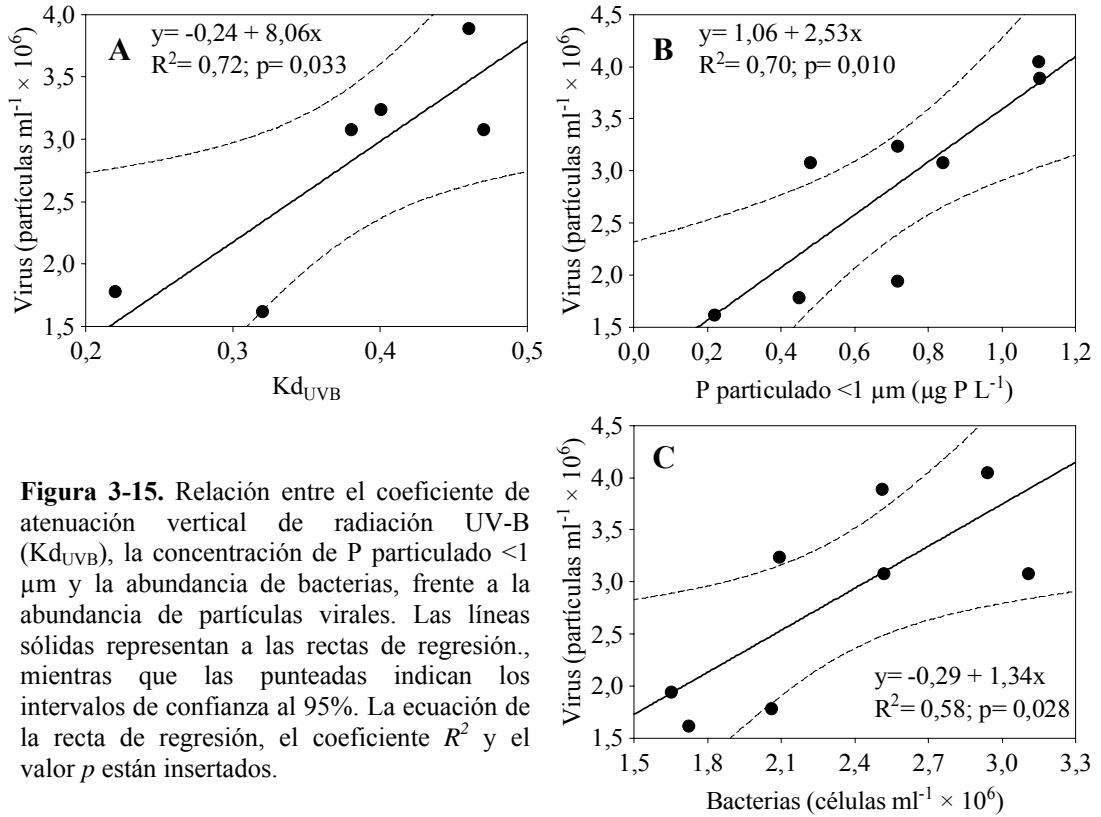


Figura 3-15. Relación entre el coeficiente de atenuación vertical de radiación UV-B (Kd_{UVB}), la concentración de P particulado $<1 \mu m$ y la abundancia de bacterias, frente a la abundancia de partículas virales. Las líneas sólidas representan a las rectas de regresión, mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados.

Tabla 3-8. Resultados del análisis de regresión múltiple para la abundancia de de partículas virales y para la razón producción primaria:producción bacteriana (PP:PB). *Beta*, coeficiente estandarizado de la regresión; R^2 múltiple, coeficiente de múltiple determinación; R^2 cambio, cambio en R^2 múltiple generado al introducir una nueva variable en un paso simple (análisis jerárquico); *gl-1*, *gl-2*, grados de libertad; $F_{(gl-1,gl-2)}$, resultados del test F de la relación entre la variable dependiente y el conjunto de variables independientes introducidas en el análisis. Kd_{UVB} , coeficiente de atenuación difusa de la radiación UV-B.

Variables respuesta	Variables predictoras	Beta	R^2 múltiple	R^2 cambio	gl-1	gl-2	$F_{(gl-1,gl-2)}$	p
Abundancia viral	Kd_{UVB}	0,85	0,72	0,72	1	4	10,29	0,032
PP:PB	P particulado $>1 \mu m$	0,99	0,99	0,99	1	3	3158,3	$<0,001$

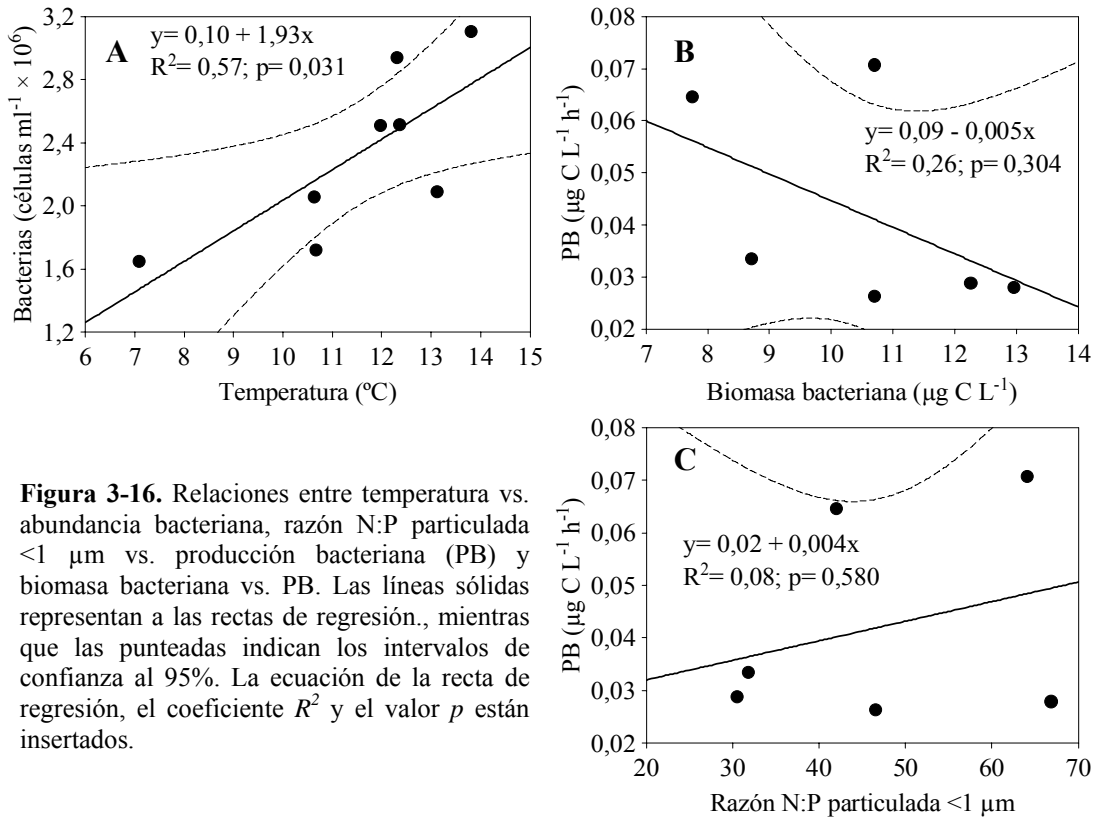


Figura 3-16. Relaciones entre temperatura vs. abundancia bacteriana, razón N:P particulada <1 µm vs. producción bacteriana (PB) y biomasa bacteriana vs. PB. Las líneas sólidas representan a las rectas de regresión., mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados.

En relación a la comunidad bacteriana, la abundancia de bacterias sólo se relacionó (positivamente) con la temperatura (Fig. 3-16 A) de entre las variables abióticas estudiadas. Sin embargo, la producción bacteriana no fue explicada por ninguna variable abiótica, ni por variables estructurales y estequiométricas bacterianas como la biomasa y la razón N:P particulada <1 µm (Fig. 3-16 B, C).

Respecto a la interacción alga-bacteria, no se detectaron relaciones significativas a nivel estructural entre biomasa algal y bacteriana, ni a nivel funcional entre PP y PB (Fig. 3-17 A, B). La PB tampoco se relacionó con la excreción de carbono fotosintético (Fig. 3-17 C), pero sí se relacionó positiva y significativamente con variables estructurales como la biomasa algal y la razón alga:bacteria (Fig. 3-18 A, B). Igualmente la PB se relacionó positivamente con la eficiencia de uso de

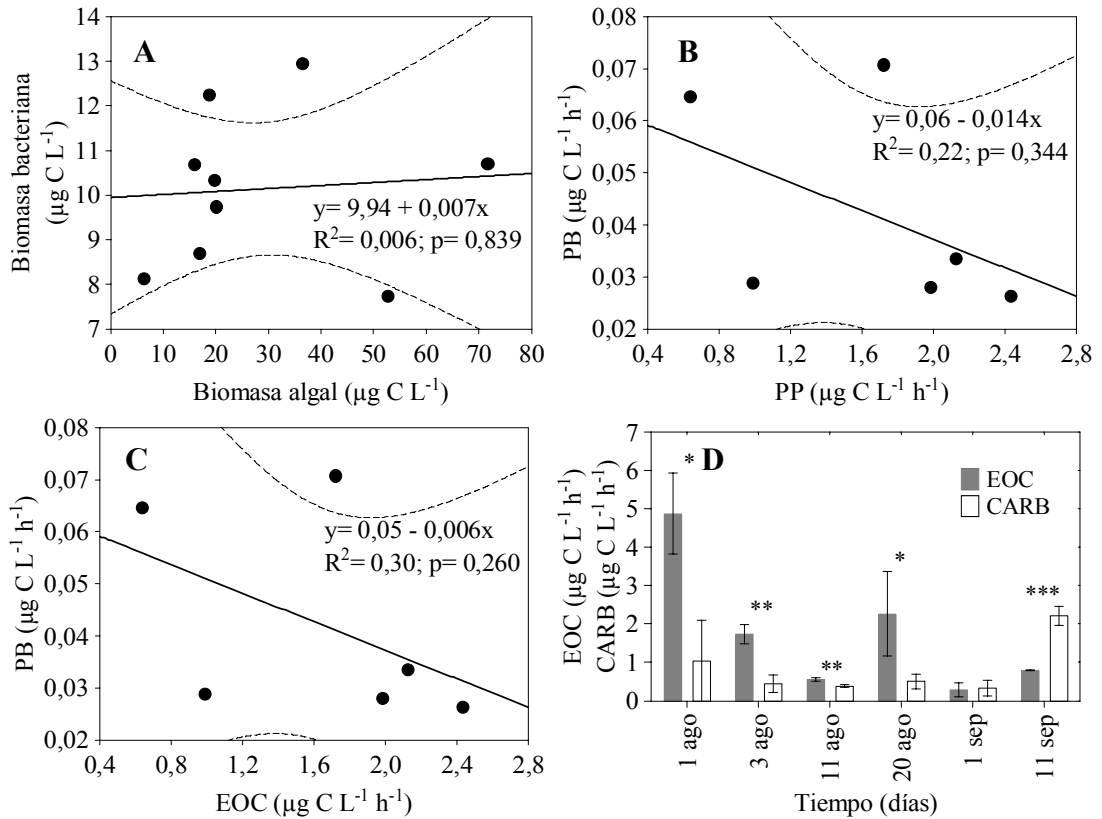


Figura 3-17. Relaciones entre biomasa algal vs. biomasa bacteriana, producción primaria (PP) vs. producción bacteriana (PB) y entre la tasa de excreción de carbono orgánico de origen fotosintético (EOC) y PB. Las líneas sólidas representan a las rectas de regresión., mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados. Adicionalmente se muestra la comparación mediante análisis t de Student entre EOC y los requerimientos de carbono fotosintético por las bacterias (CARB) a lo largo del periodo de estudio. Las barras de error indican la desviación estándar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb) (Fig. 3-18 C), que a su vez estuvo directamente relacionada con la eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA) (Fig. 3-18 D). La excreción de carbono orgánico algal (EOC) fue superior o no significativamente distinta de los requerimientos de carbono orgánico de origen fotosintético por las bacterias (CARB), excepto el último día en que estas variables fueron medidas (Fig. 3-17 D).

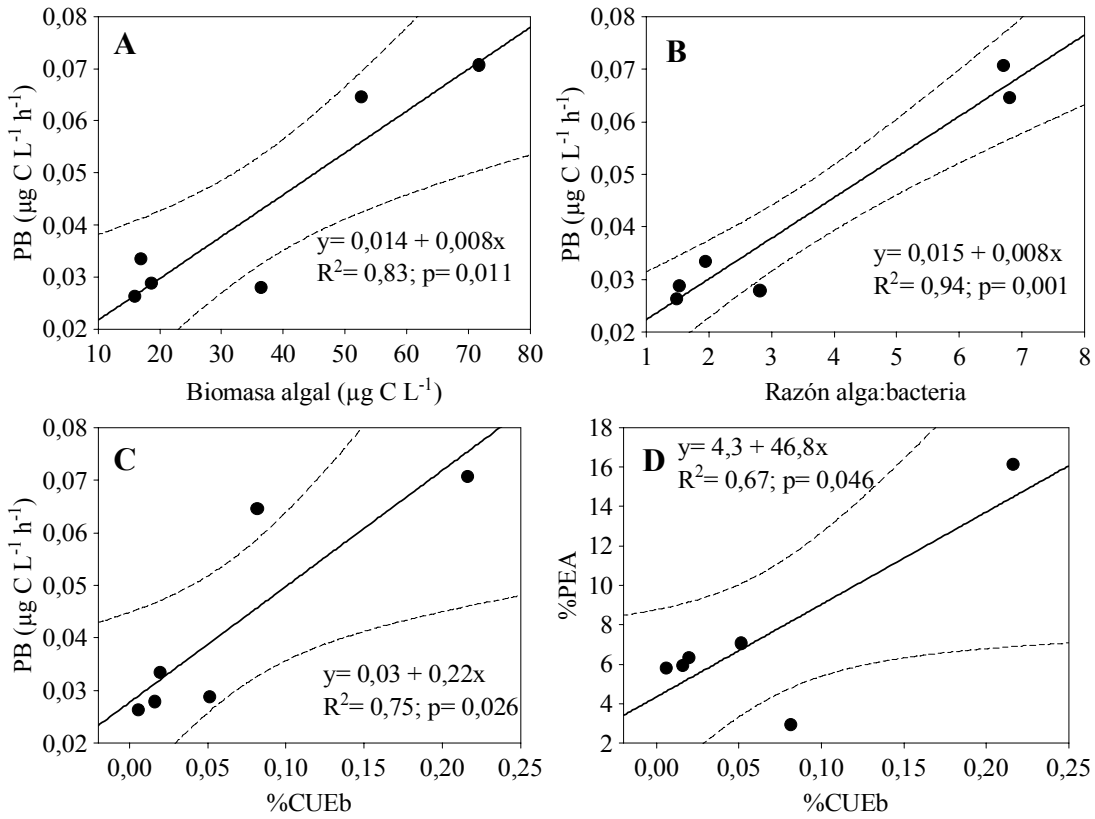


Figura 3-18. Relaciones entre biomasa algal vs. producción bacteriana (PB), razón alga:bacteria (en biomasa) vs. PB, proporción de C algal transformado en producción bacteriana (%CUEb) vs. PB, y entre %CUEb vs. porcentaje de exudados algales incorporados por las bacterias (%PEA). Las líneas sólidas representan a las rectas de regresión., mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados.

En relación al predominio de los procesos de fotosíntesis respecto a los de producción bacteriana, la razón PP:PB estuvo directamente relacionada con la K_d de la radiación UV-B y con la concentración de P en la fracción particulada $>1 \mu\text{m}$ (Fig. 3-19). Un análisis de regresión múltiple desveló que P particulado $>1 \mu\text{m}$ es la variable que explica una mayor varianza de la razón PP:PB (Tabla 3-8).

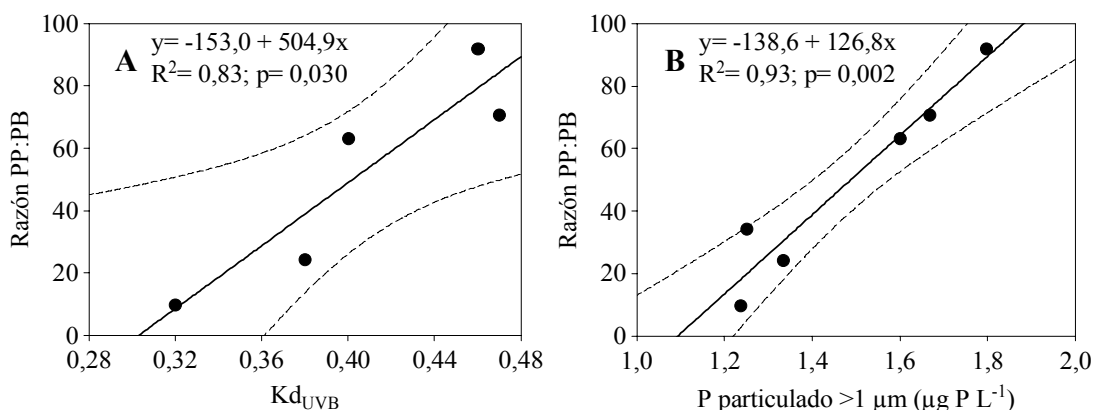


Figura 3-19. Relación entre el coeficiente de atenuación vertical de radiación UV-B ($K_{d_{UVB}}$) y la concentración de P particulado $>1 \mu m$ frente a la razón producción primaria:producción bacteriana (PP:PB). Las líneas sólidas representan a las rectas de regresión, mientras que las punteadas indican los intervalos de confianza al 95%. La ecuación de la recta de regresión, el coeficiente R^2 y el valor p están insertados.

Discusión

El presente estudio se enmarca y contribuye a una base de datos interanual sobre las dinámicas biogeoquímicas de la laguna de La Caldera, ecosistema modelo que ha sido objeto de estudio durante las últimas 3 décadas (Martínez 1977, Cruz-Pizarro 1981, Carrillo 1989, Reche 1995, Villar Argai 1999, Medina-Sánchez 2002, Pulido-Villena 2004) dada su sensibilidad al cambio global por su condición de lago de alta montaña (Sommaruga y Psenner 2001).

En relación a las características físicas del lago, es interesante destacar el establecimiento de una fase de estratificación térmica de un mes de duración, rasgo que no ha sido descrito con anterioridad en este ecosistema. Contrariamente, el ambiente químico no muestra diferencias significativas con años anteriores. Los altos valores de pH obtenidos, consecuencia de la escasa capacidad de amortiguación del sistema tampón carbónico-carbonato, es una característica de estos ecosistemas de alta montaña (Straškrabová et al. 1999a). El patrón de disponibilidad de nutrientes fue consistente con el descrito en estudios previos (Carrillo et al. 1996, Villar-Argaiz

et al. 2002; Medina-Sánchez et al. 2002) donde la razón DIN:PT>12 indica una fuerte limitación por fósforo (Morris y Lewis, 1988). Es llamativa la disminución en la concentración de nitrógeno inorgánico a lo largo de la estación libre de hielo, característica observada en este ecosistema (Carrillo et al. 1996, Villar-Argaiz et al. 2001).

Estructura y función de la comunidad algal

La comunidad algal del lago de La Caldera durante el año 2003 estuvo dominada por especies de tamaño nanoplanctónico, lo cual es característico de este lago (Martínez 1977, Sánchez-Castillo et al. 1989, Reche et al. 1994, Carrillo et al. 1995, Medina-Sánchez et al. 1999) y en general de ecosistemas oligotróficos (Reynolds 1984, Psenner y Zapf 1990). Por el contrario, la ausencia de picoplancton autótrofo, un rasgo propio de este sistema (Reche et al. 1994, Carrillo et al. 1995, Medina-Sánchez et al. 1999), contrasta con su generalizada distribución en lagos de alta montaña y ambientes ultraoligotróficos (Callieri et al. 2001). Medina-Sánchez et al. (2004) propusieron que esta comunidad, al ser más sensible frente a UVR, podría ser desplazada por especies de algas mixótrofas.

El cambio observado en la composición específica de las algas, desde especies flageladas a no flageladas, constituye un patrón muy documentado durante la mayor parte de los años estudiados (Martínez 1977, Carrillo et al. 1995, Medina-Sánchez et al. 1999). La dominancia de *Chromulina nevadensis* cuando la comunidad está dominada por algas flageladas coincide con los estudios previos realizados en este ecosistema (Martínez 1977, Carrillo et al. 1990, Medina-Sánchez et al. 2004). Sin embargo, *Dictyosphaerium chorelloides* no siempre ha sido la especie dominante en los periodos en que dominan las algas no flageladas; nuestros resultados confirman la tendencia interanual hacia un cambio en la dominancia de las algas no flageladas desde *Cyanarcus sp.* (Martínez 1977, Carrillo et al. 1995) hasta *D. chlorelloides* (Medina-Sánchez et al. 1999).

La diversidad de la comunidad algal alcanzó los valores máximos coincidiendo con la dominancia de las algas no flageladas, debido a una mayor riqueza de especies como consecuencia del mantenimiento de las algas flageladas (Fig. 3-8), y a una mayor equitatividad durante la segunda mitad del periodo de estudio (Fig. 3-9). Los máximos valores de diversidad en torno a 1,6 bits ind⁻¹ detectados en nuestro estudio, resultan alejados de los máximos encontrados dentro de una variedad de ecosistemas oligotróficos marinos y de agua dulce, que llegan a alcanzar valores de ~5 bits ind⁻¹ (Margalef 1980). Los cambios en la diversidad de especies, junto con la transición desde una dominancia de algas flageladas hasta no flageladas, independientemente de las especies que la protagonicen, implican una modificación metabólica importante, puesto que las especies flageladas se identifican con organismos mixótrofos, mientras que las no flageladas se corresponden con autótrofos estrictos (Medina-Sánchez et al. 2004). Por este motivo es importante conocer los factores que afectan a esta sucesión estacional de grupos algales, así como a la diversidad del conjunto de la comunidad algal.

Interesantemente, el cambio de especies en nuestro estudio se produjo de forma simultánea a la desaparición de una estratificación térmica de la columna de agua. En este sentido, se conoce que los cambios entre periodos de estabilidad y de mezcla de la columna de agua favorecen cambios en la composición algal que dependen de la movilidad y flotabilidad de las especies (Winder y Hunder 2008). Sin embargo, esta estratificación térmica de larga duración en el lago de La Caldera nunca se ha detectado con anterioridad a este estudio, por lo que el consistente patrón de cambio de las especies de algas no solo se relaciona con la estabilidad de la columna de agua. A partir del análisis interanual, establecemos que la proporción de algas flageladas tiende a relacionarse negativamente con la concentración de PT, a la vez que se establece una relación inversa entre la profundidad máxima del lago y la concentración de PT (Fig. 3-4). Las variaciones interanuales en la concentración de PT del lago dependen de procesos de resuspensión del sedimento, favorecidos por las turbulencias generadas en años de sequía con una escasa profundidad, concordando con lo propuesto en previos estudios (Medina-Sánchez et al. 1999). Más aún, se ha demostrado que la deposición seca de polvo sahariano contribuye al incremento de la concentración de P en el ecosistema (Villar-Argaiz et al. 2001, Morales-Baquero et

al. 2006). Según esta observación, ante un incremento en la frecuencia de procesos de sequía y de transporte de aerosoles (Escudero et al. 2005), sería esperable que en los lagos de alta montaña cobre cada vez más importancia relativa el grupo funcional de las algas autótrofas estrictas en detrimento de las especies mixótrofas. Sin embargo es sorprendente que sobre la escala de este estudio, una mayor concentración de fósforo determinara la mayor contribución relativa de algas flageladas.

Otro factor abiótico como la radiación UV ejerció efectos perjudiciales al disminuir la tasa de crecimiento de las algas, así como el contenido de clorofila en relación a su biomasa, variables sensibles a un daño a nivel fisiológico, de acuerdo con lo encontrado en otros ecosistemas (Buma et al. 2003). Sin embargo, el efecto negativo UVR no se transfirió a variables estructurales como la abundancia o biomasa algal. Por tanto, de los resultados contradictorios entre distintas escalas temporales del efecto del P sobre la composición taxonómica algal, y de la diferente respuesta de las algas a nivel fisiológico y estructural frente a factores abióticos (UVR y nutrientes), surge la necesidad de establecer experimentalmente el papel que UVR y las entradas de nutrientes limitantes ejercen conjuntamente sobre los diferentes niveles de organización de la comunidad algal, aspecto que se tratará en los capítulos 4 y 5.

La diferente relación entre la disponibilidad de nutrientes y variables funcionales (PP, positiva) y estructurales (biomasa, negativa), probablemente determinó la ausencia de relación entre la biomasa algal y la producción primaria. En esta falta de relación, podría jugar un papel importante la existencia de un control de depredación por el zooplancton, consumiendo la nueva producción primaria e impidiendo su acumulación en forma de biomasa algal (Bullejos et al. *datos en preparación*). Estos resultados soportarían la aplicación a la comunidad algal del modelo propuesto por Billen et al. (1990), que explica la falta de relación entre producción y biomasa bacterianas como un efecto de la depredación.

Desde un punto de vista estequiométrico, es especialmente llamativa la baja razón C:P particulada en comparación con la encontrada en un gran número de ecosistemas oligotróficos (Sterner et al. 1997). Con objeto de dilucidar el mecanismo

fisiológico que determina la baja razón C:P particulada en este ecosistema, analizaremos la relación existente entre las respuestas a nivel estructural, fisiológico y estequiométrico de la comunidad algal en el Capítulo 5 de esta Tesis Doctoral.

Estructura y regulación del bucle microbiano

La estructura de la comunidad nanoplanctónica del lago de La Caldera se desvió de la tendencia general establecida de un predominio del bucle microbiano heterotrófico sobre la fracción autotrófica en ecosistemas oligotróficos (Gasol et al. 1997, Biddanda et al. 2001, Cotner y Biddanda 2002). Sin embargo, es similar a la encontrada en ecosistemas oligotróficos como el océano Antártico (Anadon y Estrada 2002, Duarte et al. 2005), en lagos boreales (Elser et al. 2003) y en lagos de alta montaña (Medina-Sánchez et al. 2004). Se detectaron abundancias situadas dentro del rango registrado en lagos alpinos europeos tanto de partículas virales (Wommarrck y Colwel 2000), cuantificadas en La Caldera por primera vez en este estudio, como de bacterias (Thomas et al. 1991, Straškrabová et al. 1999a). El tamaño celular de éstas se encontró en el extremo inferior del rango característico de ecosistemas oligotróficos (Ochs et al. 1995), similar a lo encontrado previamente en el lago de La Caldera (Medina-Sánchez et al. 1999, 2004). Factores abióticos como la baja temperatura, la radiación UV o la limitación crónica en nutrientes, que caracterizan a estos ecosistemas extremos, o interacciones biológicas como la competencia (Carrillo et al. 2008b), depredación (Medina-Sánchez et al. 2004, Duarte et al. 2005) o el control por comensalismo (Medina-Sánchez et al. 2002), podrían ser los responsables de la baja contribución bacteriana y del conjunto del bucle microbiano heterotrófico a la biomasa total del nanoplancton.

En nuestro estudio encontramos una relación directa entre temperatura y abundancia bacteriana. Sin embargo, este factor no ha explicado con anterioridad las variaciones estacionales e interanuales de la abundancia o biomasa bacteriana en el lago de La Caldera (Medina-Sánchez et al. 2004). UVR fue el único factor abiótico controlador de la abundancia viral, concordando con los estudios experimentales que pusieron de manifiesto la sensibilidad de los virus frente a este factor en ecosistemas

de alta montaña (Sommaruga et al. 1999). Sin embargo, la falta de relación entre UVR y las variables bacterianas sugiere una gran aclimatación bacteriana en este ecosistema fuertemente estresado por UVR, de acuerdo con distintos estudios que evidencian que la radiación UV tiene un efecto positivo sobre la PB en ecosistemas con altos flujos de UVR (Kaiser et al. 1997, Davidson y van der Heijden 2000, Carrillo et al. 2002). La relación positiva entre $K_{d_{UVB}}$ vs. razón PP:PB refuerza la idea de que UVR limita los procesos de fijación de C más que los de reciclado. Asimismo, la disponibilidad de P no se relacionó con las variables bacterianas y la relación positiva entre el contenido en P particulado $>1 \mu\text{m}$ y la razón PP:PB indica que son los procesos de fijación de C los que están fundamentalmente limitados por el contenido de P en algas.

En relación a los factores biológicos que pueden controlar a la comunidad bacteriana, la depredación podría ser responsable del desacople encontrado entre estructura, estequiometría y función bacterianas. Este desacople consiste en (i) la falta de relación entre la composición elemental de las bacterias (razón N:P) y PB, como se ha sugerido previamente (Villar-Argaiz et al. 2002); y (ii) la falta de relación entre biomasa y producción bacterianas, como indica el modelo propuesto por Billen et al. (1990), que sería consistente con el control por bacterivoría por algas mixótrofas medido en este ecosistema (Medina-Sánchez et al. 2004). Sin embargo, nuestros resultados no soportan la existencia de un control por bacterivoría ejercido por mixótrofos debido a la escasa densidad de éstos durante el periodo de estudio, ni tampoco por microzooplancton, debido a la escasa presencia de ciliados y nanoflagelados heterotróficos, característica de este ecosistema (Echevarría et al. 1990) salvo en situaciones asociadas a bajas densidades de macrozooplancton (Medina-Sánchez et al. 1999, Carrillo et al. 2008b). La relación positiva entre las abundancias de bacterias y virus indica que la comunidad bacteriana tampoco estuvo controlada por la lisis viral, ya que en ese caso sería esperable una relación negativa. Más bien indica que las partículas virales también estuvieron influenciadas por la disponibilidad de bacterias como recurso. En la misma línea, los virus se relacionaron positivamente con el P de la fracción particulada $<1 \mu\text{m}$, que representa al P contenido en bacterias.

Respecto al posible control bacteriano por un comensalismo, la relación positiva que se estableció entre (i) biomasa algal vs. PB; (ii) razón alga:bacteria vs. PB; y (iii) eficiencia de uso del C fotosintético por las bacterias (%CUEb) y la eficiencia de asimilación bacteriana de exudados fotosintéticos (%PEA), así como entre %CUEb y la PB, soporta que la producción bacteriana depende del flujo de C procedente de las algas (Carrillo et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2002). Sin embargo la falta de relación entre EOC y PB indica la ausencia de un control de las bacterias por comensalismo, que concuerda con el exceso de EOC en relación a los requerimientos de carbono fotosintético para mantener la producción bacteriana (CARB).

La falta de relación encontrada entre algas y bacterias tanto a nivel estructural (abundancia, biomasa) como funcional (PP, PB), contrasta con lo observado en este lago en años anteriores (Fig. 3-20). Variaciones en la abundancia de zooplancton asociadas a acusados cambios interanuales en el volumen de agua del lago pueden ser las determinantes del tipo de interacción alga-bacteria. Así, procesos de concentración de zooplancton (hasta >80 ind L^{-1} en 1992 y 1993, Fig. 3-20), debidos a pérdidas de volumen del lago, pudieron favorecer el establecimiento de una relación positiva entre variables estructurales de algas y bacterias, explicada como una covariación de ambas respecto a un factor común como la liberación de P por excreción del zooplancton (Reche et al. 1997, Carrillo et al. 1996). En cambio, procesos de dilución (<1 ind L^{-1} en 1996, Fig. 3-20) por incremento de la precipitación pudieron favorecer el establecimiento de (i) una relación positiva entre PP y PB, interpretada como un control de la actividad bacteriana por comensalismo dependiente del carbono excretado por las algas; y (ii) una relación negativa entre algas y bacterias a nivel estructural, lo que sugiere la existencia de un segundo control de las bacterias por depredación por parte de algas mixótrofas (Medina-Sánchez et al. 1999, 2004). En años con una concentración intermedia de zooplancton (hasta ~ 25 ind L^{-1} en 1997 y 2003, Villar-Argaiz et al. 2001, Bullejos et al. datos en preparación), como consecuencia de una menor variación en el volumen de agua del lago respecto al correspondiente año precedente, encontramos resultados diferentes en relación al tipo de interacción alga-bacteria que se establece. Así, en 1997 se encontró relación positiva entre PP y PB, que fue interpretada como un

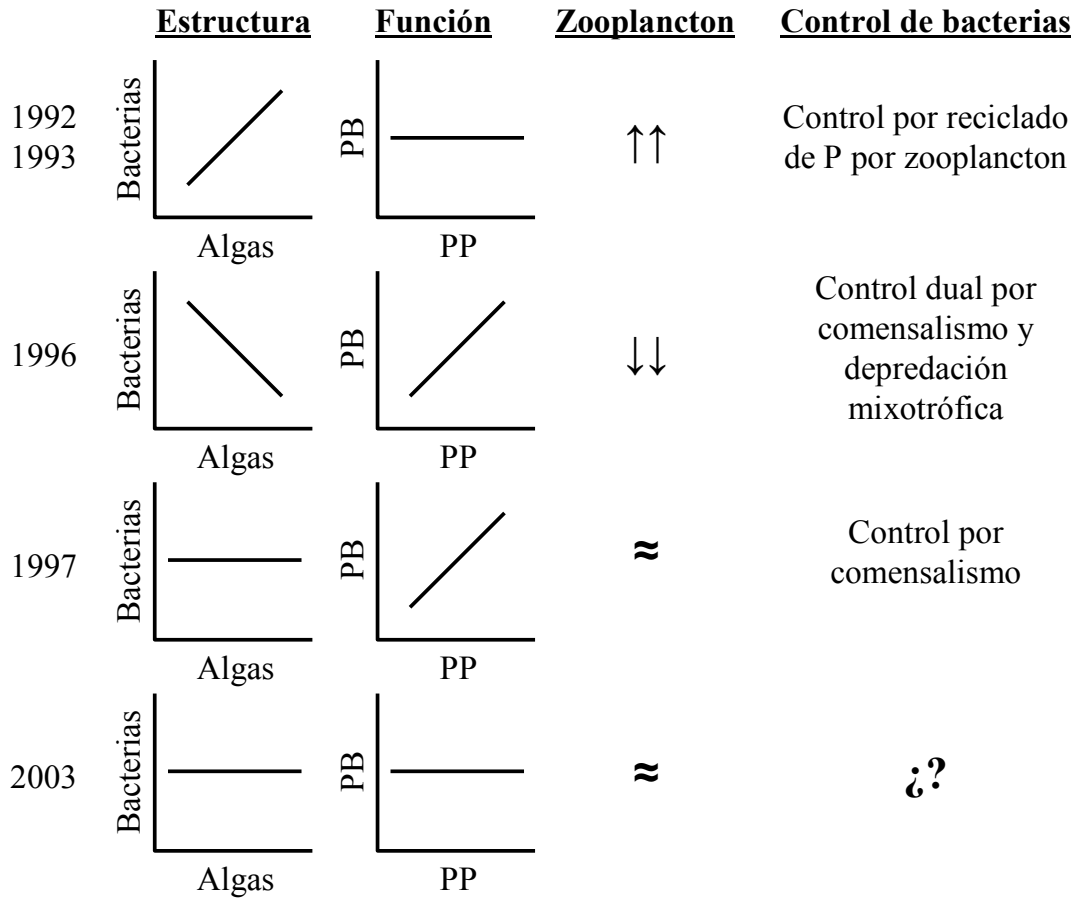


Figura 3-20. Esquema del control de las bacterias entre los años 1992 y 2003, según las variaciones en la concentración de zooplancton, generando relaciones (positivas, negativas o no relación) entre la estructura y entre la función de algas y bacterias. PP: producción primaria. PB: producción bacteriana.

control bacteriano por comensalismo (Carrillo et al. 2002, Fig. 3-20), pero la ausencia de relación entre variables estructurales de algas y bacterias se explicó como una compensación entre el control por comensalismo y el control por depredación debido a una codominancia de algas mixótrofas y autótrofas estrictas (Medina-Sánchez et al. 2004). En cambio, nuestros resultados de 2003 no permiten conocer el tipo de interacción que se establece entre algas y bacterias, que podría estar influida por UVR y por la disponibilidad de nutrientes, como se desprende de la relación directa que se estableció entre $K_{d_{UVB}}$ vs. razón PP:PB y entre P particulado

>1 μm vs. razón PP:PB (ver arriba). A partir de la información recogida, surge la necesidad de conocer cómo afectan estos dos factores a la regulación de las bacterias y el resto del bucle microbiano, interrogantes que serán abordados en el capítulo 6 de la presente Tesis Doctoral.

4 Interactive effects of phosphorus loads and ultraviolet radiation on algal diversity

Published as Delgado-Molina et al. 2009

Abstract

Interactions among multiple stressors generated by global change exert cumulative effects on ecosystems. In order to identify the long-term interactive effects of ultraviolet radiation (UVR) and increasing atmospheric nutrient inputs (P-inputs) on aggregate (growth rate, chlorophyll *a* and abundance) and emergent (evenness and diversity) algal community variables, a 2×5 factorial experiment (two levels of light quality [+UVR, -UVR] and five levels of nutrient enrichment) was conducted using in situ mesocosms in a high-mountain lake in the Sierra Nevada (Spain) over a 70-day period. Addition of P suppressed and inverted the stimulatory UVR effect on the non-flagellate growth rate (mid-term scale). This interactive effect was propagated as increased harmful UVR effect on chlorophyll *a* and abundance across the P-gradient. Interestingly, P-pulse reversed the positive effect of UVR on phytoplankton evenness and diversity on the long-term scale. These findings support our hypothesis that the UVR \times P interactive effect would favor a few UVR-tolerant rapid-growing species. We show that the algal community is acclimated to UVR-flux but not to high P-pulse. The loss of diversity and disappearance of mixotrophic flagellates may have important implications for the functioning of clear-water ecosystems.

Introduction

Multiple anthropogenic stressors related to global changes are having a cumulative effect on the biodiversity and functioning of ecosystems (Steffen et al. 2004). These effects are thought to be enhanced in ecosystems with low redundancy and diversity, such as high-mountain lakes. Thus, a loss of algal biodiversity may render these ecosystems incapable of compensating for species impoverishment because ecosystem processes (e.g. primary production) are maintained only by a few species (Vinebrooke and Leavit 2005). Moreover, the net combined effect of multiple stressors (e.g. increased ultraviolet radiation [UVR], atmospheric dust, eutrophication, acidification and global warming) cannot be easily evaluated, as their interactive effect may be greater (synergistic) or lesser (antagonistic) than their expected additive effect (Folt et al. 1999). The magnitude and direction of their net effect depend on the different intensity thresholds of each stressor, the species-specific tolerance and the trade-off mechanisms at the different levels of organization of biological communities. It is therefore necessary to assess the interactive effect of stressors on aggregate (e.g. growth rates, abundance) and emergent variables (e.g. diversity) of communities in order to accurately quantify the net cumulative effect of stressful factors on ecosystem persistence (Srivastava and Vellend 2005).

In a global change scenario, the greater transport of atmospheric dust owing to severe droughts related to climatic warming (Escudero et al. 2005) implies an increase in mineral nutrient inputs to aquatic ecosystems (Duarte et al. 2006, Morales-Baquero et al. 2006). This may constitute a stress factor in oligotrophic lakes if it causes disturbance to the ecosystem, e.g. by the loss of key species for ecosystem functioning. Therefore, research into interactions between UVR (because of its harmful effect on organisms) and P (mineral nutrient linked to increasing atmospheric dust) is essential to allow predictions of changes in the composition of algae, the keystone trophic level that represents the greatest source of particulate organic carbon in high-mountain lakes (Straškrabová et al. 1999a, Carrillo et al. 2006).

Few studies have quantified the net interactive UVR \times P effect on the algal community, and these have shown contradictory results at the molecular and physiological levels. Thus, P-enriched algae were more able to recover from UVR damage and increased their growth rate (Heraud et al. 2005) or primary production (Ogbebo and Ochs 2008) under UVR, whereas other authors reported the unexpected finding that P-enrichment enhanced the harmful effects of UVR on chl *a*-based growth rates (Xenopoulos et al. 2002) and photosynthesis-related processes (Carrillo et al. 2008a). Moreover, the effect of the interaction of these two factors on algal diversity has not yet been elucidated. This inability to establish a pattern has two possible explanations: (i) contradictory reports on the effects of UVR at community level, e.g. on species composition, relative abundance of species and algal diversity (Bothwell et al. 1993, Vinebrooke and Leavitt 1999, Watkins et al. 2001); and (ii) the fact that P can have a stimulatory or inhibitory effect on algal development and hence algal diversity depending on the intensity of the P-enrichment.

Regarding the first explanation, discrepancies in results may derive from differences in the intensity of UVR received (Molis et al. 2003), the temporal scale of the algal response to UVR (Cabrera et al. 1997), interaction with other trophic levels (Bothwell et al. 1994) and intrinsic factors, such as species-specific sensitivity and the tolerance of algae, i.e. their ability to minimize UVR damage (Davidson and Belbin 2002, Vinebrooke and Leavitt 2005). The tolerance of algae is related to their biochemical and cellular strategies, including photo-damage repair (Vincent and Roy 1993), acquisition of photoprotective compounds (Zudaire and Roy 2001, Banaszak 2003, Korbee-Peinado et al. 2004), changes in biochemical and stoichiometric composition (e.g. decrease in C:P and N:P ratios Hessen et al. 2008, see chapter 5, unsaturated lipids Villar-Argaiz et al. 2008), increase in cell size (Hessen et al. 1997) and, in some algal groups, their capacity for movement (Villafañe et al. 2007). Regarding the second explanation, it is amply established that P-inputs stimulate algal growth (e.g. Chrzanowski and Grover 2001, Hill and Fanta 2008, Carrillo et al. 2008b), photosynthetic activity and primary production (e.g. Joint et al. 2002, Duarte et al. 2006), increasing algal abundance or biomass (e.g. Schindler, 1977, Vinebrooke and Leavitt, 1998, Carrillo et al. 2008b). However, higher P-inputs unmask the negative UVR effect on photosynthetic and functional variables of

primary producers (Xenopoulos et al. 2002, see chapter 5). Besides, the effect of P on algal composition usually favors a few rapid-growing species (Kononen et al. 1993, Moisander et al. 2003, Vuorio et al. 2005) that can drive a subsequent decrease in algal diversity regardless of the trophic status of the ecosystem, as reported under experimental conditions (Hough and Thompson 1996, Romo and Villena 2005, Carrillo et al. 2008b).

Based on the damaging effects of UVR on different organization levels of algae and the inhibiting effect of P on algal diversity reported above, we hypothesized that the UVR × P interactive effect would favor a few UVR-tolerant rapid-growing species, leading to a reduction in algal diversity. This hypothesis was tested in an experimental study to determine the response of species composition, growth rate, abundance, evenness and diversity to UVR exposure along a P-gradient that mimicked natural atmospheric P-inputs. Our experimental approach included different incubation time scales (up to 70 days), presence of all trophic levels, large enclosures (allowing UVR-avoiding mechanisms to operate), and minimal alteration of the natural optical properties of the water column. Results obtained showed that P-inputs suppressed the stimulatory effect of UVR on algal diversity.

Material and methods

The content of this section is fully explained in Spanish in chapter 2.

Study site

The study was developed in the high-mountain lake La Caldera, located above the tree-line (3050-m.a.s.l.) in Sierra Nevada National Park (Southern Spain, 36°55'-37°15'N, 2°31'-3°40'W). The lake has a surface area of ~2 ha, maximum depth of 14 m and mean depth of 4.3 m. It is usually covered with ice from October to June–July. During the ice-free season, the lake does not stratify, and water temperatures generally range from 4 °C to a maximum of 12 °C by the end of August. The drainage basin is bed-rock and lacks littoral vegetation. As in most high-

mountain lakes above the tree-line, the water is highly transparent, with Secchi disk visibility reaching maximum depth (14 m) and a low dissolved carbon concentration (DOC, 1 mg C L^{-1}) that allows a considerable intensity of UVR to penetrate deep into the lake (Carrillo et al. 2002, see Results section). Total nitrogen (TN):total phosphorus (TP, by atoms) ratio values are >180 and dissolved inorganic nitrogen (DIN):TP (by mass) ratio values are >40 (Villar-Argaiz et al. 2001), characteristic of a strong P limitation throughout the ice-free period (Carrillo et al. 1996, Villar-Argaiz et al. 2001). This ecosystem experiences inputs of atmospheric Saharan dust containing high P levels, with a mean molar TN:TP ratio in total dust deposition ranging from 10 to 50. Inputs of atmospheric P are largely restricted to the mid-ice-free period (Morales-Baquero et al. 2006). The dominant algae are Chrysophyceae (mainly *Chromulina nevadensis* P.M. Sánchez) and Chlorophyceae [mainly *Dictyosphaerium chlorelloides* (Nauman) Komárek and Perman]. Fish are absent and the calanoid copepod *Mixodiaptomus laciniatus* Lilljerbog is the dominant crustacean zooplankton in the pelagic zone while Cladocerans (e.g. *Daphnia pulicaria* Hrbacék) are restricted to the littoral zone in the lake.

Field sampling and biological determinations

Sampling was conducted at 7–15 days intervals throughout the open-water period from June to early October in 2003. Biological and chemical samples were taken at the deepest point of the lake. For each sampling day, a composite lake sample was constructed from equal volumes of lake water samples obtained with 6 L horizontal Van Dorn sampler from three depths, spaced evenly within the photic layer affected by $>1\%$ surface photosynthetic active radiation (PAR). From this composite lake sample, subsamples (in triplicate) were used for analysis of chl *a*, phytoplankton, TP, TN, sestonic N and P and, after filtration through 0.45 mm disposable filters (Sartorius), for analysis of total dissolved phosphorus (TDP), nitrate (NO_3^-).

In situ experiment

An experiment covering almost all of the ice-free period (1 August 2003 to 10 October 2003) in La Caldera lake had a 2×5 factorial design: two light treatments (full-sunlight [+UVR] vs. photosynthetic active radiation [-UVR]) and five nutrient treatments. Each treatment consisted of a mesocosm made of clear polyethylene tubes (0.7 m diameter \times 7 m length), closed at the bottom, with total volume of 2.7 m³. Enclosures were filled by pumping unfiltered lake water from 3 m depth (within photic layer affected by >5% UVB). The 10 mesocosms were segregated in two subsets of enclosures (five for +UVR and five for -UVR) by means of two 3×3 m² racks constructed from 3 cm polyvinyl chloride pipe. The subsets were separated by more than 50 m to prevent shading between them. Racks were secured to a buoy attached to an anchored rope.

The +UVR treatment was obtained by using polyethylene plastic that transmits 90% PAR ([400-700 nm), and most UVR (60% ultraviolet B (UVB) and 75% ultraviolet A (UVA)). The -UVR treatment was obtained using a cover of Plexiglas UF3 (Atohaas, North America), a long-wave-pass plastic that transmits 90% PAR but blocks UVR (<390 nm). Optical properties of the cut-off filters used in light treatments were tested before experiments with a double-beam spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 40). Further, the rack (subset) containing -UVR enclosures, was surrounded by 2 m² layers of Plexiglas UF3 to prevent any refractory solar UVR on the experimental area. Within -UVR enclosures irradiance should be attenuated with respect to that measured throughout the lake water column (average of all values obtained from a photic layer affected by >25% UVB) by 87.1% at 305 nm, 77.8% at 320 nm, 69.9% at 380 nm wavelengths, but only 17.4% of PAR.

The five P-enrichment levels were set by adding a final concentration of 0, 20, 30, 40, and 60- $\mu\text{g P L}^{-1}$ (NaH_2PO_4), with each mesocosm representing a light \times nutrient treatment. The enclosure with no added nutrient and +UVR served as control. The gradient matched actual P atmospheric inputs, and the 60 $\mu\text{g P L}^{-1}$ treatment duplicated the maximum direct input measured in this ecosystem (Villar-Argaiz et al. 2001), but was lower than estimations corresponding to a single event of

81.37 $\mu\text{g total P L}^{-1}$, calculated from mean atmospheric P-inputs of 1.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ in samples collected weekly from a nearby lake (Morales-Baquero et al. 2006), considering a mean lake depth of 4 m (Villar-Argaiz et al. 2002).

In order to ensure that P remained as limiting nutrient in enclosures, inorganic N (as NH_4NO_3) was added to mesocosms to reach a N:P molar ratio of 30. The amount of added-P was calculated from the total dissolved P concentration in the water column on the day before starting the experiment. After P-enrichment, the water of each mesocosm was vigorously stirred, and several samples were taken to monitor initial experimental conditions. The top of each enclosure was covered with a cap (polyethylene for +UVR and UF-3 Plexiglass for -UVR enclosures) to avoid uncontrolled input of nutrients to the enclosures.

Enclosures were sampled eight times during the 70-day incubation period (1 August 2003 to 10 October 2003) on Days 1, 3, 11, 20, 32, 43, 56 and 70. Before the sampling, the water column was gently mixed along the entire length of each enclosure and then integrated depth samples were taken using a plastic bucket (5 L). This set-up allows a reasonable evaluation of UVR \times P interactive effects on pelagic community, because nutrient inputs assayed are within the range of current loads into the lake area (Villar-Argaiz et al. 2001, Morales-Baquero et al. 2006), and the +UVR treatment reproduced the natural optical conditions in the water column. Thus, the +UVR enclosures transmitted most of irradiance measured throughout the lake water column (average of all values obtained from a photic layer affected by >25% UVB), i.e. 48.96% at 305 nm, 62.58% at 320 nm, 71.47% at 380 nm wavelengths and 72.79% of PAR.

Physical analyses

Vertical profiles of attenuation of UVB (300-319 nm), UVA (320-399) PAR (400-700 nm) in the water column were obtained on each sampling day using a LI-8000 spectroradiometer (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Diffuse attenuation coefficients for downward irradiance (K_d) were determined from the slope of the

linear regression of the natural logarithm of downwelling irradiance versus depth for each wavelength range considered. Temperature profiles were recorded using a multiparametric probe (Turo Water Quality Analysis T-611).

Chemical and biological analyses

Samples were analyzed for inorganic nutrients on the same day as their collection. UV spectrophotometric screening was used to determine nitrates (NO_3^-). Samples for TDP and P were persulfate-digested and analyzed as soluble reactive phosphorus (SRP) applying the acid molybdate technique (American Public Health Association, 1992). TN samples were persulfate-digested and measured as nitrate (American Public Health Association, 1992).

For sestonic N and P determinations, an aliquot of sample water (100–300 mL), previously filtered through a 40-mm Nitex filter to remove zooplankton, was filtered through precombusted (1 h at 550°C) 1 mm pore-size glass fiber filters (Whatman GF/B, Kent, UK) at low pressure vacuum (<100 mmHg). Filters were then immediately analyzed for P or dried (24 h to 60°C) and kept desiccated until N analysis. Particulate N was determined using a Perkin-Elmer model 2400 elemental analyzer. For the particulate P analysis, filters were introduced into acid-washed vials, digested with a mixture of potassium persulfate and boric acid at 120°C for 30 min, and determined as SRP in 10 cm quartz cuvettes by means of the acid molybdate technique (American Public Health Association, 1992). Blanks and standards were performed for all procedures. Algal N:P ratios were calculated on a molar basis. The fraction between 1 and 40 mm was identified as algal because of the absence of size overlap between different trophic levels in La Caldera Lake (Echevarría et al. 1990, Medina-Sánchez et al. 2002, Villar-Argaiz et al. 2002) and the negligible protozoan abundance previously observed in this fraction (Medina-Sánchez et al. 2004).

Chl *a* was measured fluorimetrically after grinding the filter (Whatman GF/F glass fiber filter, 25 mm) with pigments (concentrated by filtration of up to 300 mL

at <100 mmHg of pressure differential) and extracting the pigments in 90% acetone kept in the dark at 4°C for 24 h. A chl *a* standard (Sigma, chl *a* from spinach) was used to transform the fluorescence data into chl *a* concentrations.

Species composition and cell counts were determined from sample preserved in glass bottles (130 mL) using Lugol's reagent (~1% vol/vol). An aliquot (5–50 mL) of each sample was settled in an Utermöhl chamber of 2.6 cm diameter for 48 h to ensure complete sedimentation of the smallest algal species. Cells were counted in 100 randomly selected fields of view at 1000× magnification under an inverted microscope (Leitz Fluovert FS, Leica, Wetzlar, Germany). At least 600 cells of the most abundant algal species were counted in each sample. Cell volume was obtained by image analysis (Leica, Quantimet 500). Autotrophic picoplankton were preserved with 1% formaldehydecacodylate (f.c.) buffer and, after being filtered through black Nuclepore 0.2 mm pore-size filters, they were examined by autofluorescence under a Leitz Fluovert FS epifluorescent microscope within 2 weeks of the sampling, as recommended by Straškrabová et al. (1999b).

Algal growth rates were calculated as:

$$r = \ln (A_1/A_0) \times T^{-1}$$

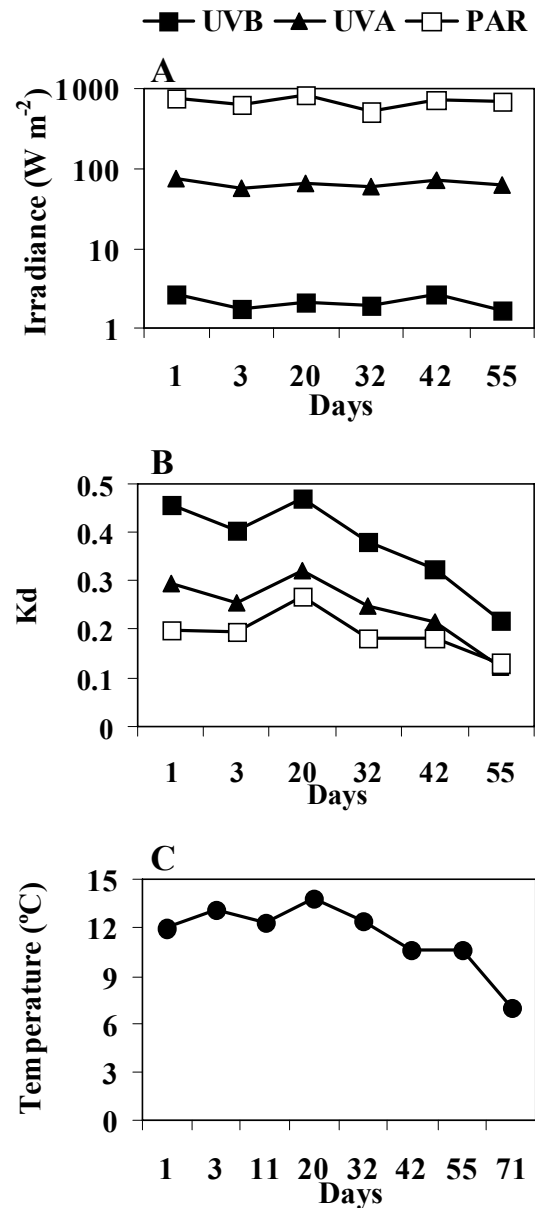
where A_1 and A_0 are the algal abundance on two consecutive sample dates and T is the time (in days) between sample collections.

Algal diversity was estimated by Shannon-Wiener (H') and Evenness (E) indexes calculated as:

$$H' = -\sum_1^x p_i \log_2 p_i \quad E = \frac{H'}{\log_2(x)}$$

where x is the number of taxa and p_i is the relative abundance of taxon i ($\sum p_i = 1$).

Fig. 4-1. Changes during the incubation period in (A) solar irradiance (W m^{-2}) reaching the surface of Lake La Caldera; (B) diffuse attenuation coefficients (K_d) for each wavelength range; and (C) average temperature ($^{\circ}\text{C}$) of water column taken from each 10 cm. Solar irradiance is represented in a semilog plot of ultraviolet B, ultraviolet A and photosynthetic active radiation irradiance against depth.



Statistical analyses

Given the absence of replicates for individual treatments, the effects of nutrient enrichment on N:P ratio, chl a , growth rate of flagellated and non-flagellated algae, and abundance, diversity, and evenness of whole algal community in each light treatment were assessed by simple regression analysis of the mean values for all sampling dates in each experimental period (PR: three sampling dates and PE: five sampling dates; see Results section) against P enrichment level. When the regression was significant, a homogeneity of slopes model analysis of covariance (ANCOVA) was used to test the effect of the light treatment across the P gradient with both categorical (factor; +UVR and -UVR) and continuous (covariates, P) predictor variables (Quinn and Keough 2002). When no significant differences were found in the y-axis intercepts, UVR effect was graphically checked throughout P-enrichment gradient by examining 95%

confidence intervals of the regression lines (see Urabe et al. 2002 for a similar statistical analysis). When no linear relationship was found between P addition and algal variables, data were fitted to non-linear models (logarithmic or exponential), and the effects of UVR for a given P level were further assessed using a paired t-test for dependent samples ($n = 3$ for PR; $n = 5$ for PE). The interaction of UVR and P was analyzed by examining the modification of UVR effect across the P gradient on graphs. Statistica 7.1 for Windows software was used for statistical analyses (StatSoft Inc., 2005).

Results

Lake conditions

The flux of solar radiation reaching the lake surface showed a narrow range of variation during the experimental period (Fig. 4-1A), although some differences in attenuation coefficients of solar radiation (K_d) were observed, e.g. a lower transparency on Day 20 (Fig. 4-1B). The mean temperature range in the water column was also narrow (12.1 ± 1.6 °C) except at the end of the experimental period, when a marked decrease to 7°C was observed (Fig. 4-1C). TDP and TP concentrations were low in La Caldera Lake (see chapter 3, Table 3-4), while N

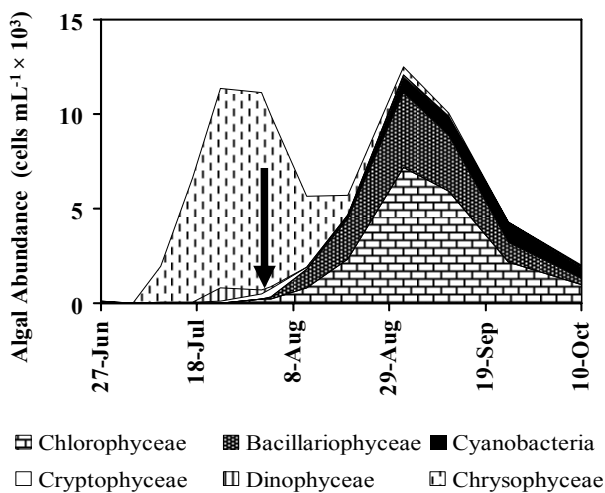


Fig. 4-2. Temporal shift in specific algal composition in La Caldera Lake during ice-free period of 2003. Arrow represents the starting date of the experiment (1 August).

forms showed a high concentration. Both DIN/TP and sestonic N:P ratios indicate strong P limitation. The chl *a* concentration was $<5 \text{ mg L}^{-1}$, which is characteristic of ultraoligotrophic lakes (see chapter 3, Fig. 3-8).

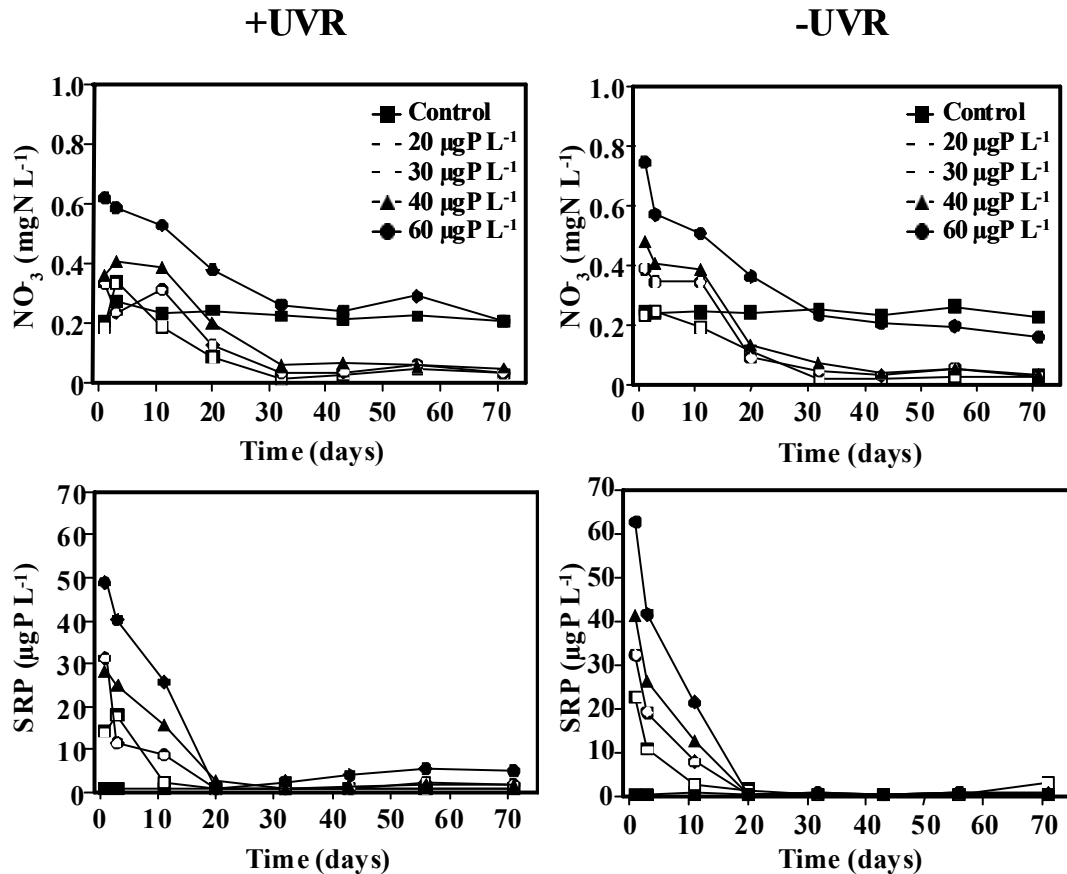


Figure 4-3. Changes in Nitrate (NO_3^-) and Soluble Reactive Phosphorus (SRP) concentrations during the incubation period in non-enriched (control) and enriched treatments.

The algal species composition was simple, composed of nanoplankton species and dominated by Chrysophyceae (mainly *Chromulina nevadensis*) from thaw to mid-August, when it was replaced by Chlorophyceae (*D. chlorelloides*) and Bacillariophyceae (*Cyclotella sp.*), which co-dominated until the end of the ice-free period. Other less abundant species, such as *Amphidinium sp.* (Dinophyceae), *Rhodomonas sp.* (Cryptophyceae), *Ochromonas sp.* (Chrysophyceae) and *Cyanarcus sp.* (Cyanophyceae) developed rapidly during the ice-free period (Fig. 4-2).

Experimental conditions

A decrease in NO_3^- concentration was observed from week one of the experiment but only in the P-enriched treatments. SRP showed a steeper decline and was depleted from day 20 until the end of the experiment at three weeks after P-pulse (Fig. 4-3). Based on these results, two distinct periods in which the algal community had a different P-availability and a distinct nutrient status (N:P ratio) were considered: (i) P-replete (PR) period, during the first 11 days when inorganic P was plentifully available, with sestonic N:P ratio <22 , and (ii) P-exhausted (PE) period, from day 20 until the end of the experiment (when P was depleted to lake background levels), with N:P ratio ≥ 22 . This temporal segregation, based on the nutrient thresholds proposed by Healey and Hendzel (1980; Fig. 4-4 A and B), was considered because the effect of UVR on algae may be modulated more by their elemental composition than by P-availability in the water column (e.g. Medina-Sánchez et al. 2002, 2006).

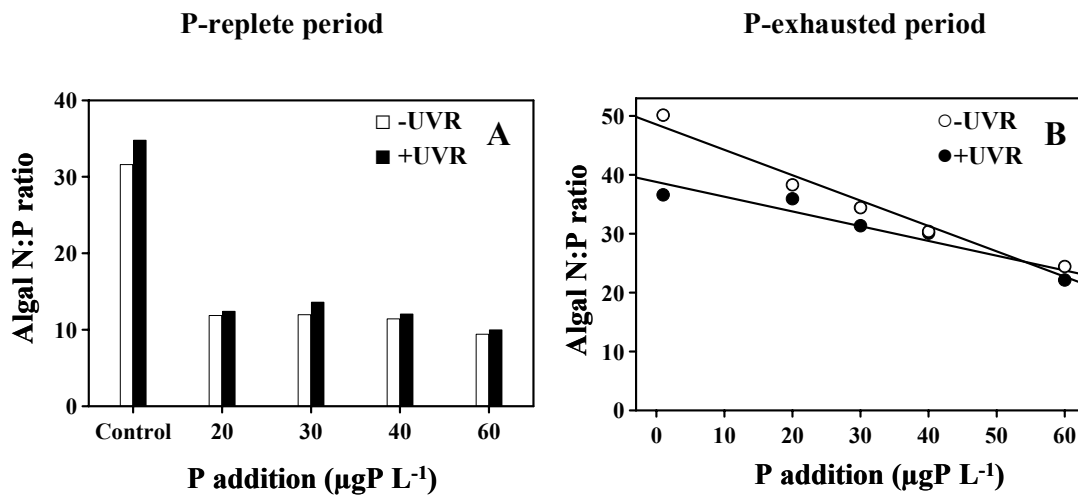


Figura 4-4. Algal N:P ratio measured in all nutrient (control, 20, 30, 40 and 60-mg P L^{-1}) and light (-UVR, +UVR) treatments during P-replete (A) and P-exhausted (B) periods. Significance of paired t-test comparisons between light treatments for each phosphorus level: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Bars (A) and points (B) represent mean values for entire PR (three sampling days) or PE (five sampling days) periods. Regression lines are inserted when the relationship across the P gradient was significant at $p < 0.05$ in both light treatments.

During the PR period, algal N:P ratio was significantly lower in P-enriched treatments versus controls but did not differ among the enriched treatments (t-test $p > 0.05$; Fig. 4-4A). During the PE period, UVR significantly decreased algal N:P ratio (ANCOVA: $F_{1,6} = 17.04$, $p = 0.006$) and significant UVR × P interactive effects were found (slope of regression line: $F_{1,6} = 7.56$, $p = 0.033$; Fig. 4-4B, Table 4-1). This effect was antagonistic, with a lower effect of UVR as the P-input concentration increased.

Structure of nanoplanktonic community

At enclosures with no nutrient addition, algae contained >50% of nanoplanktonic carbon during the experimental period. Bacteria represented around 30% of total nanoplanktonic carbon (except last day with 50%). Heterotrophic nanoflagellates were absent and ciliates were a minor fraction of nanoplankton, with <1% of total C. By contrast, a greater proportion of C in the viral fraction (3-11%) was detected (Fig 4-5 A, B).

In all nutrient enriched treatments, algal carbon got pass 90% of total nanoplanktonic C during all PE period (Fig. 4-5, from C to J). However, heterotrophic microbial loop components developed basically during PR period, when ciliates represented a significant contribution to total nanoplanktonic C, which was greater at +UVR and P-enriched treatments. Thus, ciliates represented 38% of total C at +UVR40 (Fig. 4-5 H).

The chapters of this Doctoral Thesis have been structured based on the biomass contribution and temporal scale of maximum development of each trophic level. Thus, first we will attend to algae, the dominant community in all enclosures, whose responses to UVR and nutrient addition will be studied in this chapter (structure) and chapter 5 (function). Finally, the heterotrophic microbial loop and its interaction with algae will be studied on chapter 6.

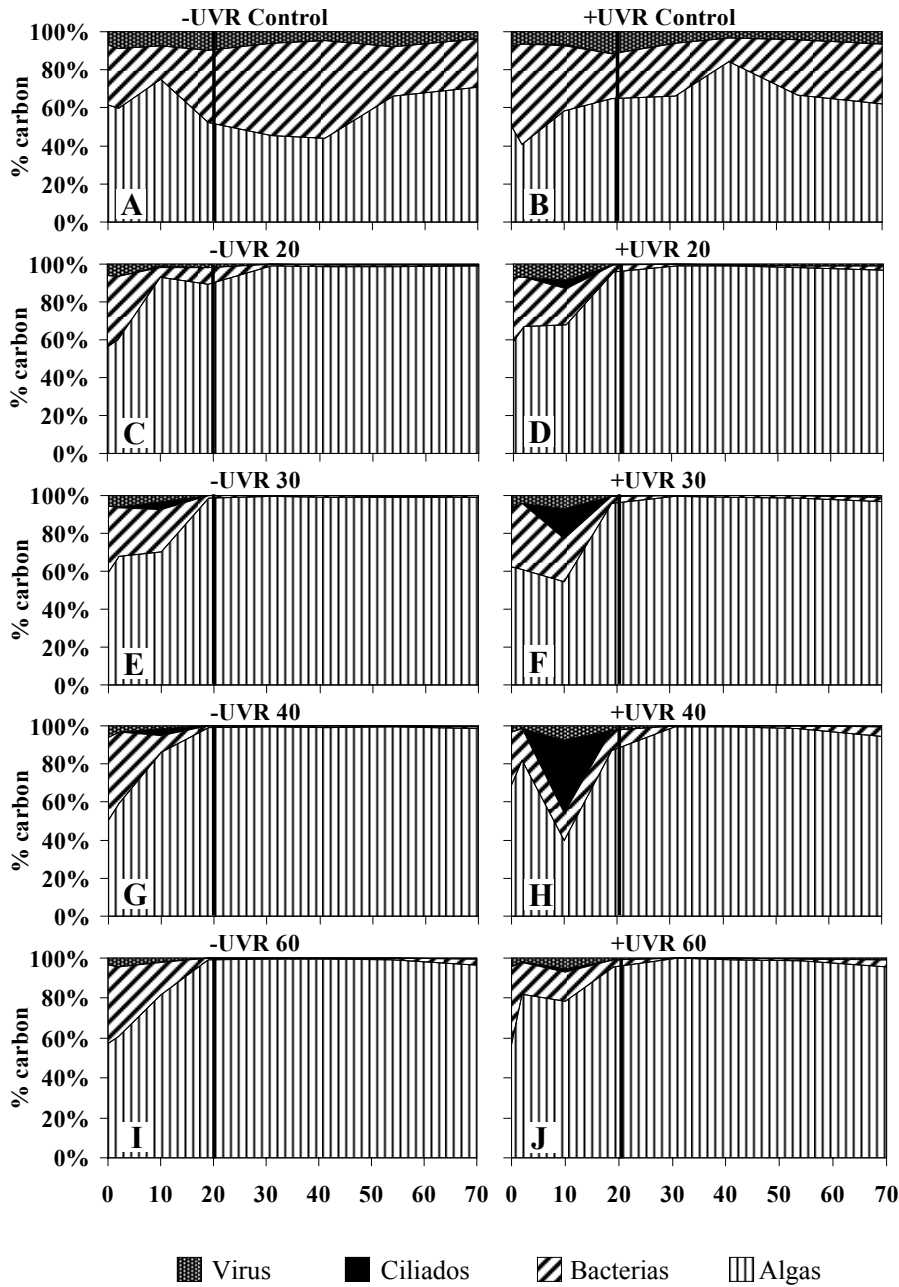


Figura 4-5. Temporal variation of the percentages of carbon contained in each fraction of nanoplanktonic community along the experimental period. Each panel represents a mesocosm. Treatments with full sunlight radiation (+UVR; right panels) and without UV radiation (-UVR; left panels), as well as treatments without (Control) and with nutrient addition (20, 30, 40 and 60 $\mu\text{g P L}^{-1}$) are represented. The vertical line divides both experimental periods considered (to the left: PR period; to the right: PE period).

4 UVR × P effect on algal diversity

Table 4-1. Results of simple regression analysis of P-enrichment on algal variables in both light treatments (+UVR, -UVR). Algal N:P ratio, growth rate of flagellates (d^{-1}) and non-flagellates (d^{-1}), chlorophyll *a* concentration ($\mu g L^{-1}$), algal abundance (cells $ml^{-1} \times 1000$), Shannon-Wiener diversity index (bits ind^{-1}) and Evenness. All R^2 values are rounded to two significant digits. UVR = Ultraviolet radiation (− absence; + presence). Number in bold = significant relationship between P and dependent variables.

Variable	UVR	PR period				PE period			
		Intercept	Slope	R^2	p	Intercept	Slope	R^2	p
Algal N:P ratio	−	28.69	-4.480	0.59	0.102	53.34	-5.930	0.95	0.002
	+	31.56	-4.990	0.59	0.100	41.66	-3.470	0.89	0.011
Growth rate of flagellates	−	-0.16	-0.002	0.07	0.658	-0.14	0.004	0.74	0.060
	+	-0.12	-0.005	0.54	0.160	-0.02	0.001	0.46	0.207
Growth rate of non-flagellates	−	0.17	0.007	0.69	0.081	0.01	-0.001	0.64	0.103
	+	0.35	0.001	0.14	0.529	-0.02	-0.001	0.89	<0.05
Chlorophyll <i>a</i>	−	4.45	0.160	0.84	0.027	5.86	2.310	0.98	0.001
	+	4.93	0.066	0.33	0.306	7.17	1.489	0.96	0.003
Algal abundance	−	20.19	0.015	0.00	0.940	-32.62	25.927	0.99	<0.001
	+	12.26	0.121	0.58	0.137	89.17	16.702	0.95	<0.01
Diversity	−	0.47	0.005	0.57	0.142	0.53	-0.009	0.74	0.061
	+	0.33	0.007	0.79	<0.05	0.75	-0.016	0.62	0.114
Evenness	−	0.19	0.002	0.51	0.175	0.30	-0.005	0.76	0.054
	+	0.15	0.003	0.72	0.071	0.39	-0.008	0.67	0.091

Interactive UVR × P effect on aggregate and emergent variables

Growth rate of flagellated algae was negative in both non-enriched treatments (Fig. 4-6 A and B). P-enrichment decreased growth rates to more negative values during the PR period (Fig. 4-6A), whereas positive values were reached, although close to zero, at some P-levels during the PE period (Fig. 4-6B). During the PR period, the growth rate of non-flagellated algae was positive and significantly (t-test, $p = 0.0429$) higher with than without UVR (Fig. 4-6C). P-enrichment suppressed the positive effect of UVR on growth rates and even significantly reversed it at higher

nutrient levels (40 mg P L⁻¹: t-test, p = 0.047; 60 mg P L⁻¹: t-test, p = 0.045; Fig. 4-6C). During the PE period, the growth rate of non-flagellated algae was lower under UVR and fitted a logarithmic model across the P-gradient under both light treatments (Fig. 4-6D, Table 4-2), although no interactive effect was found (Fig. 4-6D).

UVR generally impaired algal development in both experimental periods under P-enrichment conditions. This effect was higher on chl *a* (decreased up to 50% in P enrichment >30 mg P L⁻¹) than on algal abundance during the PR period (Fig.

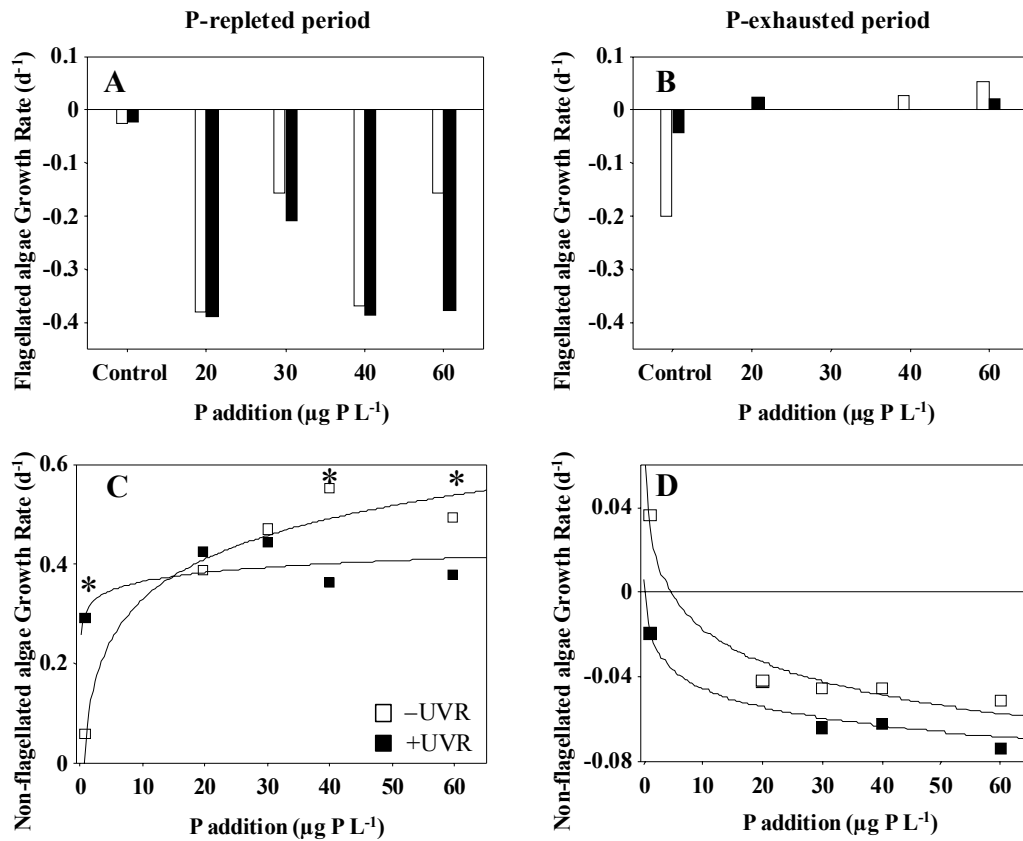


Figure 4-6. Growth rate (day⁻¹, d⁻¹) of flagellated and non-flagellated algae measured in all nutrient (control, 20, 30, 40 and 60-μg P L⁻¹) and light (-UVR, +UVR) treatments during P-enriched (left panels) and P-exhausted (right panels) periods. Significance of paired *t*-test comparisons between light treatments for each phosphorus level: **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001. Bars represent mean values for entire PR (3 sampling days) and PE (5 sampling days) periods. Regression lines of non-linear logarithmic models are inserted when the relationship across the P gradient was significant at *p*<0.05 in both light treatments.

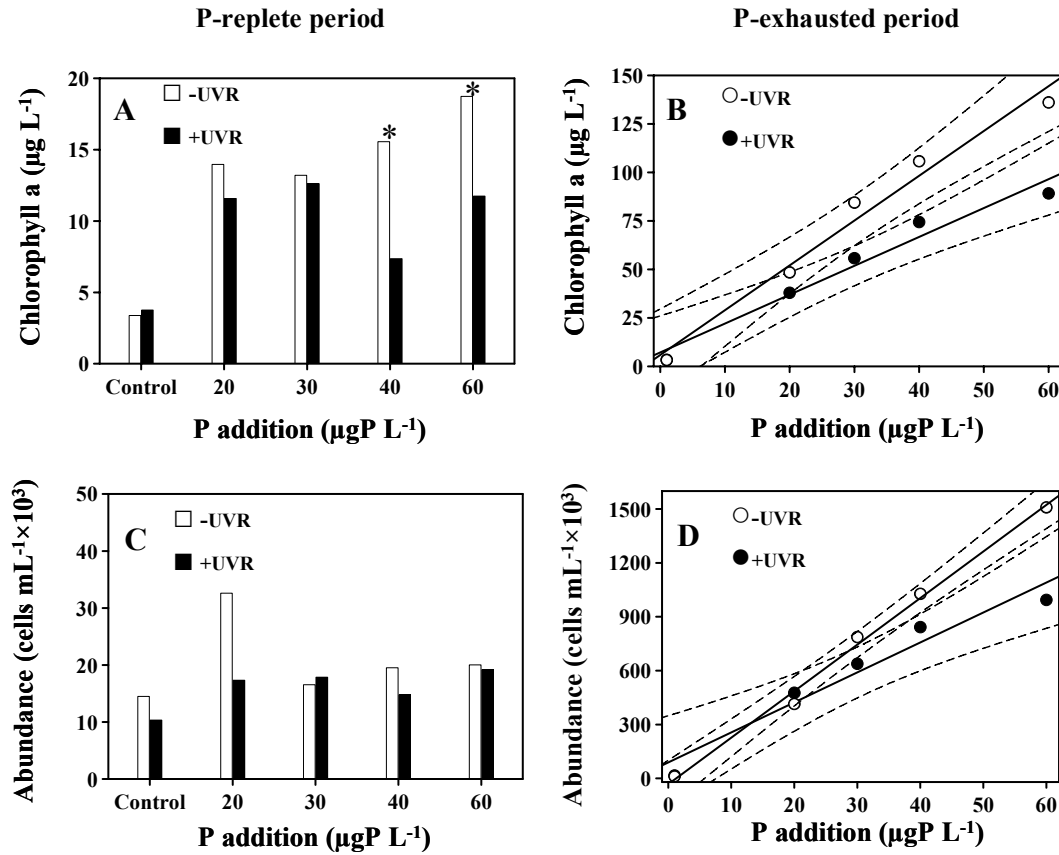


Figure 4-7. Chlorophyll *a* concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) and abundance of total algal community (cells $\text{mL}^{-1} \times 1000$) measured in all nutrient (control, 20, 30, 40 and 60- $\mu\text{g P L}^{-1}$) and light (–UVR, +UVR) treatments during P-repleted (left panels) and P-exhausted (right panels) periods. Significance of paired *t*-test comparisons between light treatments for each phosphorus level: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Bars represent mean values for entire PR (3 sampling days) and PE (5 sampling days) periods. Regression lines are inserted when the relationship across the P gradient was significant at $p < 0.05$ in both light treatments. 95% confidence intervals are denoted by dotted lines to evaluate significant differences between +UVR and –UVR mesocosms.

4-7 A and C), although the damaging UVR effect affected both chl *a* and algal abundance during the PE period (Fig. 4-7 B and D). P-enrichment significantly stimulated chl *a* and algal abundance under both light treatments (Fig. 4-7 B and D, Table 4-1), increasing their values by more than one order of magnitude during the PE period (from 3.3 to 139 $\text{mg chl } a \text{ L}^{-1}$ and from 50 to 1500 cells mL^{-1} in +UVR_{control} versus –UVR₆₀ treatments; Fig. 4-7 B and D). A significant UVR × P

interactive effect was observed on chl *a* (slope of regression line: $F_{1,6} = 9.69$, $p = 0.021$; Fig. 4-7B) and on algal abundance (slope of regression line: $F_{1,6} = 11.56$; $p = 0.014$) only in PE period (Fig. 4-7D). This effect was synergistic, with a greater effect of UVR as the P-input concentration increased.

During the PR period, algal diversity and evenness were significantly increased by P addition (e.g. Shannon–Wiener index from 0.23 bits ind^{-1} in

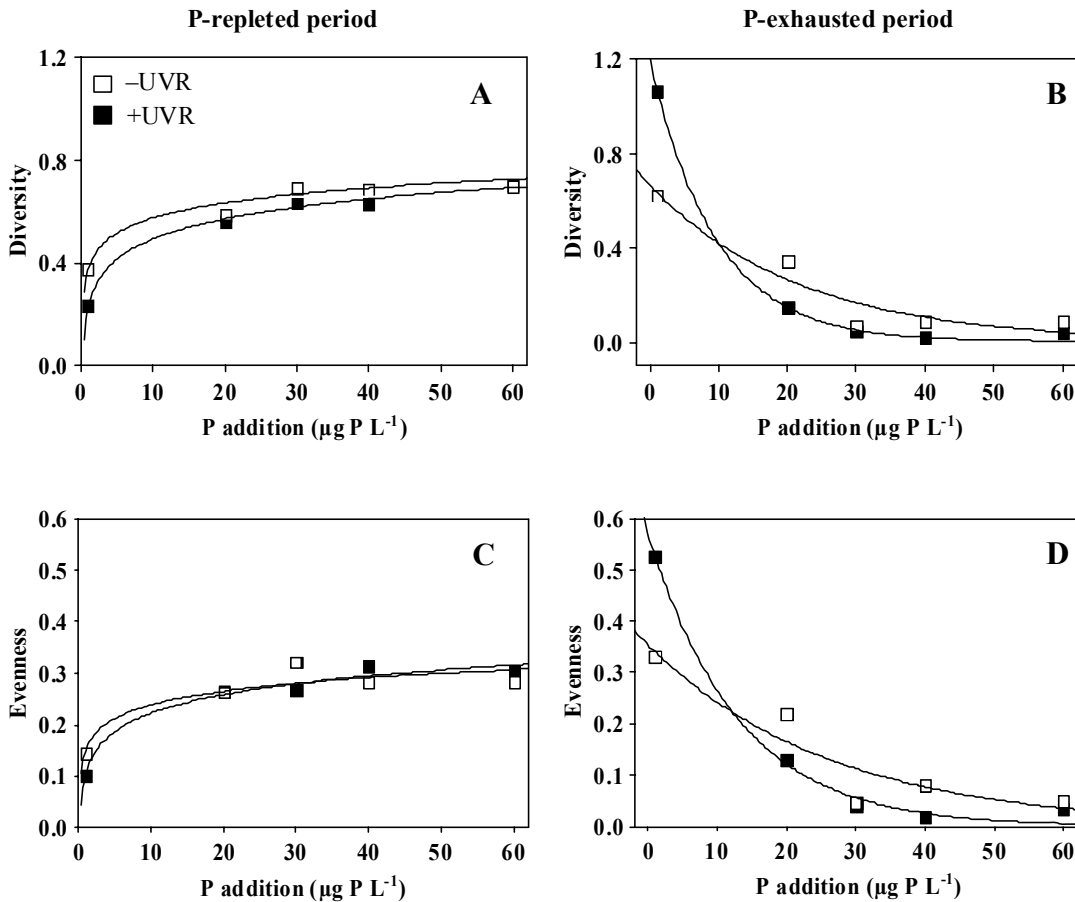


Figure 4-8. Shannon-Wiener diversity index (bits ind^{-1}) and Evenness index of algal community measured in all nutrient (control, 20, 30, 40 and 60- $\mu\text{g P L}^{-1}$) and light (-UVR, +UVR) treatments during P-enriched (left panels) and P-exhausted (right panels) periods. Dots represent mean values for entire PR (3 sampling days) and PE (5 sampling days) periods. Regression lines of non-linear models (left panels: logarithmic; right panels: exponential) are inserted.

+UVR_{control} to 0.7 bits ind⁻¹ in +UVR₆₀) and fitted a logarithmic model (Fig. 4-8 A and C, Table 4-2). During the PE period, UVR exerted a stimulatory effect on algal diversity and evenness (t-test, p = 0.0120; t-test, p = 0.0320; Fig. 4-8 B and D, see the non-P-enriched treatments), with an increase in the Shannon index from 0.6 bits ind⁻¹ (-UVR_{control}) to 1.1 bits ind⁻¹ (+UVR_{control}), while this index decreased to values near zero with the addition of P and fitted an exponential model across the P-gradient (Fig. 4-8 B and D, Table 4-2). Hence, P-enrichment suppressed the positive effect exerted by UVR on algal diversity and evenness and even inverted its effect on diversity in the 20 mg P L⁻¹ treatment (t-test, p = 0.0031; Fig. 4-8B).

UVR and P effects on algal composition

The algal community was composed of nanoplanktonic species with a striking absence of autotrophic picoplankton (<2 μm) under all experimental conditions. Thus, the relationship between chl *a* concentration and algal abundance

Table 4-2. Results of non-linear regression analysis of P-enrichment on algal variables in both light treatments (+UVR, -UVR). P-cell quota (μg P L⁻¹ cell⁻¹), growth rate of flagellated (GR-F) and non-flagellated (GR-NF) algae (d⁻¹), Shannon-Wiener diversity index (H'; bits ind⁻¹) and Evenness (E) of algal community. All R² values are rounded to two significant digits. Number in bold = significant relationship between P and dependent variables. UVR = Ultraviolet radiation (- absence; + presence). — non development of flagellated algae.

Variables	PR period				PE period		
	UVR	Model	R ²	p	Model	R ²	p
GR-F	-	y = -0.05 × log (x) - 0.06	0.35	0.061	—	—	—
	+	y = -0.08 × log (x) - 0.03	0.76	<0.05	—	—	—
GR-NF	-	y = 0.12 × log (x) + 0.06	0.95	<0.01	y = -0.02 × log (x) + 0.03	0.97	<0.001
	+	y = 0.03 × log (x) + 0.30	0.52	<0.01	y = -0.01 × log (x) - 0.02	0.90	<0.001
H'	-	y = 0.08 × log (x) + 0.38	0.86	<0.05	y = 0.66 × e ^(-0.046 × x)	0.92	<0.05
	+	y = 0.11 × log (x) + 0.23	0.99	<0.001	y = 1.19 × e ^(-0.105 × x)	0.99	<0.01
E	-	y = 0.04 × log (x) + 0.15	0.87	<0.01	y = 0.35 × e ^(-0.038 × x)	0.88	<0.01
	+	y = 0.05 × log (x) + 0.10	0.97	<0.001	y = 0.57 × e ^(-0.077 × x)	0.99	<0.01

was high ($R^2 = 0.89$, $p < 0.001$) indicating that most of the chl *a* corresponded to nanoplanktonic algal cells.

At the beginning of the experimental period, flagellated *Chromulina nevadensis* (mean cell size $7.15 + 2.98 \mu\text{m}^3$, Chrysophyceae) represented >95% of the total abundance in all enclosures. Other algal groups, *Amphydinium sp.* ($\sim 23 \mu\text{m}^3$, Dinophyceae), *Rhodomonas minuta* ($\sim 53 \mu\text{m}^3$, Cryptophyceae) and *D. chlorelloides* (mean cell size $5.95+1.60 \mu\text{m}^3$, Chlorophyceae) were present in less numbers.

In both non-P-enriched treatments, a shift in the composition of algal species was observed from flagellated algae to coccal-shaped cells (mainly *D. chlorelloides*), reaching $\sim 90\%$ of total abundance (Fig. 4-9 A and B). Other coccal algae, i.e. *Cyanarcus sp.* ($\sim 8 \mu\text{m}^3$, Cyanophyceae) and *Cyclotella sp.* ($\sim 97 \mu\text{m}^3$ Bacillariophyceae), were much less frequently observed. In the absence of UVR ($-UVR$ control), the succession of the algal community was delayed (time taken by Chlorophyceae to reach >50% of total abundance) by ~ 6 days (Fig. 4-9B). In addition, the reduction of UVR decreased algal abundance from Days 30 to 45 of the experiment (Fig. 4-9A and B), but had no significant effect on the size of *D. chlorelloides* (t-test, $p = 0.1929$) or of other algal species. However, the reduction of UVR significantly depressed (t-test, $p = 0.0431$) the development of larger species (i.e. *Cyclotella sp.*). A similar pattern of succession was noted between the water column and $+UVR_{\text{control}}$ treatment from the beginning of August to the end of the ice-free period (see arrow on Fig. 4-2) in October, although the maximum algal abundance in the $+UVR_{\text{control}}$ treatment was 3-fold greater than in the lake.

P-enrichment brought forward the algal-species shift (see above), stimulating the development of *D. chlorelloides* at 2 weeks after the nutrient pulse with and without UVR (Fig. 4-9). At the beginning of the PE period (Days 20–40 of the experiment), the abundance of this species was higher in all P-enriched treatments, reaching values ($\geq 30\text{-mg P L}^{-1}$ treatments) that were two orders of magnitude higher than those in control treatments (Fig. 4-9).

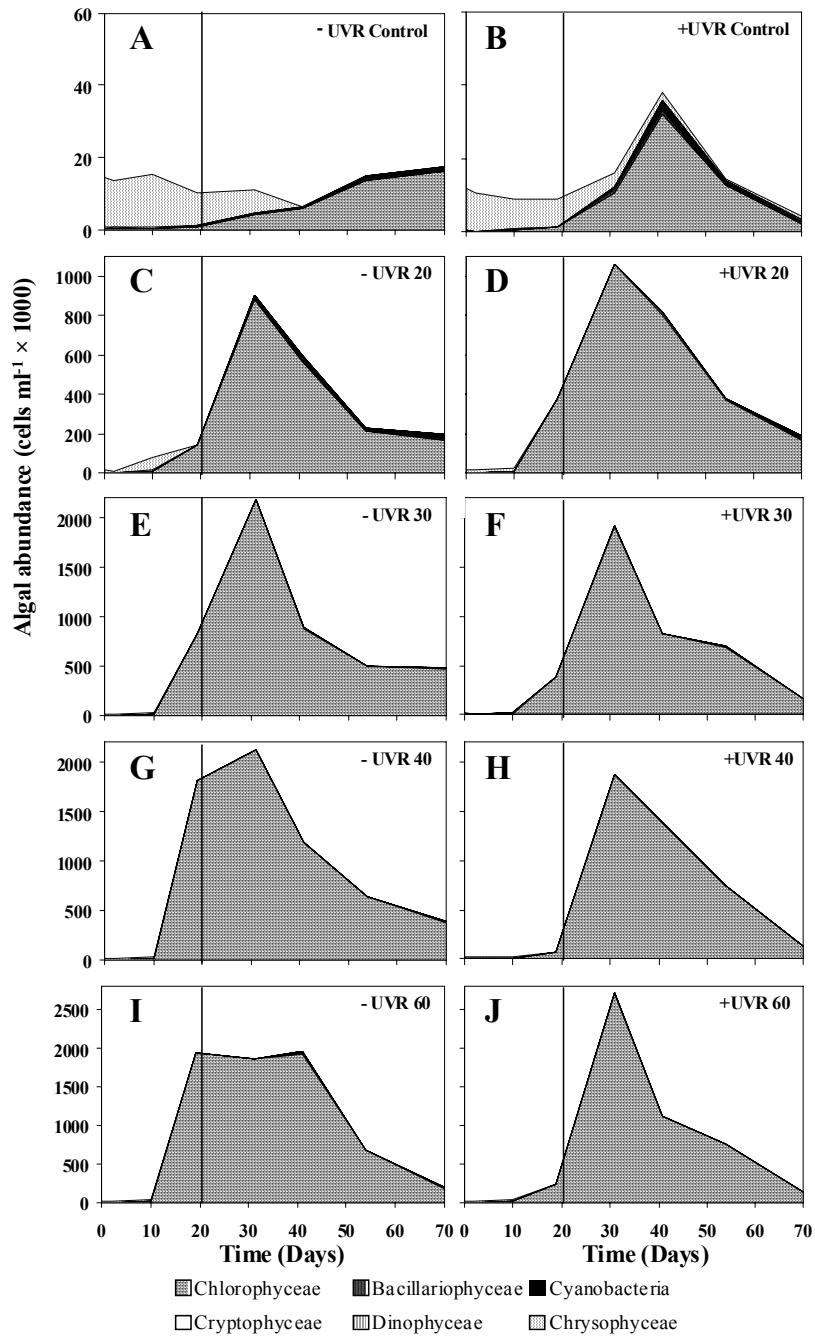


Figure 4-9. Variations in abundance (cells ml⁻¹ × 1000) of different algal groups during the incubation period in all nutrient (control, 20, 30, 40 and 60-µg P L⁻¹) and light (-UVR, +UVR) treatments. Vertical line divides the experimental periods (PR and PE period).

Discussion

Few studies have analyzed the interactive effects of UVR and P-enrichment on algal community over the long-term scale and, to our best knowledge, the present study is the first to be performed in freshwater ecosystems. We consider that the spatial and temporal scales used in the experiment setup are sufficiently realistic to allow reasonable predictions to be made of UVR \times P interactive effects on algal community because: i) large enclosures (7 m) allowed vertical migration of algae; ii) the incubation period (2 months) extended over most of the ice-free season; iii) the +UVR treatment reproduced the natural optical conditions in the water column; and iv) nutrient inputs were similar to those measured into the lake area, both in absolute concentration and molar N:P ratios (Villar-Argaiz et al. 2001, Morales-Baquero et al. 2006).

Interactive UVR \times P effects on aggregate and emergent variables of algal community

The interaction between UVR and P was transferred from aggregate variables to algal diversity and evenness as a negative antagonist effect (Fig. 4-8 B and D), since UVR favored the persistence of flagellates and development of UVR-tolerant species of non-flagellates (diatoms, *D. chlorelloides*) in the long-term, whereas P-pulses favored only UVR-tolerant fast-growing species, which became dominant in accordance with our initial hypothesis. Maximum algal diversity was found in the +UVR_{control} treatment on a long-term scale that mimics the ice-free period in the lake (Fig. 4-2). This finding does not support the reported hump-shaped relationship between productivity and diversity (Dodson et al. 2000, but see Mittelbach et al. 2001). Rather, there was a classical trend of decreasing diversity from oligotrophic to eutrophic aquatic ecosystems (Margalef, 1980) and from resource-poor to more productive terrestrial habitats (Tilman, 1986).

An interesting finding of this study was that phosphorus increased planktonic algal diversity (Fig. 4-8A) via a greater evenness on mid-term scale [PR period (Fig.

4-8C)] but reversed the positive effect of UVR on phytoplankton diversity on the long-term scale (Fig. 4-8B). The P enrichment effect on algal diversity contrast with findings in studies performed over short- and mid-term scales (<20 days) after nutrient enrichment (Hough and Thompson 1996, Xenopoulos and Frost 2003, but see Sommer 1985) but agrees with findings by Cottingham et al. (1998) in temperate lakes and by Romo and Villena (2005) in shallow Mediterranean lakes on experimental long-term scales. The dominance of *D. chlorelloides* reflects their ability to follow a bloom-growth strategy similar to that of other rapid-growing species of Chlorophyceae in marine (Moisander et al. 2003, Vuorio et al. 2005) and freshwater ecosystems (Romo and Villena 2005). As a consequence, *D. chlorelloides* had a competitive advantage over flagellated algae after P-pulses, in accordance with results obtained in La Caldera lake after natural (Medina-Sánchez et al. 1999, Villar-Argaiz et al. 2001, Carrillo et al. 2006) and experimental P-inputs when algae were P-limited (high N:P ratio) (Carrillo et al. 2008b). These findings are consistent with the widely observed trend for autotrophs to out-compete mixotrophic algae (flagellated algae in this study) after nutrient inputs (Isaksson et al. 1999, Andersson et al. 2006).

We can infer from our results that (i) the interactive effects of UVR and P-enrichment observed on the assayed variables were modulated by the nutritional status of cells; (ii) the negative interactive effects were transferred from aggregate variables (e.g. growth rates, chl *a* and total abundance) to diversity and evenness, variables at community level that represent emergent properties of the ecosystem.

Regarding the aggregate variables, the interactive UVR \times P effect on non-flagellate growth rate was antagonistic when cells were P-replete, because P-addition suppressed and inverted the stimulatory UVR effect (Fig. 4-6C). This negative response is driven by a lower tolerance of non-flagellates to UVR after the P-pulse on mid-term scale. This complex algal response contrasts with the classically described antagonistic effect, in which the negative effect of one stressor is attenuated by the effect of another stressor, interpreting the antagonism as an increase in species tolerance (Christensen et al. 2006). Moreover, P addition unmasked the inhibitory UVR effect on photosynthetic activity of algae (chl *a*; Fig.

4-7A), as found by other authors (Xenopoulos et al. 2002, Doyle et al. 2005). This unmasking effect is consistent with a co-limitation of algal growth by UVR and P-scarcity (Xenopoulos et al. 2002), since a higher non-flagellate growth rate (mainly Chlorophyceae) was observed in the absence of both stressors (Fig. 4-6C). However, when cells became P- exhausted (PE period), the interactive effect on non-flagellate algal growth rate disappeared (Fig. 4-6D) but the interactive effect on chl *a* persisted, with a greater deleterious UVR effect across the P-gradient (negative synergistic effect; Fig. 4-7B). Likewise, the inhibitory UVR effect on non-flagellate growth rates at highest P-levels in the PR period was transferred to total algal abundance in the PE period (Fig. 4-7D). Further, this interactive effect on algal abundance may also result from: (i) the lower non-flagellate growth rate (Fig. 4-6D) detected under UVR in the PE period (algal P-starvation; Shelly et al. 2005), generating greater algal loss from the higher abundance of the algal community, (ii) the decrease in temperature (see end of experimental period in Figs 4-1C and 4-6), which could inhibit enzymatic photodamage repair mechanisms (Roos and Vincent, 1998, Pakker et al. 2000, Hoffman et al. 2003).

Algal UVR tolerance

Interestingly, the successional shifts in algal composition and higher diversity under UVR non-P-added conditions are in accordance with the specific composition of the algal community in the lake water column (Figs 4-2 and 4-9). The higher diversity was because of the greater species richness resulting from the persistence of Chrysophyceae and the appearance of Bacillariophyceae (Figs 4-2 and 4-9B) and to the increase of evenness among the species constituting the algal community (Fig. 4-8D, see non-enriched treatment). These results contrast with the negative UVR effects on diversity obtained in boreal lakes (Xenopoulos and Frost, 2003) and the lack of response found in alpine (Halac et al. 1997) and marine (Villafañe 2004) ecosystems. Interestingly, however, our calculation of the Shannon index based on data of Cabrera et al. (1997) showed a stimulatory effect of UVR on diversity in Andean lakes (from 0.4 bits ind⁻¹ in -UVR to 1.1 bits ind⁻¹ in +UVR at the end of their experimental period). Similar increments in diversity were found in

communities of epilithic algae intensely exposed to UVR (Bothwell et al. 1993, but see Watkins et al. 2001).

The absence of a generalized pattern of response of algal diversity to UVR in the few studies performed to date can likely be explained by the different temporal scales considered. Thus, the effect of UVR on algal diversity was null (Halac et al. 1997, Villafaña 2004, this study) or negative (Xenopoulos and Frost 2003) in medium-term incubations (<16 days) but clearly stimulatory in long-term (>30-day) incubations (Bothwell et al. 1993, Cabrera et al. 1997, this study).

The appearance of diatoms under UVR may be explained by structural and physiological mechanisms. Thus, large-sized species may be less susceptible to UVR-induced DNA damage because of the longer distance between cell surface and nucleus and greater intracellular pigment UVR screening effect (Karentz et al. 1991, García-Pichel 1994, but see Laurion and Vincent 1998).

Interestingly, the persistence of Chrysophyceae species (mainly *Chromulina nevadensis*) under UVR, which contrasts with other published results (Xenopoulos et al. 2000, Xenopoulos and Frost 2003, but see van Donk et al. 2001), suggests a greater tolerance of these species to high UVR fluxes. This tolerance in La Caldera lake may be related to: (i) a predation-mediated stimulatory effect on flagellated algae (Carrillo et al. 1995) because of high P-regeneration by zooplankton in the water column (Carrillo et al. 1996, Reche et al. 1997, Villar-Argaiz et al. 2001); (ii) their possession of flagella, allowing them to avoid high intensities of harmful UVR by moving vertically in the water column (Carrillo et al. 1991), which is favored by the depth (7 m) of our enclosures; and (iii) their mixotrophic ability (Medina-Sánchez et al. 2004). Considered together, these processes may explain the net stimulatory effect of UVR on algal community abundance on the long-term scale (Fig. 4-9B) and the maintenance of algal diversity.

In summary, the greater diversity and algal abundance under UVR agree with the proposal of Vinebrooke and Leavitt (2005) that organisms exposed to UVR for long periods, e.g. in high-mountain lakes, may have a high tolerance to UVR. In fact, our results suggest that algae can take advantage even of this apparently adverse

situation. However, the tolerance to UVR and P are negatively correlated (i.e. negative species co-tolerance *sensu* Vinebrooke et al. 2004) because of the ecological trade-off involving algal UV tolerance and competitive ability for nutrients. Therefore, the synergistic interaction between UVR and P together with stress-induced community sensitivity represents a worst-case scenario of maximal species loss hypothesized by Vinebrooke et al. (2004).

Implications

Although UVR has generally been considered harmful to organisms (see review Perin and Lean, 2004, Häder et al. 2007), UVR exposure resulted in a higher algal diversity on the long-term scale. This result indicates algal acclimation to a recurrent damaging factor and is in agreement with the recent questioning of UVR as a stress factor (Paul and Gwynn-Jones 2003). In fact, our finding of a long-term decrease in diversity as a consequence of P-inputs allows us to consider the input rather than the scarcity of P to be a stress factor in chronically P-limited ecosystems.

The negative synergetic effect of UVR and P on the algal community and the decrease in algal diversity after P-pulse on a long-term scale indicates a negative correlation between the tolerance of species to UVR and their tolerance to P-pulse (see Vinebrooke and Leavit 2005). Consequently, if flagellates with mixotrophic metabolism predominate as a result of their acclimation to severe nutrient limitation and UVR-stress (Medina-Sánchez et al. 2004), the increased frequency and intensity of P-atmospheric inputs associated with North Atlantic Oscillation anomalies and global change (Escudero et al. 2005, Woodward et al. 2005) may lead to the disappearance of this key functional group. The loss of mixotrophs, which constitute a by-pass in the C-flux between microbial loop and grazing chain (Medina-Sánchez et al. 2004) could affect the function of ecosystems. This effect would be exacerbated in high-mountain (Díaz et al. 1998, Felip et al. 1999, Straškrabová et al. 1999a), Boreal (Lepistö and Roserström 1998), Arctic (Brutemark et al. 2006) and Antarctic (Izaguirre et al. 1998) lakes and in the North Atlantic Ocean (Zubkov and Tarran 2008) where mixotrophic flagellates represent more than 50% of algal abundance.

The biological impoverishment associated with the loss of key functional species would reduce the resilience of ecosystems to perturbations produced by more frequent aerosols (increased P loads) from desert areas. Finally, the loss of mixotrophs, which are rich in polyunsaturated fatty acids (Boechat et al. 2007), would reduce the quality of food available to herbivorous zooplankton (Müller-Navarra et al. 2000, Villar-Argaiz et al. 2008, 2009), the dominant heterotrophs in most high-mountain lakes.

5 Interactive effects of phosphorus loads and ultraviolet radiation on primary production and elemental composition of algae

Published as Carrillo et al. 2008a

Abstract

Ultraviolet solar radiation (UVR) and atmospheric nutrient loads to pristine ecosystems are global climate change phenomena that simultaneously affect aquatic organisms in ways not easily predicted by single factor studies. Plankton in a high mountain lake was exposed *in situ* to increasing phosphorus (P) concentrations (mimicking atmospheric pulses) in absence or presence of ultraviolet radiation (UVR) in order to identify their interactive effect on functional (primary production, organic carbon release [EOC], and percentage of carbon released [%EOC]), growth rate, structural-physiological (algal biomass, sestonic C, P-content, chlorophyll *a*, and chlorophyll *a*:C ratio, P cell quota, cell-specific chlorophyll *a*), and stoichiometric (autotroph C:P ratio) traits. The availability of P after the pulse determined the intensity of responses by primary producers to UVR stress. All structural-physiological and functional variables significantly increased by up to two orders of magnitude in response to P-enrichment. UV radiation, over a long-term scale, exerted significant deleterious effects on most structural-physiological variables when inorganic P was added at high levels ($\geq 30 \mu\text{g P L}^{-1}$). The subsequent unexpected negative synergistic UVR \times P effect on algal development did not support our initial hypothesis that P-input might buffer the harmful UVR effect. UVR exerted a weak negative effect on primary production but strongly enhanced the absolute and percentage excretion of carbon (up to 60%), mechanism responsible of a significant reduction in autotroph C:P ratios. We propose that low sestonic C:P ratios are the outcome of an adaptive strategy of algae in environments with high UVR exposure and extreme nutrient limitation and have important implications for C flux through grazing versus microbial food webs in oligotrophic systems.

Introduction

Global climate change is the result of multiple alterations of different key environmental factors that regulate the growth of organisms and the functioning of ecosystems. It is, therefore, important to assess interactions among multiple abiotic stressors acting at different rates and on local (e.g. eutrophication, drought, increased ultraviolet radiation [UVR]) and global (e.g. ozone depletion, atmospheric dust, global warming) scales if we are to predict the effects of anthropic impacts on ecosystems. This issue has become a central focus of research (Folt et al. 1999, Doyle et al. 2005, Przeslawski et al. 2005). The potential complexity resulting from the interaction of multiple factors over time cannot solely be predicted from single-factor studies. Thus, the non-additive (synergistic and antagonistic) nature of the joint effects of multiple factors calls for experimental setups that can simultaneously test for single and interactive effects. This approach could increase the reliability of predictions of species performance, food web interactions, and biogeochemical anomalies (Harrington et al. 1999, Doyle et al. 2005).

Increased UVR flux at the Earth's surface due to stratospheric ozone depletion (Shindell et al. 1998) and low-ozone events in Europe (Perez et al. 2002, Keil et al. 2007) can negatively impact the structure of the trophic web and numerous processes within it. The hazardous effect on primary producers is of special importance because it affects the exchange of CO₂ between the water and the low atmosphere and impinges on the amount of energy and materials entering the ecosystems (Day and Neale 2002, Helbling and Zagarese 2003 and references therein). Thus, UVR inhibition of the DNA synthesis, biochemical composition, photosynthesis (Karentz et al. 1991, Goes et al. 1996, Carrillo et al. 2002), nutrient uptake (Hessen et al. 1997), and growth (Buma 2003) of primary producers has been demonstrated in short-field and laboratory experiments. On the other hand, longer-term experiments showed lower or suppressed inhibitory UVR effects on the biomass, species composition, and growth rates of phytoplankton (Halac et al. 1997, Laurion et al. 1998, Mostajir et al. 1999). These conflicting results hinder the establishment of a straightforward connection between reduced metabolic rates (e.g., carbon [C] fixation) and algal growth under UVR stress. Likely, the effect of UVR

on biota could be less pronounced due to potential acclimation and adaptation resulting from long-term exposure to intense solar irradiance in very clear (<1 mg DOC L⁻¹) alpine lakes (see review by Vinebrooke and Leavitt 2005). It has been proposed that evolutionary adaptive strategies, including synthesis of photoprotective compounds (Zudaire and Roy 2001), repair mechanisms (Banaszack 2003), or migratory behavior (Leech and Williamson 2001, Carrillo et al. 1991) may be responsible for an attenuation of UVR effects that allows algae to prosper in high UVR environments. It is well documented that most of the adaptive mechanisms and the sensitivity of algae to UVR depend upon nutrient availability, nitrogen (N) in marine (Shelly et al. 2002, Korbee-Peinado et al. 2004, Villafañe 2004) and phosphorus (P) in freshwater (Hiriart et al. 2002, Xenopoulos and Frost 2003, Medina-Sánchez et al. 2006) ecosystems as the main limiting nutrient in each ecosystem, respectively.

P-limitation is enhanced in clear-water oligotrophic lakes, e.g., Arctic and many Alpine and high-mountain ecosystems (Straškrabová et al. 1999a, Chatila et al. 2001, Doyle et al. 2005, Carrillo et al. 2006). However, there is growing evidence that many oligotrophic lakes in Europe (e.g., Psenner 1999, Morales-Baquero et al. 2006) are influenced by major atmospheric mineral inputs of terrestrial origin that contain high levels of phosphorus (P) (Prospero and Lamb 2003). This may be especially important in the lakes of Sierra Nevada (Southern Spain), a mountain range that constitutes the first natural barrier for aerosol-transport to the European continent (Morales-Baquero et al. 2006). Previous studies in these lakes showed strong algal (Villar-Argaiz et al. 2001) and chlorophyll (Morales-Baquero et al. 2006) developments in these lakes after input of Saharan dust (Villar-Argaiz et al. 2002). These results are consistent with the attenuation of negative UVR effects on primary production (Carrillo et al. 2002) found when P was added to P-limited algal assemblages in short-term experiments (Medina-Sánchez et al. 2006), although the beneficial effect of shading by dust particles on phytoplankton might not be disregarded. From all the above, we hypothesize that atmospheric nutrient inputs may buffer the longer-term harmful effects that UVR exerts on primary producers, favoring persistence and dominance of algae in these highly UVR stressed ecosystems.

Further investigation is warranted into the interactive effects of nutrients and UVR on ecosystems, of increasing importance in the Mediterranean Region due to the rising intensity and frequency of atmospheric material inputs from the Sahara desert associated with North Atlantic Oscillation anomalies (Escudero et al. 2005) and the increasingly higher fluxes of UVR at high altitudes associated with global changes (Häder et al. 2007).

Interestingly, previous results also showed that (i) the detrimental effect of UVR on primary production (Carrillo et al. 2002), (ii) the short-term response of algal growth to P enrichment (Villar-Argaiz et al. 2002), and (iii) the existence of interactive effects of nutrient and UVR on primary production (Medina-Sánchez et al. 2006) are in concert with the elemental composition of primary producers. These results underline the relevance of algal stoichiometry as a key variable modulating the biological and ecological response to variations in UVR and P-limitation. Taken together, these results amplify the web of connections among strong light, nutrients, and elemental composition elegantly described in the light-nutrient hypothesis proposed by Sterner et al. (1997). In fact, it was recently reported that UVR directly influences the elemental composition of seston and epilithon in boreal lakes (Xenopoulos et al. 2002, Tank et al. 2003). Although several mechanisms have been proposed to explain the observed decreases in elemental composition, none have been directly tested (Xenopoulos et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2006). Important questions remain to be addressed. What are the mechanisms that truly underlie these decreases in autotroph C:P? Are they (direct or indirect) adaptive mechanisms that emerge to counteract the harmful effect of UVR? Can these responses be generalized to other aquatic ecosystems? Knowledge of the mechanisms behind the decrease in sestonic C:P ratios is of great interest because of the critical role of primary producer elemental composition in the functioning of food webs (Sterner and Elser 2002).

With this background, the goal of the present study was to test our hypothesis by assessing the long-term interactive effects of UVR and nutrient-pulse on primary producers. An analysis was conducted on changes in the elemental composition, biomass, chlorophyll *a* (chl *a*), primary production (PP), and organic C excretion of algae in a high mountain lake of Sierra Nevada in response to *in situ* experimental

manipulations of light quality and nutrient availability. A factorial design was used, adding increased P concentrations that mimicked atmospheric nutrient pulses (Morales-Baquero et al. 2006) in presence and absence of UVR.

Material and methods

The study site, experimental design, sampling method and further analysis is explained in chapter 4 (and chapter 2 in Spanish), where the procedure to obtain the chlorophyll *a* concentration and the abundance, biomass and growth rate of algae is also detailed. In this section we detail the procedure to obtain the functional and stoichiometric variables of algae.

Sample bottles for PP measurements were incubated in the lake to evaluate whether the P-enriched algal community was less vulnerable to the amount and quality of radiation in natural conditions. This procedure avoids shading in mesocosms from the development of algal community. For PP measurements, sets of four 50-ml quartz flasks (three clear and one dark from each mesocosm) added with 0.37 MBq of NaH¹⁴CO₃ (specific activity [SA]: 310.8 MBq mmol⁻¹, NEN Dupont) were incubated in situ at 5 m under surface (+UVR samples) or under Plexiglas UF3 layer (-UVR samples) for 4 h symmetrically distributed around noon. All flask sets were horizontally held during the incubations. PP calculations were based on ¹⁴C method (Steeman-Nielsen modified by Lignell, 1992). Briefly, the laboratory procedure consisted of segregation of the organic ¹⁴C retained in algae (> 1 μm; PP) from the dissolved (< 1 μm) fraction using 1-μm-pore-size filters of 25-mm diameter (Nuclepore Whatman). To minimize cell breakage, we applied low pressure (< 100 mm of Hg). The algal excretion of organic C (EOC) corresponded to the organic ¹⁴C measured in the < 1 μm fraction, and the percentage of excretion of organic carbon (%EOC) was calculated as %EOC = EOC × PP⁻¹ × 100 (see more details in Carrillo et al. 2002). The volume filtrated onto each filter was previously adjusted to the algal concentration to avoid oversaturation of the filter and ranged from 50 ml (control treatments) to 15 ml (under treatment with higher chl *a* concentration).

No autotrophic picoplankton were found in 1- μ m-filtered water samples preserved with 1% (f.c.) formaldehyde-cacodylate buffer after these were filtered through black Nuclepore 0.2- μ m pore-size filters and examined by auto-fluorescence in a Leitz Fluovert FS epifluorescent microscope at ≤ 2 weeks after the sampling (Straškrabová et al. 1999b). The relationship between sestonic carbon and estimated algal carbon values (by microscope count followed by transformation to C-biomass of cell size multiplied by their abundance (see below)) was $R^2=0.75$, slope 1.09, ruling out an underestimation of carbon excretion by retention on the 1- μ m-pore size filter.

For sestonic C and P determinations, samples were filtered through precombusted (1 h at 550°C) 1- μ m glass fiber filters (Whatman GF/B) at low pressure (<100 mm of Hg). Filters were then immediately analyzed for P or dried (24 hrs to 60°C), and kept desiccated until C analysis. Particulate C was determined using a Perkin-Elmer model 2400 elemental analyzer. For the analysis of particulate P, filters were introduced into acid-washed vials, digested with a mixture of potassium persulphate and boric acid at 120°C for 30 min, and determined as SRP in 10 cm quartz cuvettes via acid molybdate technique (APHA, 1992). Blanks and standards were performed for all procedures. All C:P ratios were calculated on a molar basis.

Statistical analysis

Given the absence of replicates for individual treatments, effects of nutrient enrichment for each light treatment on sestonic C and P, chl *a*, algal biomass, growth rate, C:P and chl *a*:C ratios, P cell-quota, and cell-specific chl *a* were assessed by simple regression analysis of mean values for all sampling dates against P enrichment level. When the regression was significant, the UVR effect was assessed by analysis of covariance. When both slopes of regression lines were homogeneous (no interaction), the UVR effect was assessed by differences in the y-axis intercepts. When the slope of the regression line was different for the two light treatments (interaction with covariate), significant differences at given P enrichment levels were

graphically determined by examining 95% confidence intervals of the regression lines. When no significant effects of P enrichment were found, effects of UVR for a given P level were further assessed using paired t-test.

Effects of UVR, P-addition, and their interaction on PP and dissolved organic carbon (EOC and %EOC) were assessed by two-way repeated measures ANOVA for all sampling dates in each experimental period (see below). This approach treated the three measurements for each sample date as replicates for statistical purposes. Post-hoc comparisons among light treatments were tested by means of the Bonferroni test for each P level. Normality (by Shapiro-Wilks' W-test) and homoscedasticity (Levene's test) were examined to ensure ANOVA assumptions were met, and data were log transformed when they were not. Statistical analyses were performed using Statistica 6.0 for Windows software (StatSoft Inc. 2001).

The relationship between the percentage excreted organic carbon (%EOC) in + UVR treatments and the decrease in C:P ratio in both light treatments ($C:P_{+UVR}$ minus $C:P_{-UVR}$) at each P-enrichment level was established by simple regression analysis.

Results

The added-P was depleted from Day 20 until the end of the experimental period (see chapter 4, Fig. 4-3), creating two periods based on P-availability (PA), which can have profound effects on organisms and ecological processes: (i) the first 11 days, when inorganic P was plentifully available (hereafter referred to as PA period); and (ii) from day 20 until the end of the experiment, when P was depleted to lake background levels (referred to as No-P availability [NoPA] period).

Table 5-1. Results of simple regression analysis of P-enrichment on structural variables of primary producers in both light treatments (+UVR, -UVR). Algal biomass ($\mu\text{g C L}^{-1}$), growth rate (GR, d^{-1}), chlorophyll *a* (chl *a*; $\mu\text{g L}^{-1}$), sestonic carbon content (Sestonic C; $\mu\text{g C L}^{-1}$), sestonic phosphorus content (Sestonic P; $\mu\text{g P L}^{-1}$), P cell quota (pg P cell^{-1}), cell-specific chlorophyll *a* ($\text{pg chl } a \text{ cell}^{-1}$), Sestonic C:P ratio, and chlorophyll *a* : Sestonic Carbon (chl *a* : C) ratios. All R^2 values are rounded to two significant digits. UVR = Ultraviolet radiation. Number in bold = significant relationship between P and dependent variables; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Dependent Variable		P-availability				No P-availability			
		Intercept	Slope	R^2	p	Intercept	Slope	R^2	p
Algal biomass	+UVR	17.67	0.45	0.79	0.043	119.93	14.33	0.91	0.011
	-UVR	33.11	0.03	0.00	0.956	14.58	25.10	0.98	0.001
GR	+UVR	-0.14	0.01	0.93	0.008	-0.02	-0.00	0.85	0.024
	-UVR	0.01	0.00	0.65	0.099	0.00	-0.00	0.69	0.078
Chl <i>a</i>	+UVR	4.93	0.06	0.33	0.306	7.17	1.49	0.96	0.003
	-UVR	4.45	0.16	0.84	0.027	5.86	2.31	0.98	0.001
Sestonic C	+UVR	197.03	-0.39	0.21	0.437	348.99	23.26	0.83	0.030
	-UVR	163.86	0.49	0.35	0.290	388.15	28.18	0.82	0.035
Sestonic P	+UVR	3.05	0.08	0.69	0.079	1.25	0.36	0.99	0.000
	-UVR	2.49	0.12	0.93	0.008	0.46	0.40	0.99	0.000
Sestonic C:P	+UVR	206.17	-3.04	0.62	0.115	267.81	-1.17	0.27	0.363
	-UVR	175.05	-2.46	0.67	0.092	356.25	-2.38	0.64	0.105
Chl <i>a</i> cell ⁻¹	+UVR	0.31	0.00	0.32	0.322	0.19	0.00	0.00	0.964
	-UVR	0.23	0.006	0.86	0.024	0.25	-0.00	0.65	0.100
P cell ⁻¹	+UVR	0.20	0.00	0.63	0.111	0.11	-0.00	0.21	0.441
	-UVR	0.18	0.005	0.84	0.029	0.08	-0.00	0.55	0.151
Chl <i>a</i> : C	+UVR	0.02	0.00	0.56	0.141	0.03	0.00	0.96	0.003
	-UVR	0.02	0.001	0.89	0.016	0.03	0.00	0.96	0.003

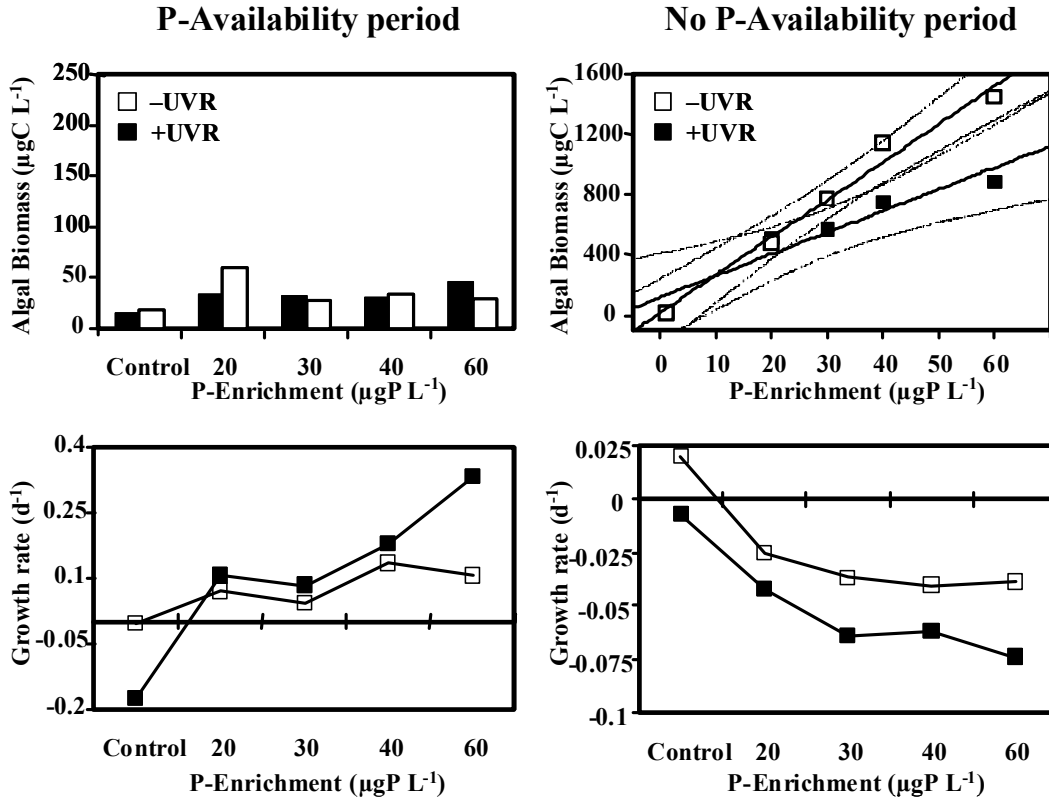


Figure 5-1. Mean values of algal biomass and growth rates measured under full sunlight (+UVR) and PAR (-UVR) light treatments in non-enriched (control) and enriched treatments during P-availability (left panel) and No P-availability (right panel) incubation periods. Significance of paired t-test comparisons between light treatments for each phosphorus level: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Effects of P-enrichment and UVR on algae: Biomass, chl a and elemental composition

Algae exposed to UVR generally developed more slowly than did non-exposed algae, as indicated by changes in biomass in the NoPA period and the significant inhibitory UVR effect on chl *a* in both experimental periods (a decrease up to 50%) (Figs. 5-1, 5-2). P-enrichment significantly stimulated algal biomass, chl *a*, and sestonic C in both light treatments during NoPA period (Table 5-1, Fig. 5-2), increasing their values by more than one order of magnitude during the incubation

period (from 24 to 1270 $\mu\text{g C L}^{-1}$, from 3.3 to 119 $\mu\text{g chl } a \text{ L}^{-1}$ and from 180 to 1800 $\mu\text{g C L}^{-1}$ in +UVR_{control} vs. -UVR₆₀ treatments; Figs. 5-1, 5-2). The positive response of algal growth rate to P-enrichment was only evident in PA period, reaching 0.33 d^{-1} in +UVR treatments with higher enrichment ($>30 \mu\text{g P L}^{-1}$), whereas negative growth rate values were found in NoPA period, particularly in +UVR treatments with P-enrichment (Fig. 5-1).

Significant UVR \times P interactive effects were found on algal biomass (slope of regression line: $F_{1,6} = 11.23$, $p = 0.015$), chl *a* (slope of regression line: $F_{1,6} = 9.69$, $p = 0.021$) and chl *a*:C (slope of regression line: $F_{1,6} = 11.78$, $p < 0.05$) only in NoPA period (Figs. 5-1, 5-2, 5-3). These effects were synergistic, with a greater effect of UVR as the P-input concentration increased. In contrast, no significant UVR \times P interactive effect on sestonic C was detected (Fig. 5-2).

The response of sestonic P content to UVR was markedly different from the responses of algal biomass and chl *a*, especially in the NoPA period. Thus, UVR weakly depressed sestonic P-content in the PA period, but not in the NoPA period (Fig. 5-2). In contrast, P-enrichment significantly increased sestonic P content in both light treatment in NoPA period (by more than one order of magnitude, from 1.2 to 24 $\mu\text{g P L}^{-1}$ in +UVR_{control} vs. -UVR₆₀ treatments; Table 5-1; Fig. 5-2). A different pattern was followed by the P cell quota, which showed the highest values ($>0.3 \text{ pg P cell}^{-1}$ in P-enriched treatments) during PA period and decreased by more than one order of magnitude ($< 0.02 \text{ pg P cell}^{-1}$ in P-enriched treatments) during NoPA period (Fig. 5-3). No significant UVR \times P interactive effects on sestonic P-content or P-cell quota were found (Figs. 5-2, 5-3).

In spite of similar UVR and P effects on sestonic C and P content, a different sestonic C:P ratio pattern emerged. Thus, UVR weakly increased sestonic C:P ratio at some P levels during PA period but significantly diminished this ratio from 11 to 30% during NoPA period (Fig. 5-2). P-enrichment decreased sestonic C:P ratios in both periods (Fig. 5-2) but the effect was stronger in the PA period, when the sestonic C:P ratio under +UVR₆₀ was one-third that under +UVR_{control}. No significant UVR \times P interactive effect on sestonic C:P ratio was found. UVR produced a highly significant decrease in this ratio regardless of the initial P-pulse in NoPA period.

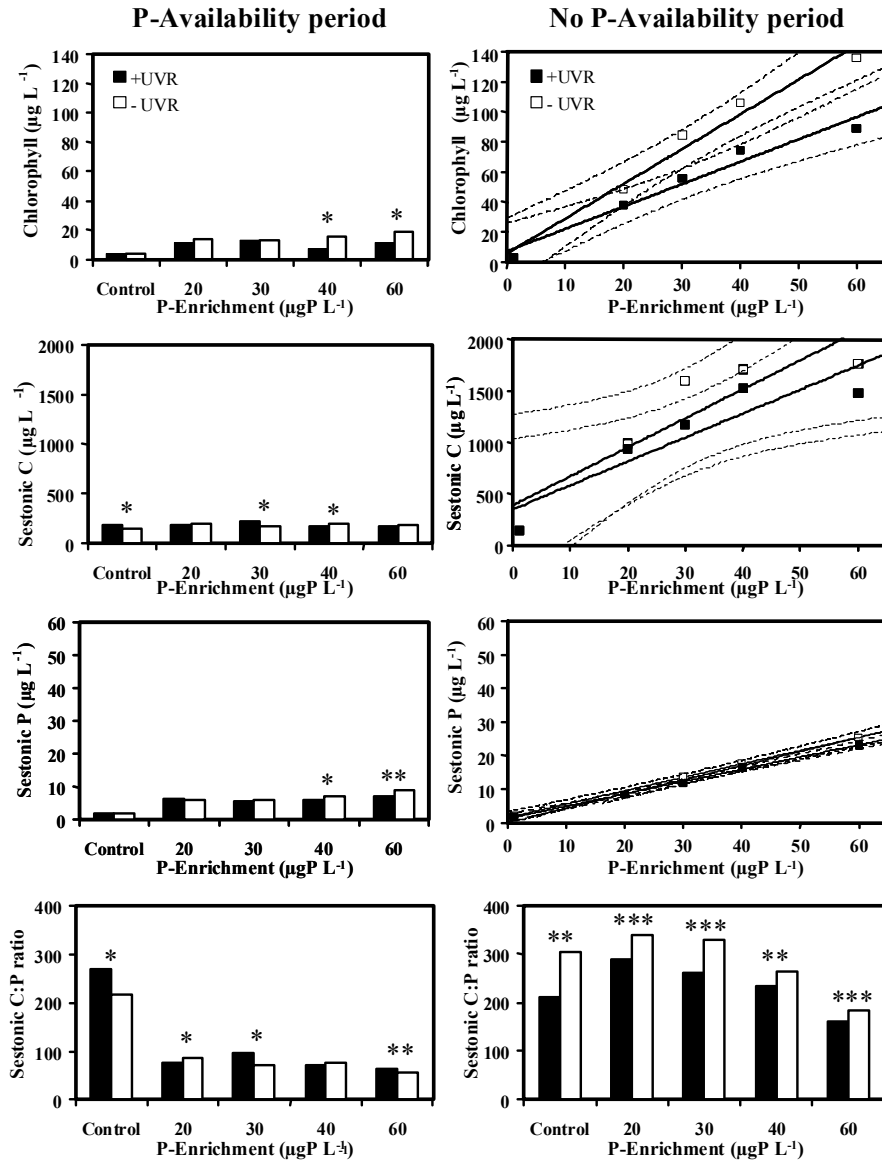


Figure 5-2. Chlorophyll a, sestonic carbon, phosphorus, and C:P ratio measured under full sunlight (+UVR) and PAR (-UVR) light treatments in non-enriched (control) and enriched treatments during P-availability (left panel) and No P-availability (right panel) incubation periods. Significance of paired t-test comparisons between light treatments for each phosphorus level: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Bars represent mean values for entire PA (3 sampling days) and NoPA (5 sampling days) periods. Regression lines are inserted when the relationship across the P gradient was significant at $p < 0.05$ in both light treatments. 95% confidence intervals are denoted by dotted lines to evaluate significant differences between +UVR and -UVR mesocosms.

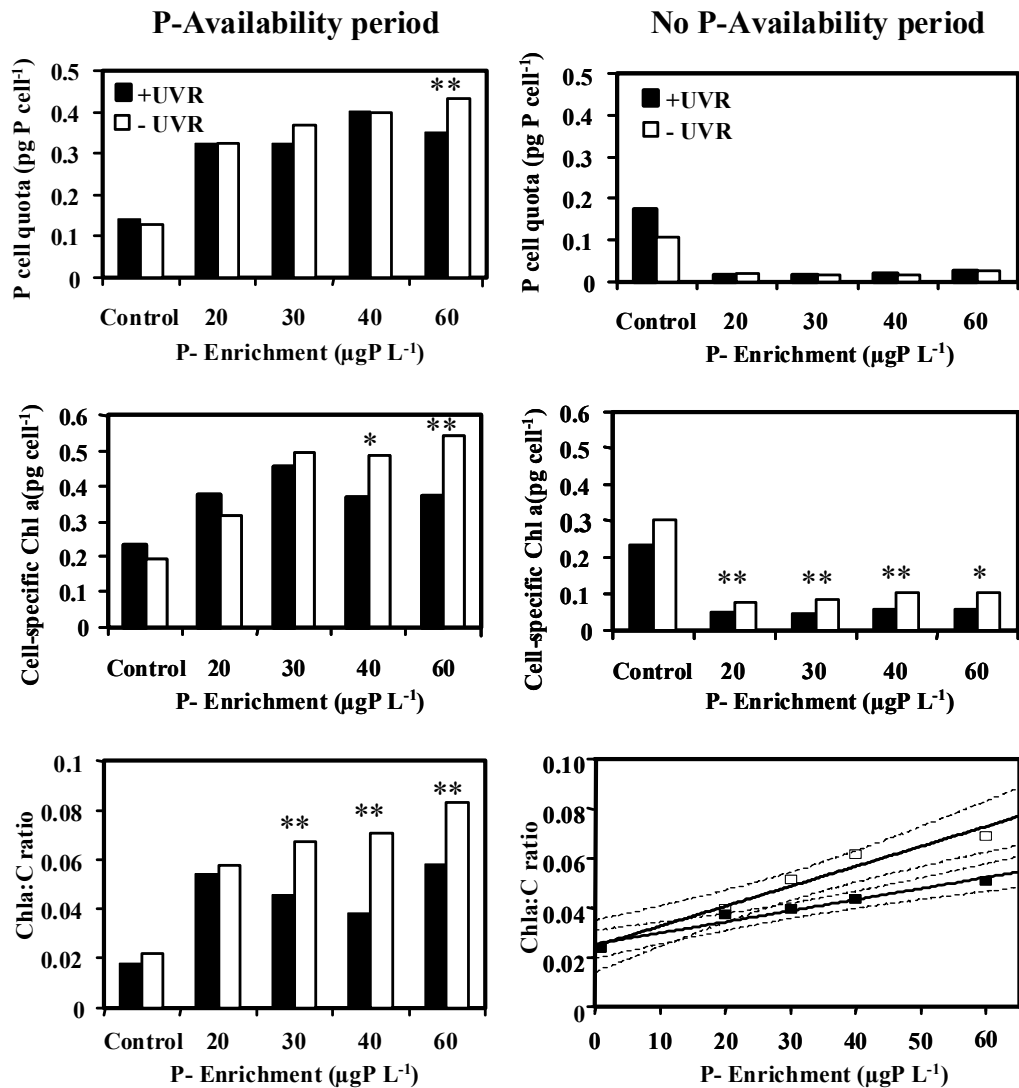


Figure 5-3. P cell quota, cell-specific chlorophyll, and Chlorophyll a: C ratio measured under full sunlight (+UVR) and PAR (-UVR) light treatments in non-enriched (control) and enriched treatments during P-availability (left panel) and No P-availability (right panel) incubation periods. Significance of paired t-test comparisons between light treatments for each phosphorus level: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Bars represent mean values for entire PA (3 sampling days) and NoPA (5 sampling days) periods. Regression lines are inserted when relationship across the P gradient was significant at $P < 0.05$ in both light treatments. 95% confidence intervals are denoted by dotted lines to evaluate significant differences between +UVR and -UVR mesocosms.

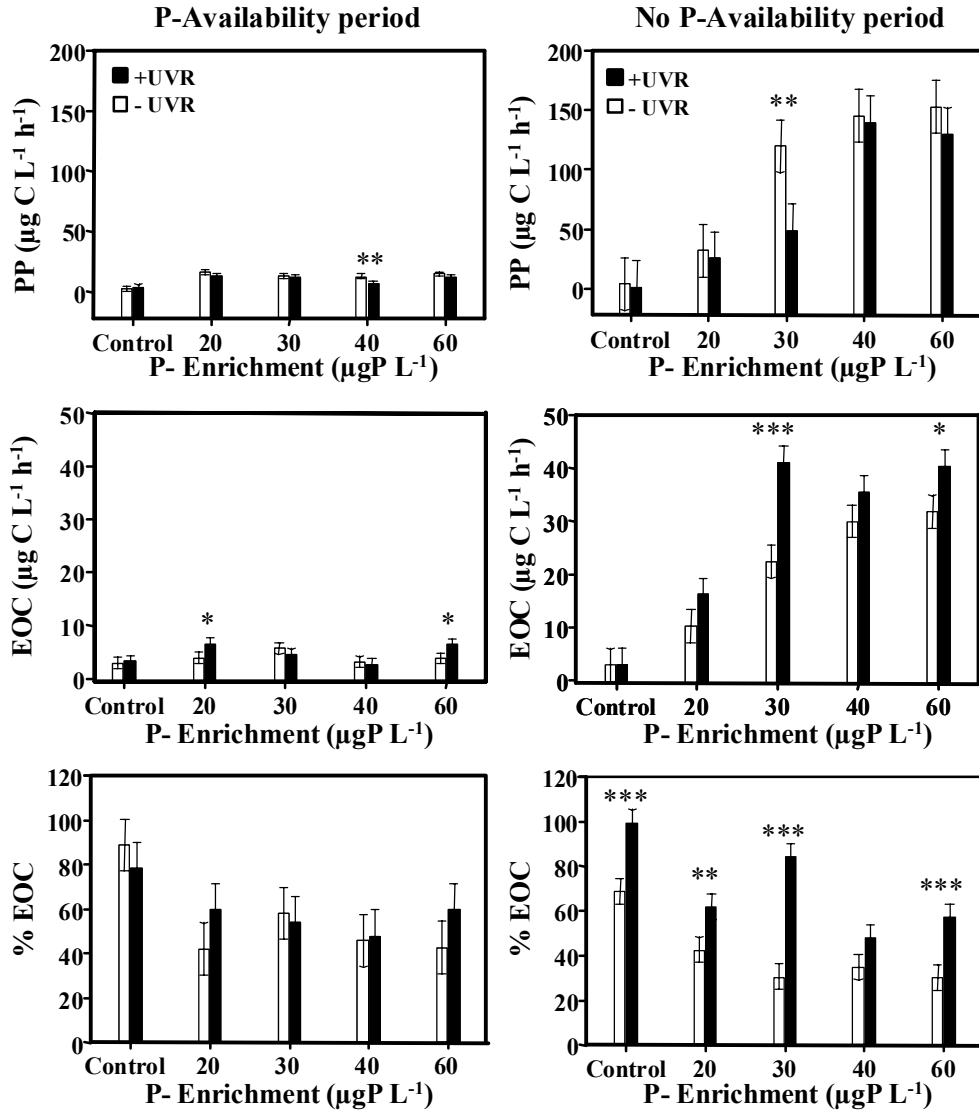


Figure 5-4. Primary Production (PP), excretion of organic carbon (EOC), and percentage of excretion of organic carbon (%EOC) measured under full sunlight (+ UVR) and PAR (-UVR) light treatments in non-enriched (control) and enriched treatments during P-availability (left panel) and No P-availability (right panel) incubation periods. Bars represent mean values for entire PA (n =9) and NoPA (n=15) periods. Error bars, mean ± 95% confidence intervals. Significance of post-hoc comparisons between light treatments for each P level: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Effects of P-enrichment and UVR on algae: primary production and photosynthetic C release

UVR effect on PP was weakly inhibitory in both experimental periods (Fig. 5-4, Table 5-2), as no effect was observed for most of the P-enrichment levels (Fig. 5-4). In fact, the inhibitory effect of UVR was only significant in the 40 $\mu\text{g P L}^{-1}$ treatment of PA period and in the 30 $\mu\text{g P L}^{-1}$. In contrast, P-enrichment significantly stimulated PP in both experimental periods (Table 5-2), especially in NoPA period, when PP values increased from 1 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (+UVR_{control}) to 129 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (+UVR₆₀) and from 4 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (-UVR_{control}) to 152 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (-UVR₆₀) (Fig. 5-4). Thus, these effects were similar to those found for sestonic C, P, chl *a*, and algal biomass values (Fig. 5-2). A significant UVR × P interactive effect on PP was found in each period and was similar to the effect on the structural variables (chl *a*, algal biomass in NoPA period; Table 5-2).

UVR had a stronger impact on EOC values during NoPA period than during PA period. Thus, the EOC increase was 63% higher under +UVR₃₀ than under -UVR₃₀ treatment (Fig. 5-4 and Table 5-2). P-enrichment also favored the release of organic carbon by algae, even in PA period (Table 5-2). Thus, the C-released increased from 2.7 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ in -UVR_{control} to 6.6 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ in the enriched treatments (+UVR₆₀) during PA period, whereas during NoPA period it increased from ~3 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ in -UVR_{control} to > 40 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ in the enriched treatments

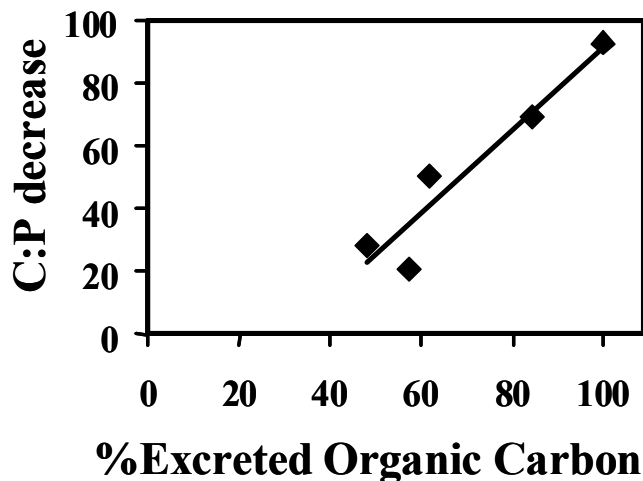


Figure 5-5. Relationship between percentage of excreted organic carbon (%EOC) in +UVR treatment and decrease of C:P ratio between both light treatments at each P-level, linear regression: C:P = 1.3218 % EOC - 40.78; $r^2 = 0,9062$

(+UVR₃₀ and +UVR₆₀) (Fig. 5-4). A significant UVR × P interactive effect was found only in NoPA period (Table 5-2).

Similar effects were observed for %EOC values, which strongly increased as response to UVR only in NoPA period (Fig. 5-4 and Table 5-2), whereas they decreased up to 40-50% with P-enrichment in both periods (Fig. 5-4). The stimulatory effect of UVR on %EOC was attenuated in the treatments with highest P levels, thereby generating a significant UVR × P interactive effect on %EOC with the highest %EOC values at lower nutrient levels, similar to the response of the sestonic C:P ratio observed in NoPA period (Fig. 5-2, Tables 5-1 and 5-2). Interestingly, a highly significantly direct relationship was found between %EOC values in +UVR treatment and the decrease (C:P_{+UVR} minus C:P_{-UVR}) in C:P ratio exerted by UVR at each nutrient level (Fig. 5-5).

Table 5-2. Results of repeated-measures two-way ANOVA for the effect of treatments (P-enrichment and UVR) and their interaction on Primary Production (PP, $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$), excreted organic carbon algae (EOC, $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$), and percentage of excreted organic carbon (%EOC). All F values are rounded to two significant digits. %VAR = percentage of explained variance calculated as sum of squares of treatment/total sum of squares; (+) = stimulatory and (-) = inhibitory effect of the factor; ns = not significant, * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Variables		P-availability					P-availability				
		df	F	p	Effect	% Var	F	p	Effect	% Var	
PP	UVR	1	11.94	<0.01	-	19.6	10.49	<0.01	-	11.9	
	P	4	43.45	<0.001	+	71.2	72.84	<0.001	+	82.8	
	UVR × P	4	4.62	<0.01		7.6	3.64	<0.05		4.1	
	Error					1.6				1.1	
EOC	UVR	1	6.84	<0.05	+	27.0	68.57	<0.001	+	25.3	
	P	4	11.13	<0.001	+	44.0	190.74	<0.001	+	70.4	
	UVR × P	4	6.35	<0.01		25.1	10.64	<0.001		3.9	
	Error					3.9				0.4	
%EOC	UVR	1	1.59	>0.05	ns	8.4	277.61	<0.001	+	74.4	
	P	4	13.74	<0.001	-	72.8	78.42	<0.001	-	21.0	
	UVR × P	4	2.54	>0.05		13.4	16.17	<0.001		4.3	
	Error					5.3				0.3	

Discussion

Effects of UVR and P-enrichment on algae: structural variables

We found different responses of both algal growth rates and standing stock variables (except those related to pigment, such as chl *a*, cell specific chl *a*, and chl *a*:C) to UVR over different temporal scales (11 days [mid-term] vs. 10 weeks [long-term]). Thus, algae standing stock variables were less sensitive to UVR in the mid-term exposure (i.e. PA period), while a more marked deleterious effect of UVR on all study variables was evident in the NoPA period, i.e. when P-pulse was exhausted and algal cells became even more starved than in the non-enriched treatments (control treatments; Fig. 5-3, P cell quota). Our mid-term scale results are similar to other published reports of suppressed inhibitory UVR effects on the biomass, species composition, and growth rates of phytoplankton over time scales not exceeding 15 days (Halac et al. 1997, Laurion et al. 1998, Mostajir et al. 1999, Villafañe 2004).

P-addition strongly stimulated the algal community (growth rate [PA], algal biomass, chl *a*, sestonic C and P content [NoPA]), reflecting the severe P-limitation that algae face in this ecosystem. This stimulus is consistent with the competitive advantage of phytoplankton relative to bacteria after natural (Carrillo et al. 1990, Villar-Argaiz et al. 2001, Morales-Baquero et al. 2006) or controlled P inputs in experiments that ranged from hours (Villar-Argaiz et al. 2002) to weeks (Carrillo et al. 2006, 2008b) in lakes of Sierra Nevada.

The interactive UVR \times P effects on primary producers were synergistic in the long-term but not in the mid-term where an opposite tendency (although not significant) was found (see Fig. 5-1, growth rate). Therefore, our mid-term scale results are consistent with reports for short-term studies (<15 days) in marine phytoplankton and microphytobenthos of a greater resistance to UVR (Villafañe 2004, Korbee-Peinado et al. 2004) under N-enriched conditions and a higher sensitivity to UVR under N-limitation (Litchman et al. 2002, Shelly et al. 2002) and P-limitation (Hiriart et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2006) conditions. The latter results may be explained by the need for N to synthesize defense enzymes and/or screening pigments (Korbee-Peinado et al. 2004) or for P to support repair

mechanisms (Heraud et al. 2005). However, our long-term findings, as well as the inhibitory UVR effect on chl *a* in P-enriched treatments are consistent with the UVB \times P synergistic effect shown for algae over a short-term scale (Behrenfeld et al. 1994, Xenopoulos et al. 2002), although the underlying mechanism is less intuitive.

We propose that the effect of UVR might have a different biological consequences for algae according (i) to the availability of inorganic P, i.e. whether the algal community is P-repleted or P-starved, and (ii) the response variable studied. Thus, during the PA period, chl *a*, chl *a*:C and cell-specific chl *a* all decreased at the highest P-enriched level in presence of UVR. Hence, the stimulating effect of P on algal growth (Fig. 5-1) appears to unmask negative UVR effects during P-inputs. In fact, it was possible to observe an enhanced negative UVR effect on cellular components associated with photosynthetic activity, e.g., chl *a*, P content (see Hessen et al. 2002) but not on variables such as algal biomass or C content (Figs. 5-1, 5-2) less sensitive to UVR (Day and Neale 2002).

In contrast, the UVR effect observed in NoPA period resulted from the high mineral nutrient constraints required to maintain the high algal biomass generated after PA period in P-enriched treatments. The higher inhibitory effect of UVR on growth rate, chl *a* and biomass when algae were P-starved (NoPA period) is consistent with findings by Shelly et al. (2005) and may be related to a deficiency in P for the repair of UVR-induced damage (Heraud et al. 2005) or for the synthesis of phospholipids required to synthesize chloroplast membranes (Hessen et al. 2002) previously damaged (PA). This interpretation is supported by the decrease in P cell quota from 0.5 pg P cell⁻¹ (PA) to <0.02 pg P cell⁻¹ (NoPA period) in enriched treatments. Hence, after exhaustion of the P-pulse, algal sensitivity to UVR was increased due to the higher P-limitation. Similar results were previously reported for N-limited algae in short-term studies (Lichman et al. 2002) and P-starved algae in shorter (Hiriart et al. 2002) and longer (Shelly et al. 2005) term studies. From the comparison of the two study periods, we conclude that UVR negatively affected primary producers after P inputs $\geq 30 \mu\text{g P L}^{-1}$ which triggered the algal growth. This unexpected UVR effect, more pronounced on chl *a* in the mid-term exposure and on algal development in the long-term exposure, did not support our initial hypothesis

that P-input might buffer the harmful UVR effect. Rather, our results indicate that the enrichment with P unmasked the deleterious effects of UVR first on variables associated with photosynthetic activity of algae and later extending to other functional (see below) and standing stock variables as P depletes over longer time scales.

Effects of UVR and P-enrichment on algae: functional variables

Consistent with findings in other mountain lakes (Bertoni and Callieri 1999, Hiriart et al. 2002), UVR weakly inhibited PP in both experimental periods. This effect coincided with high increases in the absolute and relative values of carbon release by algae (EOC and %EOC) due to UVR, as also found in previous short-term studies (Carrillo et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2006).

The fact that PP increased one order of magnitude more than EOC under high P conditions suggests that EOC was not a constant fraction of carbon production (Teira et al. 2001) either over the medium or long scale. This finding implies that C excretion is not only an active process associated with photosynthetic activity (Maurin et al. 1997) but is also enhanced by UVR (Table 5-2 and Fig. 5-3; *see also* Carrillo et al. 2002). Hence, this study sheds light on the classical debate between passive (Bjørnsen, 1988) versus active mechanisms (Wood and van Valen 1990) of algal carbon excretion. The higher %EOC values (mean of 60%) in +UVR treatments and the higher %EOC in less enriched treatments support the proposal that algal excretion of organic carbon is an indicator of physiological stress (Carrillo et al. 2002), reflecting the uncoupling between photosynthesis (^{14}C -assimilation) and algal growth (Figs. 5-1 and 5-4) under high light intensity (with UVR) and low nutrient availability (Berman-Frank and Dubinsky 1999, P cell quota, Fig. 5-4). The release of C under stressful conditions has also been hypothesized to be the result of alternative catabolic pathways developed to maintain the intracellular recycling of phosphorus in P-limited primary producers (Plaxton and Carswell 1999). This hypothesis may be supported by our results, since UVR did not affect P cell quota during NoPA period but increased C-release by algae when P-starvation was

established, which might have important consequences on the C:P ratio. In fact, a direct relationship was found between % EOC released and decrease in C:P under both light treatments (Fig. 5-5).

Finally, the different intensities of UVR effects on PP, chl *a*, algal biomass and sestonic C content are the result of specific sensitivity to UVR stress, since physiological variables are not necessarily reflected in structural traits because these processes operate at different rates (Day and Neale 2002). Because a constant relationship between pigment concentration and autotroph C content or biomass is rarely maintained (Hessen et al. 2002, Xenopoulos et al. 2002, Perin and Lean 2004), chl *a* normalized by sestonic C proved to be a key variable for evaluating the inhibitory UVR effect across the P-gradient despite potential shading inside mesocosms (Fig. 5-3).

Sestonic C:P ratio links structural and functional responses in algae

Our results clearly demonstrate that UVR diminishes the sestonic C:P ratio over a long-term scale. This surprising result contradicts expectations of the light-nutrient hypothesis (Sterner et al. 1997) and underscores the need to consider light quality as a predictive variable in the study of ecosystems. Xenopoulos et al. (2002) were the first authors to experimentally show a decrease in C: P ratio due to UVR. However, the present study contradicts their hypothesis that a decrease in sestonic C:P ratio would be related to an UVR-induced increase in sestonic P-content or inhibition of C-acquisition (Xenopoulos et al. 2002), since UVR was found to have no significant effect on either variable (NoPA period). The lack of sestonic P-content response to UVR in NoPA period is in agreement with the well-established depressor effect of UVR on P-uptake (Hessen et al. 1997) and alkaline phosphatase activity (Tank et al. 2005, data in prep.). However, the weak inhibition of C-acquisition in this study contrasts with the strong PP inhibition by UVR obtained in non-enriched short-term experiments in La Caldera lake (Carrillo et al. 2002).

Further explanations to account for the low C:P ratio include the loss of C due to carbon excretion or bacterivory by mixotrophic algae consuming P-rich bacteria, processes that are enhanced over the short-term by P-addition under UVR stress (Medina-Sánchez et al. 2006). The latter was not relevant in the present study due to the absence of mixotrophic algae after the first week of the experiments (see chapter 4, Fig 4-9). Therefore, the enhancement of carbon excretion (EOC, %EOC; Fig. 5-4) by UVR, regardless of the initial P-pulse, can be considered the most plausible mechanism responsible for the decrease in sestonic C:P ratio, which is also supported by the significant relationship between %EOC and C:P ratio (Fig. 5-5).

Our results are also consistent with the co-limitation exerted by high UVR and low nutrient levels on the C-metabolism and development of primary producers in high mountain lakes, as suggested by Xenopoulos et al. (2002). Thus, only the removal of both stress factors led to the highest stimulation of both structural and functional variables, although P-limitation played a greater role than did UVR. In fact, their combined effect explains the low densities of algae in this type of ecosystem (see Straškrabová et al. 1999a, Carrillo et al. 1996), despite the fact that algae are the main microbial food web component in La Caldera lake in terms of carbon biomass, as shown by a temporal series over 20 years (Medina-Sánchez et al. 2004, Carrillo et al. 2006). This suggests a major algal acclimation to this UVR-stressed environment (see Vinebrooke and Leavitt 2005). We propose that the loss of carbon, resulting in low sestonic C:P ratios, might constitute an adaptive strategy of phytoplankton to high UVR and extreme nutrient limitation. This adaptive response may reflect the presence of alternative catabolic pathways to maintain the intracellular recycling of phosphorus in P-limited primary producers (Plaxton and Carswell 1999) while keeping the photosynthetic apparatus active (fixation of released carbon) until nutrient conditions (i.e. new P-input) allow algal growth (coupled with photosynthesis). This adaptive strategy may also give the organism an advantage by maintaining homeostasis (Frost et al. 2005). This interpretation is supported by the narrow variations in sestonic C:P over interannual scales (Villar-Argaiz et al. 2002) and the return to initial C:P values when the algae were P-starved (NoPA), especially under +UVR treatments. Future studies should test the generality

of the observed stoichiometric traits in different Alpine and high-mountain lakes and other stressful ecosystems (i.e. tropical or Antarctic lakes).

Implications

Traditionally, a lower C:P ratio has been considered an indicator of higher food quality for herbivores (Sterner and Elser, 2002). Hence, the observed reduction in sestonic C:P ratio by UVR might be expected to have an indirect beneficial effect by improving food quality (Xenopoulos et al. 2002). However, recent studies have shown that low seston C:P ratios do not necessarily result in enhanced herbivorous growth (Tank et al. 2003, Leu et al. 2006) probably because, as this study demonstrates, a low seston C:P ratio is a consequence of the loss of C rather than the storage of P. In addition, UVR alters the biochemical composition of C in the food, increasing (Tank et al. 2003, Leu et al. 2007) or decreasing (Hessen et al. 1997, Leu et al. 2006, Villar-Argaiz et al. 2009) the content of total lipids and essential polyunsaturated fatty acids. In summary, we now know that UVR has the potential to simultaneously alter the elemental and biochemical composition of autotrophs. *In situ* studies that address how these effects in turn translate to higher trophic levels are needed to better understand how natural communities will response to future global change.

Enhancement of extracellular C release may have ecological consequences beyond the grazing chain in both terrestrial and aquatic ecosystems. Photosynthetic carbon exudates support microbial activity by enhancement of mutualistic interaction with (i) free-bacteria, which further recycle mineral nutrients by supporting algal growth and/or are food for mixotrophic algae (Aota and Nakajima 2001, Daufresne and Loreau 2001, Medina-Sánchez et al. 2004, Carrillo et al. 2008b); and (2) mycorrhizal or N-fixing symbionts, which would increase the uptake of P or N, respectively (Frost et al. 2005).

Conclusion

The effects of UVR and P *via* summer atmospheric precipitations are important forcing functions that connect algal biomass and the ratio of essential elements to regional or global climate. Studies by our group have shown that over short-term scales (hours), UVR and P interactive effects on primary producers are antagonistic, i.e. P-enrichment decreases negative UVR effects (Medina-Sánchez et al. 2006). However, the combination of stronger P-pulses and UVR results in more severe UVR damage on algal photosynthetic activity over mid-term scales and on functional and structural algal variables over long-term scales (>2 months) (i.e. synergistic interactive effects). Therefore, the increasing frequency and intensity of P-atmospheric inputs (Woodward et al. 2005, Escudero et al. 2005, but see Mahowald and Luo 2003) related to climate anomalies might accentuate the deleterious UVR effect on primary producers in oligotrophic lakes in Europe and probably in large oligotrophic areas of the Mediterranean Sea. Thus, P-Saharan dust, considered “manna from heaven” for oligotrophic areas, may unmask the negative effect of UVR.

6

Efectos interactivos de pulsos de fósforo y radiación UV sobre la estructura y regulación del bucle microbiano

Introducción

En los ecosistemas acuáticos, el funcionamiento de la comunidad planctónica está mediado por una red de intercambio de energía y nutrientes constituida por un conjunto diverso de organismos que se organizan en niveles tróficos: productores y consumidores. La cadena de pastoreo (fitoplancton → zooplancton → peces) ha sido tradicionalmente considerada la principal vía del flujo de energía dentro de la biota en estos ecosistemas. Sin embargo, a raíz del desarrollo de nuevas técnicas de análisis más precisas (Cotner y Biddanda 2002), progresivamente se ha reconocido que los procariotas heterotróficos, junto con los virus que dependen de éstos, son los componentes biológicos más abundantes de la Tierra (Miki y Jacquet 2008). Procariotas y protistas heterótrofos son los componentes básicos del denominado bucle microbiano heterotrófico, que constituye una importante red trófica involucrada en los ciclos biogeoquímicos sobre escalas locales y globales (Cotner y Biddanda 2002, Suttle 2007). Así, las bacterias, que son la base del bucle microbiano, remineralizan la biomasa de los ecosistemas y actúan a la vez como sumidero y como fuente de carbono (C) y nutrientes para niveles tróficos superiores (Cho et al. 1988, del Giorgio y Cole 1998, Cotner y Biddanda 2002).

La dominancia relativa del bucle microbiano sobre la biomasa del nanoplancton autotrófico en ecosistemas oligotróficos ha sido considerada como un paradigma general en las últimas décadas (Cho y Azam 1988, Ducklow y Carlson 1992, Legendre y Rassoulzadegan 1995, Gasol et al. 1997, Cotner 2000, Biddanda et al. 2001). Sin embargo recientes observaciones ponen de manifiesto que ecosistemas oligotróficos de aguas claras como el océano Antártico (Anadon y Estrada 2002, Duarte et al. 2005), lagos boreales (Elser et al. 2003) y lagos de alta montaña (Medina-Sánchez et al. 2004), se desvían de esta tendencia general. Interesantemente, este conjunto de ecosistemas reciben altos flujos de radiación UV (Perin y Lean 2004, Häder 2007, Carrillo et al. 2002) y contienen baja concentración de carbono orgánico disuelto (DOC) (Reche et al. 2001, Morris et al. 1995, Perin y Lean 2004, Doval et al. 2002) lo que permite una elevada penetración de UVR en la

columna de agua. Este escenario sugiere que UVR podría ser un factor limitante del desarrollo del bucle microbiano heterotrófico en estos ecosistemas extremos. De hecho, es bien conocido que UVR disminuye la actividad metabólica bacteriana, su actividad ectoenzimática (Herndl et al. 1993, Müller-Niklas et al. 1995, Aas et al. 1996, Sommaruga et al. 1997) y su viabilidad y crecimiento (Helbling et al. 1995, Bergeron y Vincent 1997). Además puesto que las bacterias carecen de pigmentos fotoprotectores (García-Pichel 1994), son de pequeño tamaño (Jeffrey et al. 1996) y su material genético comprende una porción significativa de su volumen celular (Jeffrey et al. 1996), las bacterias heterotróficas, base del bucle microbiano, son más sensibles a los efectos dañinos de UVR que otros organismos planctónicos (Perin y Lean 2004 y referencias dentro). Sin embargo, en algunos estudios realizados en ecosistemas de aguas claras tanto marinos (Aas et al. 1996) como en lagos de alta montaña (Carrillo et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2002), se ha puesto de manifiesto que la exposición a la radiación solar completa ejerce un efecto neto estimulador sobre la producción bacteriana. Por lo tanto, las distintas evidencias mostradas no permiten establecer si en ecosistemas de aguas claras la radiación UV es el principal factor responsable de la desviación del paradigma de máximo desarrollo del bucle microbiano en oligotrofia.

Otro potencial factor abiótico limitante del desarrollo del bucle microbiano podría ser la escasa disponibilidad de nutrientes inorgánicos propia de ecosistemas oligotróficos. De hecho, tanto estudios experimentales con adición de nutrientes (Jansson et al. 1996, Samuelsson et al. 2002) como estudios observacionales que evalúan el efecto de entradas alóctonas de nutrientes hasta ecosistemas oligotróficos (Roberts et al. 2004, Medina-Sánchez et al. 1999, Villar-Argaiz et al. 2002, Pulido-Villena et al. 2008) muestran un marcado estímulo en la tasa de crecimiento de bacterias heterotróficas y otros componentes del bucle microbiano heterotrófico. Este efecto estimulador de la adición de nutrientes minerales se ha establecido como un patrón de respuesta consistente e independiente del contenido y origen de carbono orgánico disuelto (DOC) en estos ecosistemas limitados en nutrientes minerales (lagos húmicos boreales, antárticos, de alta montaña o mar Báltico). No obstante, existe un amplio espectro de trabajos que evidencian la existencia de restricciones bióticas que limitan el desarrollo del bucle microbiano frente a la entrada de

nutrientes como la existencia de procesos de depredación de bacterias por microheterótrofos (Duarte et al. 2005) y mixótrofos (Medina-Sánchez et al. 2004), o la ventaja competitiva del componente autotrófico en la captura de P (Carrillo et al. 2008b y referencias dentro). Por lo tanto, a la luz de estos estudios es difícil predecir cual sería la respuesta del bucle microbiano frente a la entrada de nutrientes pulsados en sistemas estresados por UVR y escasez de nutrientes.

De todo lo anterior se desprende que, desde una perspectiva de análisis global, el estudio de la interacción entre UVR y los aportes de nutrientes minerales adquiere especial importancia en ecosistemas oligotróficos de aguas claras. Los lagos de alta montaña mediterránea (ej. Sierra Nevada), que presentan pequeñas cuencas de captación (Villar-Argaiz et al. 2001) y que, por su localización geográfica y altitud (>2500 m.s.n.m.), están expuestos a frecuentes entradas de nutrientes alóctonos de origen sahariano (Talbot et al. 1986; Morales-Baquero et al. 1999) y altos flujos de UVR, son ecosistemas de referencia para el análisis de dichos efectos interactivos. Actualmente, existen pocos estudios centrados en esta temática y menos aún que la aborden para toda la red trófica microbiana. Seguramente, el trabajo pionero en este sentido fue el de Bergeron y Vincent (1997), en el que se analizan los cambios estructurales en la red microbiana bajo condiciones experimentales de exposición a UVR y de enriquecimiento con nutrientes, tras tiempos de incubación que abarcan los tiempos de generación de los organismos estudiados. Más recientemente, Medina-Sánchez et al. (2006) analizan el efecto interactivo UVR × P sobre algas, bacterias y su interacción (comensalismo, competencia, depredación) a corto plazo (horas) y muestran que la adición de nutrientes disminuyó la producción bacteriana bajo condiciones de luz completa y limitación nutricional de las algas. Por lo tanto, la interacción de factores fue antagonista, es decir, los nutrientes pulsados ejercieron un efecto negativo sobre la actividad bacteriana que estuvo determinado por un incremento en la bacterivoría (depredación) por algas con actividad mixotrófica. Sin embargo, no es conocida la naturaleza de dichos efectos interactivos sobre la interacción entre algas y los componentes del bucle microbiano en escalas temporales medias (días a semanas) o largas (semanas a meses) A partir de la información disponible, que evidencia un efecto individual estimulador de UVR y P sobre bacterias y bucle microbiano en ecosistemas oligotróficos, nosotros

hipotetizamos que la interacción UVR × P será de carácter sinérgico positivo sobre el conjunto del bucle microbiano.

Para probar esta hipótesis, en este capítulo analizamos:

- 1.- Los efectos combinados de la radiación UV y del enriquecimiento en nutrientes sobre variables estructurales y funcionales de los componentes del bucle microbiano heterotrófico.
- 2.- La relación entre bacterias y los demás grupos de organismos que constituyen el bucle microbiano (nanoflagelados heterotróficos, virus y ciliados), así como la interacción alga-bacteria, como potenciales factores bióticos reguladores de la respuesta bacteriana frente a UVR × P.

Material y métodos

La toma de muestras y su posterior análisis se expone en el capítulo 2, donde se detalla el procedimiento de medida de las distintas variables estructurales y funcionales que constituyen la base del presente capítulo: fósforo disuelto total (PDT), abundancia y biomasa de bacterias, partículas virales, nanoflagelados heterotróficos, ciliados y algas; producción bacteriana (PB), producción primaria (PP), excreción de carbono orgánico de origen fotosintético (EOC), requerimientos de carbono fotosintético por las bacterias (CARB), eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA) y eficiencia de uso de este carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb).

La biomasa del bucle microbiano heterotrófico se determinó mediante la suma de las biomásas ($\mu\text{g C L}^{-1}$) de virus, bacterias, nanoflagelados heterotróficos y ciliados. Se calculó la razón alga:bacteria en términos biomasa, así como la razón PP:PB.

La evaluación de los efectos individuales e interactivos $UVR \times P$ sobre las variables estructurales se llevó a cabo mediante análisis de regresión (lineal o cuadrática) y análisis de la covarianza. El efecto de enriquecimiento en P se evaluó para cada tratamiento de luz mediante análisis de regresión (lineal o cuadrática) entre el nivel de enriquecimiento y (i) los valores promedio de los días de cada periodo experimental (periodo DP: días 1, 3 y 11; periodo No-DP: días 20, 32, 42, 56, 70; justificación de ambos periodos en capítulo 4) de todas las variables estructurales del bucle microbiano heterotrófico, así como de la razón alga:bacteria; (ii) los valores de abundancias de virus y de ciliados y de biomasa total del bucle microbiano heterotrófico del día 11 del experimento, coincidiendo con el máximo desarrollo de los grupos depredadores de bacterias. Para examinar el efecto de UVR y el efecto interactivo $UVR \times P$ sobre estas variables se usó el análisis de la covarianza empleando el P como covariable. Cuando no se encontraron regresiones lineales significativas en ambos tratamientos de luz, el efecto de UVR se analizó mediante (i) comparaciones *t-test* para muestras dependientes cuando los valores representaban el promedio de un periodo, o (ii) mediante la observación del solapamiento de los intervalos de confianza al 95% cuando los valores representaban a un solo día de muestreo. La interacción entre la UVR y el P se analizó examinando gráficamente la modificación del efecto de la UVR a lo largo del gradiente de P.

La evaluación del efecto de la interacción $UVR \times P$ sobre PB se llevó a cabo mediante un análisis ANOVA de dos vías para cada uno de los seis días en que esta variable fue medida. Esta variable, junto con %PEA, %CUEb y razón PP:PB, se estudiaron mediante análisis ANOVA de dos vías para muestras repetidas en el tiempo para todos los días de cada periodo experimental (periodo DP: días 1, 3 y 11; periodo No-DP: días 20, 32, 42). El efecto de la radiación UV sobre estas variables funcionales en cada nivel de enriquecimiento de P se analizó mediante comparaciones *post hoc* (test de Bonferroni).

El balance entre el suministro de carbono fotosintético (EOC) y su demanda por las bacterias (CARB) se evaluó mediante comparaciones *t-test* para muestras dependientes entre ambas variables a lo largo del periodo experimental.

Para conocer la dependencia de las bacterias por los exudados algales, se analizó la relación entre EOC y PB, mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, en cada uno de los tratamientos experimentales a lo largo del periodo de estudio.

Como indicador de la limitación potencial por P de la comunidad biológica se calculó el tiempo de renovación del fósforo disuelto total (PDT), que mide cuándo la disponibilidad de P (PDT, tamaño del compartimento de P disuelto) llega a ser restringida en relación con las demandas máximas de P de algas y bacterias. Se calculó como:

$$\text{Tiempo de renovación del PDT (días}^{-1}\text{)} = \text{PDT} \times (\text{PRA} + \text{PRB})^{-1}$$

donde PRA y PRB son los requerimientos máximos de fósforo de algas y bacterias, respectivamente, calculados a partir de las respectivas producciones primaria y bacteriana integradas sobre una escala diaria y la razón molar C:P de los organismos en condiciones de crecimiento óptimo ($\text{C:P}_{\text{algas}} = 116$, Redfield 1958; $\text{C:P}_{\text{bacterias}} = 45$, Goldman et al. 1987, Fagerbakke et al. 1996).

Con objeto de comparar la capacidad de incorporación de P en algas y bacterias se calculó la tasa de incorporación de P por unidad de carbono (Pflux) en ambos niveles tróficos:

$$\text{Pflux} = (\text{P}_1 - \text{P}_0) \times \text{C}_0^{-1} \times \text{d}^{-1}$$

donde $\text{P}_1 - \text{P}_0$ es la diferencia de $\mu\text{g P L}^{-1}$ contenidos en la fracción biológica correspondiente entre dos momentos concretos; C_0 es la biomasa ($\mu\text{g C L}^{-1}$) de dicha fracción biológica; d es el tiempo (días) transcurrido entre los dos momentos.

Las relaciones entre PB vs. abundancia de virus, abundancia de ciliados y biomasa bacteriana, se analizaron en cada día del periodo experimental y en cada uno de los tratamientos de radiación solar mediante regresión lineal de los valores registrados en todos los niveles de enriquecimiento en nutrientes. Adicionalmente se

analizó la relación (modelo logarítmico) existente entre los valores promedio de PB correspondientes al periodo DP y la suma de las biomásas de virus y ciliados.

Las relaciones entre la abundancia de virus y de bacterias, así como de algas y bacterias en cada uno de los tratamientos experimentales a lo largo del periodo de estudio, se analizaron mediante regresión lineal por mínimos cuadrados. La presencia de respuestas desfasadas entre cada pareja de niveles tróficos se testaron usando análisis de correlaciones cruzadas. En los mesocosmos donde se observaron respuestas desfasadas, la relación entre las abundancias de cada pareja de niveles tróficos se obtuvo tras el desplazamiento en el tiempo de los valores de una variable respecto a la otra según el intervalo temporal que producía un mayor valor del coeficiente de correlación (R) entre las correlaciones cruzadas.

Resultados

Los resultados de este capítulo se presentan teniendo en cuenta la división por periodos establecida en el capítulo 4 (Fig. 4-3), distinguiendo entre un periodo de disponibilidad de P (periodo DP de aquí en adelante) y un periodo de no disponibilidad de P (periodo No-DP de aquí en adelante).

Efectos interactivos de UVR × P sobre la estructura del bucle microbiano

Durante el periodo DP, UVR incrementó significativamente (*t-test*, $p=0,0409$) la abundancia bacteriana desde $\sim 1,6 \times 10^6$ células ml^{-1} en el tratamiento $-UVR_{\text{control}}$ hasta $\sim 2,5 \times 10^6$ células ml^{-1} en el tratamiento $+UVR_{\text{control}}$ (Fig. 6-1). También la adición de P estimuló el crecimiento bacteriano en el tratamiento $+UVR$ sólo hasta niveles de enriquecimiento de $30 \mu\text{g P L}^{-1}$ ($\sim 3,3 \times 10^6$ células ml^{-1} en $+UVR_{30}$, Fig. 6-1), mientras que en el tratamiento $-UVR$ incrementó la abundancia bacteriana (en un 50%), significativa y linealmente a lo largo de todo el gradiente de enriquecimiento (Tabla 6-1). La adición de $P \geq 40 \mu\text{g P L}^{-1}$ suprimió el efecto

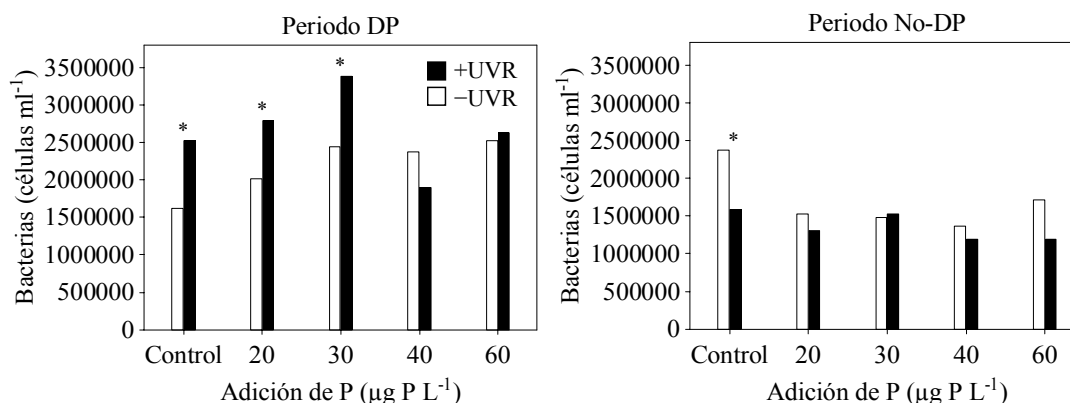


Figura 6-1. Valores promedio de la abundancia de bacterias, cuantificados bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes durante el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho). Significación de las comparaciones pareadas mediante el test *t* de Student entre los tratamientos de radiación solar para cada nivel de P: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

positivo de la UVR sobre la abundancia bacteriana (Fig. 6-1), por lo que la interacción $UVR \times P$ fue de naturaleza antagonica negativa. En el periodo No-DP, UVR disminuyó significativamente (*t-test*, $p = 0,0143$) la abundancia bacteriana desde $\sim 2,3 \times 10^6$ células ml^{-1} en el tratamiento $-UVR_{control}$ hasta $\sim 1,5 \times 10^6$ células ml^{-1} en el tratamiento $+UVR_{control}$. No hubo respuesta bacteriana a la adición de P durante este periodo (Tabla 6-1), aunque el efecto de UVR fue suprimido en condiciones enriquecidas en P, por lo que la interacción $UVR \times P$ fue de naturaleza antagonica (Fig. 6-1).

La abundancia de partículas virales no se vio afectada significativamente por UVR en condiciones no enriquecidas de nutrientes, siendo los valores promedio de 3×10^6 partículas ml^{-1} en ambos periodos experimentales (Fig. 6-2). La adición de nutrientes tuvo un efecto estimulador (no lineal) sobre la abundancia de partículas virales que se manifestó sólo el día 11 del experimento y sólo bajo +UVR, donde la abundancia de virus alcanzó valores de hasta $1,1 \times 10^7$ partículas ml^{-1} en los tratamientos 20 y 30 $\mu g P L^{-1}$ (Fig. 6-3). Sin embargo, en ausencia de UVR, la abundancia de partículas virales (valores promedio) estuvo relacionada lineal y negativamente con la adición de P (Tabla 6-1, tratamientos -UVR, periodo DP). En consecuencia, la adición de P favoreció que UVR ejerciera un efecto positivo puesto

Tabla 6-1. Resultados del análisis de regresión (lineal o cuadrática), en los dos tratamientos de radiación solar, entre el enriquecimiento en P y las siguientes variables: abundancia de virus, bacterias, ciliados, biomasa del bucle microbiano y razón alga:bacteria. *La abundancia de ciliados no corresponde al promedio del periodo DP, sino al día 11 del periodo experimental y el tratamiento 60 µg P L⁻¹ ha sido excluido de este análisis. **Los valores de la biomasa del bucle microbiano han sido previamente transformados a logaritmos. UVR = radiación ultravioleta (- ausencia, + presencia). Números en **negrita** indican relación significativa entre la adición de P y la variable dependiente.

Variable	LVR	Periodo DP			Periodo No-DP		
		Modelo	R ²	p	Modelo	R ²	p
Virus	-	y = -26276x + 3464038	0,85	0,025	y = -14314x + 3033853	0,81	0,038
	+	y = -6309x + 4670360	0,01	0,891	y = -15008x - 3050370	0,36	0,285
Bacterias	-	y = 15540x + 1722105	0,83	0,032	y = -10612x - 2012417	0,34	0,299
	+	y = -2972x + 2732806	0,02	0,844	y = -6530x + 1559222	0,60	0,125
Ciliados*	-	y = 0,45x - 0,74	0,93	0,036			
	+	y = 2,89x - 11,96	0,92	0,041			
Bucle microbiano**	-	y = -0,0004x² + 0,007x + 0,96	0,87	0,002	y = -0,0023x + 1,04	0,44	0,223
	+	y = -0,0021x² + 0,014x + 1,09	0,84	0,007	y = -0,0017x + 0,95	0,60	0,123
Razón alga:bacteria	-	y = -0,015x + 4,23	0,02	0,800	y = 3,63x + 10,92	0,97	0,002
	+	y = 0,046x + 1,28	0,86	0,022	y = 3,32x + 16,82	0,95	0,005

que, en los tratamientos enriquecidos con nutrientes, UVR incrementó la abundancia de partículas virales hasta en un 380% respecto a los valores observados en los tratamientos -UVR (Fig. 6-3). Este incremento fue significativo, como indica el no solapamiento de los intervalos de confianza entre los ajustes lineales para cada

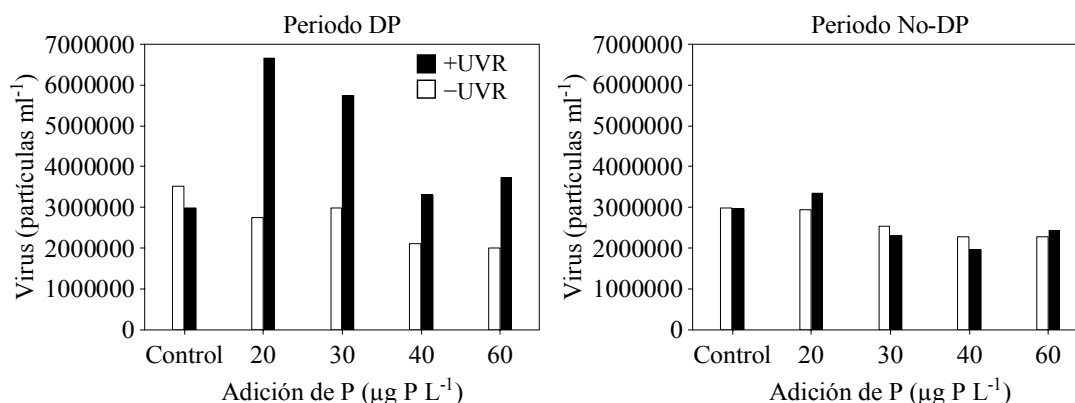


Figura 6-2. Valores promedio de la abundancia de partículas virales, cuantificados bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes durante el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho). Significación de las comparaciones pareadas mediante el test *t* de Student entre los tratamientos de radiación solar para cada nivel de P: **p*<0,05; ** *p*<0,01; ****p*<0,001.

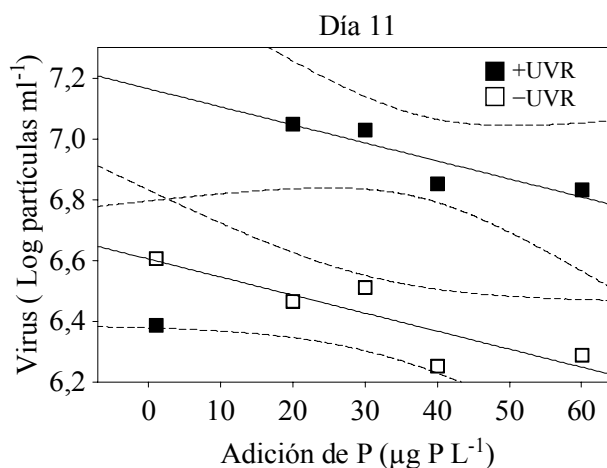


Figura 6-3. Valores transformados logarítmicamente de la abundancia de virus medidos el día 11 del periodo experimental, en los tratamientos con radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), a lo largo del gradiente de enriquecimiento de P. Las líneas continuas corresponden a las rectas de regresión entre la adición de P y la abundancia de ciliados, mientras que las líneas discontinuas denotan el 95% de los intervalos de confianza, permitiendo evaluar diferencias significativas entre los mesocosmos +UVR y -UVR. La recta de regresión +UVR está computada excluyendo el tratamiento sin adición de P.

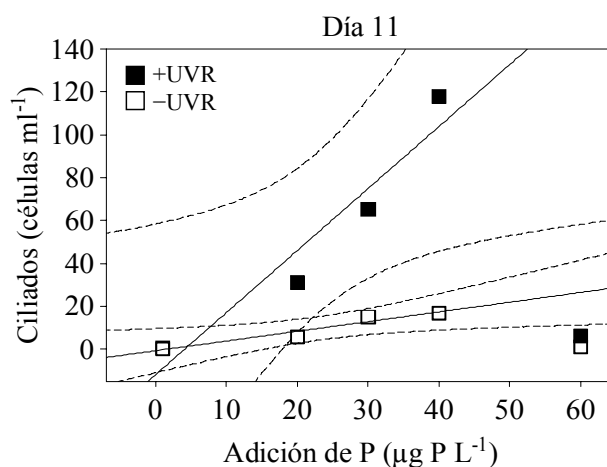


Figura 6-4. Valores de abundancia de ciliados medidos el día 11 del periodo experimental, en los tratamientos con radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), a lo largo del gradiente de enriquecimiento de P. Las líneas continuas corresponden a las rectas de regresión entre la adición de P y la abundancia de ciliados, mientras que las líneas discontinuas denotan el 95% de los intervalos de confianza, permitiendo evaluar diferencias significativas entre los mesocosmos +UVR y -UVR. Ambas rectas de regresión están computadas excluyendo el tratamiento $60 \mu\text{g P L}^{-1}$.

tratamiento de luz y considerando sólo los niveles enriquecidos. Por tanto, hubo un efecto interactivo de naturaleza sinérgica positiva. En el periodo No-DP la abundancia de virus fue poco variable ($\sim 2.6 \times 10^6 \pm 0.8 \times 10^6$ partículas ml^{-1}), aunque existió una tendencia decreciente a lo largo del gradiente de P, siendo solo significativa en ausencia de UVR (Fig. 6-2, Tabla 6-1, tratamientos -UVR, periodo No-DP).

No se desarrollaron nanoflagelados heterotróficos en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas. Sin embargo, los ciliados siguieron un patrón de respuesta básicamente similar al obtenido para las partículas virales. Así, UVR no afectó significativamente a la abundancia de ciliados en el periodo DP y la adición de P ejerció un efecto estimulador que se manifestó sólo el día 11 del experimento, particularmente en +UVR, aunque hubo una débil respuesta positiva en -UVR (Fig. 6-4). Al igual que los virus, la respuesta estimuladora de los ciliados al enriquecimiento en nutrientes en el tratamiento +UVR no fue lineal a lo largo de todo el gradiente de P; de hecho, la abundancia de ciliados incrementó sólo hasta el

tratamiento $40 \mu\text{g P L}^{-1}$ ($118 \text{ células ml}^{-1}$ en $+\text{UVR}_{40}$, Fig. 6-4). Interesantemente, el día 11 del experimento, coincidiendo con su máximo desarrollo, también se detectó un efecto interactivo UVR × P sinérgico positivo sobre la abundancia de ciliados. Este efecto se obtuvo al excluir el mayor nivel de enriquecimiento ($60 \mu\text{g P L}^{-1}$), de forma que la respuesta de los ciliados al gradiente de P fue lineal en cada tratamiento de luz (Tabla 6-1), lo que permitió testar el efecto interactivo UVR × P mediante análisis ANCOVA (test de homogeneidad de pendientes, Tabla 6-2, Fig. 6-4). Durante el periodo No-DP, la abundancia de ciliados fue inferior a $0,5 \text{ células ml}^{-1}$ en todos los tratamientos y no hubo respuestas apreciables a la luz ni al enriquecimiento con nutrientes.

Tabla 6-2. Resultados del análisis de homogeneidad de pendientes (ANCOVA) para los efectos de los tratamientos [enriquecimiento en P (P) y radiación ultravioleta (UVR)] y su interacción (UVR×P) sobre la abundancia de ciliados y la razón alga:bacteria. *La abundancia de ciliados corresponde al día 11 del periodo experimental y el tratamiento $60 \mu\text{g P L}^{-1}$ ha sido excluido de este análisis. **La razón alga:bacteria corresponde a valores promedio del periodo No-DP. Números en negrita indican efecto significativo sobre la variable respuesta. gl: grados de libertad. Efecto = + positivo, - negativo. % Var = porcentaje de varianza explicada calculado como suma de cuadrados del tratamiento/suma total de cuadrados.

Variable	Factor	gl	F	p	Efecto	% Var
Ciliados*	UVR	1	0,43	0,547		0,9
	P	1	29,57	0,006	+	63,4
	UVR×P	1	15,66	0,017	sinérgico +	33,6
	Error	6				2,1
Razón alga:bacteria**	UVR	1	0,08	0,785		0,05
	P	1	147,00	0,000	+	99,07
	UVR×P	1	0,29	0,607		0,20
	Error	6				0,67

Considerando en conjunto la biomasa del bucle microbiano heterotrófico, en el periodo DP, UVR ejerció un efecto estimulador sobre la misma (*t-test*, $p=0,0291$), incrementando los valores promedio desde $9,3 \mu\text{g C L}^{-1}$ en $-\text{UVR}_{\text{control}}$ hasta $12,7 \mu\text{g C L}^{-1}$ en $+\text{UVR}_{\text{control}}$ (Fig. 6-5). La adición de P generó una respuesta unimodal de la biomasa total del bucle microbiano en los dos tratamientos de luz (Fig. 6-5), ajustándose a una función cuadrática (Tabla 6-1), por lo que se alcanzaron máximos

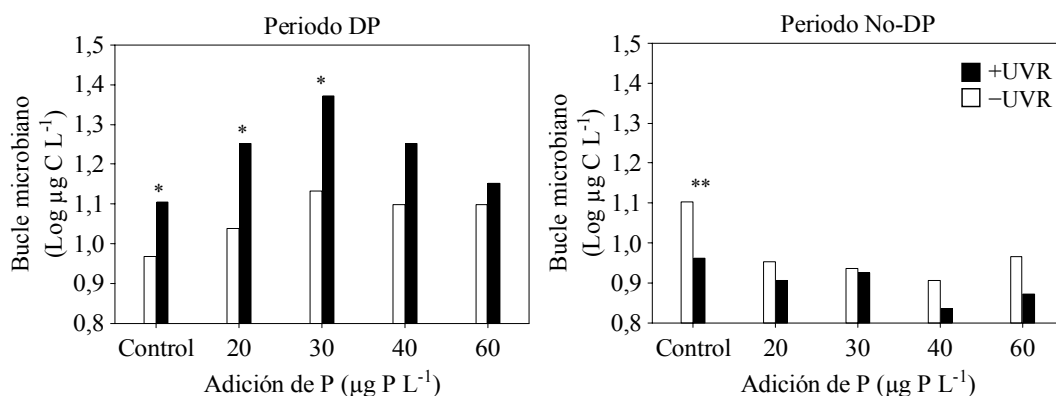


Figura 6-5. Valores promedio transformados logarítmicamente de la biomasa del bucle microbiano, medidos bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes durante el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho). Significación de las comparaciones pareadas mediante el test *t* de Student entre los tratamientos de radiación solar para cada nivel de P: **p*<0,05; ** *p*<0,01; ****p*<0,001.

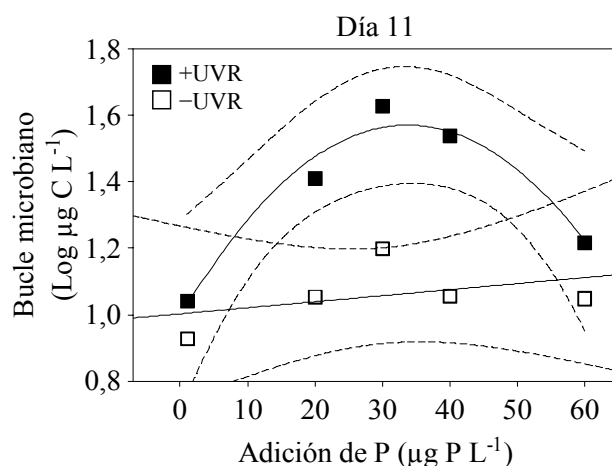


Figura 6-6. Valores transformados logarítmicamente de la biomasa del bucle microbiano, medidos el día 11 del periodo experimental en los tratamientos con radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), a lo largo del gradiente de enriquecimiento de P. Las líneas continuas corresponden a las regresiones (+UVR: cuadrática; -UVR: lineal) entre la adición de P y la biomasa del bucle microbiano, mientras que las líneas discontinuas denotan el 95% de los intervalos de confianza, permitiendo evaluar diferencias significativas entre los mesocosmos +UVR y -UVR.

de biomasa micro-heterótrofa en el nivel intermedio de enriquecimiento en P ($30 \mu\text{g P L}^{-1}$) con $23,5 \mu\text{g C L}^{-1}$ en +UVR₃₀ y $13,5 \mu\text{g C L}^{-1}$ en -UVR₃₀. Se observó un efecto interactivo UVR \times P de naturaleza sinérgica sobre el conjunto de la biomasa del bucle microbiano heterotrófico. Así el efecto positivo de la radiación UV se potenció hasta niveles de enriquecimiento de $30 \mu\text{g P L}^{-1}$ (*t-test*, $p=0,025$), aunque en los niveles más enriquecidos, el efecto estimulador de UVR no fue significativo (Fig. 6-5). Puesto que el efecto más significativo de los factores estudiados (UVR y adición de P) sobre los potenciales depredadores de bacterias tuvo lugar durante el día 11 del experimento, la figura 6-6 representa la respuesta del bucle microbiano durante dicho día, y permite evaluar el efecto interactivo UVR \times P mediante el grado de solapamiento de los intervalos de confianza del 95% de las regresiones entre la biomasa del bucle microbiano y la adición de P para cada tratamiento de luz a lo largo del gradiente de P (ver material y métodos). Esta figura revela que el efecto de UVR fue máximo en los niveles intermedios de adición de nutrientes, disminuyendo en los extremos del gradiente. Por el contrario, durante el periodo No-DP, el efecto de la radiación UV fue inhibitorio (*t-test*, $p=0,0085$), disminuyendo los valores promedio desde $12,6 \mu\text{g C L}^{-1}$ en -UVR_{control} hasta $9,1 \mu\text{g C L}^{-1}$ en +UVR_{control} (Fig. 6-5). La adición de P no afectó significativamente a la biomasa total del bucle microbiano (Fig. 6-5, Tabla 6-1), aunque suprimió el efecto inhibitorio de la UVR observado en los tratamientos sin adición de nutrientes (Fig. 6-5).

Efectos interactivos UVR \times P sobre la producción bacteriana

La radiación UV ejerció un efecto estimulador sobre la producción bacteriana (PB) en los diferentes días del periodo experimental analizados (excepto el día 20) y explicó entre un 6 y un 56,6% de su varianza con una tendencia creciente a lo largo del periodo experimental (Tabla 6-3). Sin embargo, la UVR ejerció un efecto inhibitorio significativo sobre la PB en los tratamientos sin adición de nutrientes en las primeras 24 horas del experimento (día 1), aunque sin ningún efecto posterior (análisis *post hoc* $p>0.05$). El enriquecimiento en P estimuló la PB durante la mayor parte del experimento (Tabla 6-3) generando valores de producción bacteriana más elevados durante el periodo DP (Fig. 6-7, Fig. 6-8 A, B, C) que en el No-DP (Fig. 6-

7, Fig. 6-8 D, E, F), aunque la magnitud del efecto varió dependiendo de la concentración del pulso y del tiempo del experimento. Así, niveles intermedios de enriquecimiento (20-40 $\mu\text{g P L}^{-1}$) generaron las máximas respuestas en PB, particularmente en el periodo DP (Fig. 6-8 A, B y C). Interesantemente, durante el día 11 la respuesta de PB a la adición de P fue particularmente acentuada, incrementando los valores en un orden de magnitud desde 0,019 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ en los encerramientos sin adición de nutrientes hasta 0,381 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ en +UVR₃₀ y aún más el día 3, cuando se observó un incremento de hasta 2,4 $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1}$ en el tratamiento +UVR₄₀ (Fig. 6-8 B). Este último incremento fue el único efecto significativo de UVR observado cuando fue considerado el conjunto del periodo DP (Fig. 6-7).

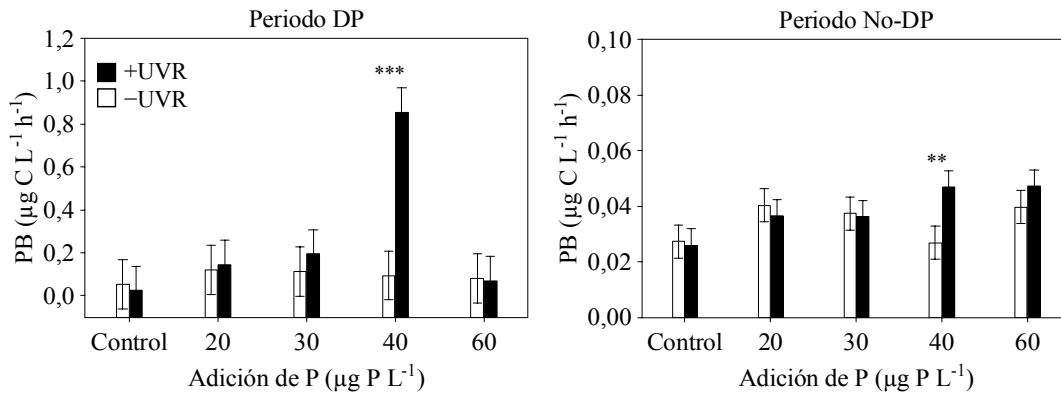


Figura 6-7. Producción bacteriana (PB) cuantificada bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes. Las barras indican los valores promedio para el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho). Las barras de error indican los intervalos de confianza al 95%. Significación de comparaciones *post hoc* entre los tratamientos de luz para cada nivel de P: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

UVR y P ejercieron un efecto interactivo sinérgico significativo sobre la producción bacteriana, a lo largo de todo el periodo experimental (Tabla 6-3, Tabla 6-4). Así los valores de PB fueron generalmente mayores en los tratamientos bajo UVR que estaban enriquecidos en niveles intermedios de nutrientes (20- 40 $\mu\text{g P L}^{-1}$) (Fig. 6-8). No obstante el día 1 del experimento el efecto interactivo UVR \times P fue antagónico, ya que la adición de P (tratamientos 20 y 30 $\mu\text{g P L}^{-1}$) invirtió el efecto

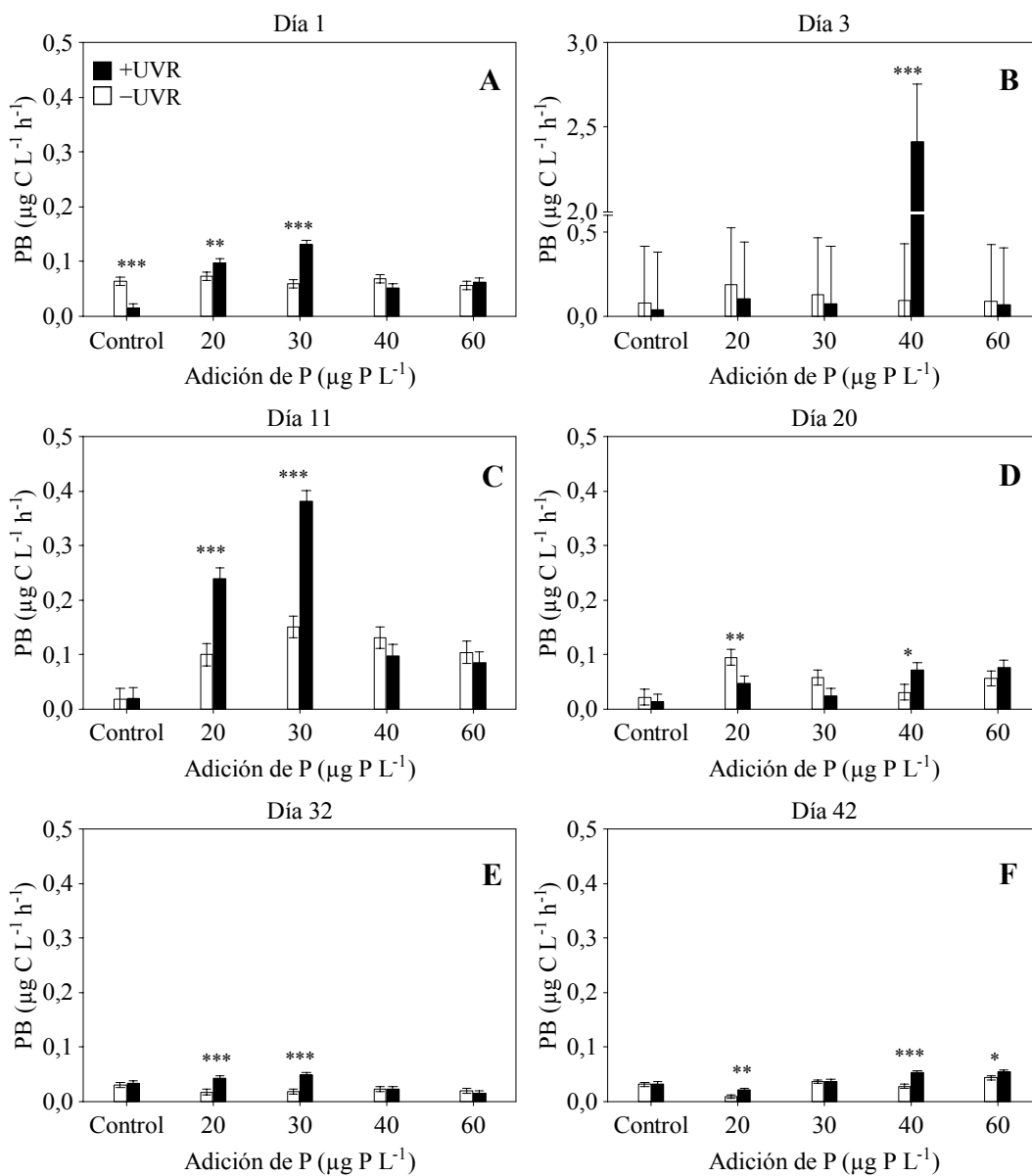


Figura 6-8. Producción bacteriana (PB) medida en los días 1, 3, 11, 20, 32 y 42 del periodo experimental bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación ultravioleta (-UVR) a lo largo del gradiente de enriquecimiento de P. Las barras indican los valores promedio de las tres réplicas de cada tratamiento. Las barras de error indican los intervalos de confianza al 95%. Significación de comparaciones *post hoc* entre los tratamientos de luz para cada nivel de P: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

negativo de UVR observado en los tratamientos no enriquecidos (Fig. 6-8 A). Considerando los valores promedio para cada periodo experimental, el efecto interactivo UVR \times P sobre la producción bacteriana fue significativo en ambos periodos (Tabla 6-4), en los que el efecto estimulador de UVR se observó sólo en los tratamientos +UVR₄₀ (Fig. 6-7).

Tabla 6-3. Resultados del análisis ANOVA de 2 vías para cada día de medida de la producción bacteriana sobre los efectos de la UVR, del enriquecimiento de P y de la interacción de ambos factores (UVR \times P) sobre la producción bacteriana. gl: grados de libertad. % Var: porcentaje de la varianza explicada calculada como suma de cuadrados del factor/suma total de cuadrados. Números en negrita indican efecto significativo del factor sobre la PB. Efecto: - negativo, + positivo.

Día	Factor	gl	F	p	Efecto	% Var
1	UVR	1	9,7	0,0054	+	6,0
	P	4	74,3	0,0000	+	45,5
	UVR \times P	4	78,1	0,0000	Antagónico	47,9
	Error	20				0,6
3	UVR	1	17,1	0,0005	+	28,6
	P	4	20,3	0,0000	+	34,1
	UVR \times P	4	21,3	0,0000	Sinérgico	35,6
	Error	20				1,7
11	UVR	1	110,2	0,0000	+	30,1
	P	4	182,9	0,0000	+	49,9
	UVR \times P	4	72,3	0,0000	Sinérgico	19,7
	Error	20				0,3
20	UVR	1	2,2	0,1509		5,8
	P	4	20,3	0,0000	+	52,8
	UVR \times P	4	15,0	0,0000		38,8
	Error	20				2,6
32	UVR	1	57,2	0,0000	+	56,6
	P	4	18,8	0,0000	-	18,6
	UVR \times P	4	24,2	0,0000	Sinérgico	23,9
	Error	20				1,0
42	UVR	1	83,9	0,0000	+	39,6
	P	4	110,4	0,0000	+	52,0
	UVR \times P	4	16,8	0,0000	Sinérgico	7,9
	Error	20				0,5

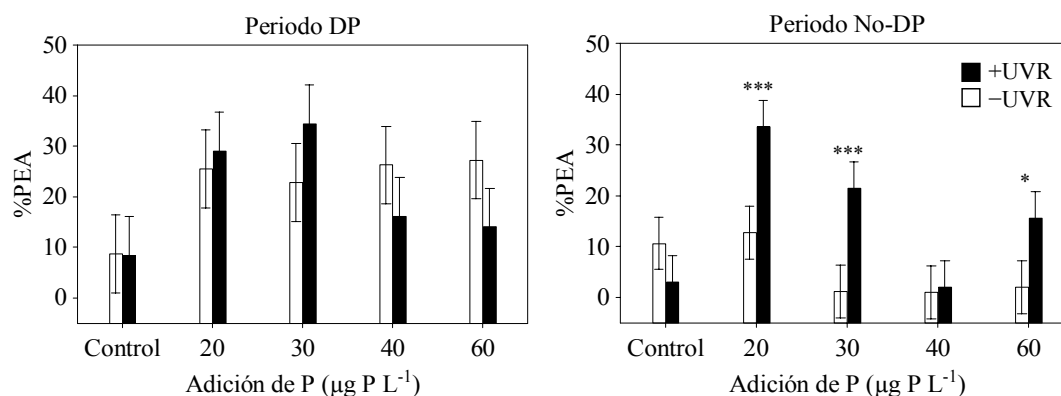


Figura 6-9. Porcentaje de exudados asimilados por las bacterias (%PEA), cuantificados bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes. Las barras indican los valores promedio para el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho). Las barras de error indican los intervalos de confianza al 95%. Significación de comparaciones *post hoc* entre los tratamientos de luz para cada nivel de P: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Efectos interactivos UVR × P sobre la interacción productor - bucle microbiano

El efecto de la radiación UV y la adición de nutrientes sobre la interacción entre los productores primarios y bacterias (componente clave del bucle microbiano) se analizó a través de la cuantificación de las siguientes variables: eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA), eficiencia de uso de este carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb), razones PP:PB y alga:bacteria y la tasa de incorporación de P por unidad de carbono (Pflux) en algas y bacterias.

La **eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA)** fue inferior al 40 % en los dos periodos experimentales (Fig. 6-9). En el período DP, UVR no ejerció ningún efecto significativo global sobre %PEA (Tabla 6-4), ni aún en condiciones no enriquecidas en P (Fig. 6-9), mientras que la adición de P estimuló %PEA (ej. desde 8,4 % en los tratamientos control, hasta el 34 % en el tratamiento +UVR₃₀, Tabla 6-4). UVR ejerció un efecto depresor sobre %PEA en los niveles más enriquecidos de P (≥ 40 $\mu\text{g PL}^{-1}$), por lo que se generó un efecto interactivo UVR × P de carácter sinérgico negativo (Tabla 6-4). En el período No-DP

se evidenció un efecto significativo positivo global de UVR (Tabla 6-4), si bien en condiciones no enriquecidas el efecto de UVR fue depresor. También el enriquecimiento con P ejerció un efecto estimulador global (Tabla 6-4). Dado que la adición de P invirtió el efecto negativo de UVR, se estableció un efecto interactivo UVR × P de carácter antagónico positivo durante este periodo No-DP (Tabla 6-4).

Tabla 6-4. Resultados del análisis ANOVA de 2 vías para muestras repetidas en el tiempo sobre los efectos de UVR, enriquecimiento de P y de la interacción de ambos factores (UVR × P) sobre la producción bacteriana (PB), la eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA), la eficiencia de uso de carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb) y sobre la razón Producción primaria:producción bacteriana (PP:PB). gl: grados de libertad. % Var: porcentaje de la varianza explicada calculada como suma de cuadrados del factor/suma total de cuadrados.

Variables	Factor	gl	Periodo DP				Periodo No-DP			
			F	p	Efecto	% Var	F	p	Efecto	% Var
PB	UVR	1	23,12	<0,001	+	36,6	5,61	<0,05	+	25,6
	P	4	20,15	<0,001	+	31,9	9,31	<0,001	+	42,5
	UVR×P	4	18,90	<0,001		29,9	5,98	<0,01		27,3
	Error	20				1,6				4,6
%PEA	UVR	1	0,5	n.s.		3,7	37,5	<0,001	+	52,1
	P	4	9,2	<0,001	+	63,5	20,9	<0,001		29,0
	UVR×P	4	3,8	<0,05		25,9	12,6	<0,001	sinérgico	17,5
	Error	20				6,9				1,4
%CUEb	UVR	1	5,9	<0,05	-	18,8	40,6	<0,001		7,4
	P	4	12,9	<0,001	+	40,9	449	<0,001		81,6
	UVR×P	4	11,7	<0,001		37,2	59,4	<0,001	antagónico	10,8
	Error	20				3,2				0,2
PP:PB	UVR	1	0,17	ns		1,1	23,38	<0,001	-	30,2
	P	4	4,81	<0,01	+	30,5	50,69	<0,001	+	65,6
	UVR×P	4	9,80	<0,001		62,1	2,24	ns	sinérgico	2,9
	Error	20				6,3				1,3

La eficiencia de uso de este carbono fotosintético por las bacterias (%CUEb) mostró valores siempre inferiores al 8% en los dos periodos experimentales, y generalmente fueron más elevados en el periodo PD. Su patrón de

respuesta frente a la radiación UV y el enriquecimiento en nutrientes fue distinto al de %PEA. Durante el periodo DP, UVR ejerció un efecto global inhibitor (Tabla 6-4), efecto también observado en condiciones no enriquecidas en P (pos-hoc, Fig. 6-10). Sin embargo, el enriquecimiento en P significativamente estimuló %CUEb (ej. desde 1,1 % en el tratamiento +UVR_{control} hasta un 6 % en el tratamiento +UVR₂₀; Tabla 6-4). El efecto depresor de UVR en condiciones no enriquecidas se invirtió en los niveles intermedios de enriquecimiento (30 y 40 $\mu\text{g PL}^{-1}$, Fig 6-10), por lo que se generó un efecto interactivo UVR × P antagónico positivo (Tabla 6-4). Durante el periodo No-DP, UVR ejerció un efecto global depresor de %CUEb (Tabla 6-4), efecto también observado en condiciones no enriquecidas (Fig. 6-10). El enriquecimiento de P también ejerció un efecto significativo depresor ($p < 0,001$, $F=214$) durante este periodo No-DP (ej. desde 1,7 % en el tratamiento -UVR_{control} hasta un 0,09 % en el tratamiento -UVR₄₀; Tabla 6-4), y el efecto negativo de UVR también se invirtió en los niveles intermedios de enriquecimiento (30 y 40 $\mu\text{g PL}^{-1}$, Fig 6-10), por lo que se generó un efecto interactivo UVR × P antagónico positivo en este periodo (Tabla 6-4).

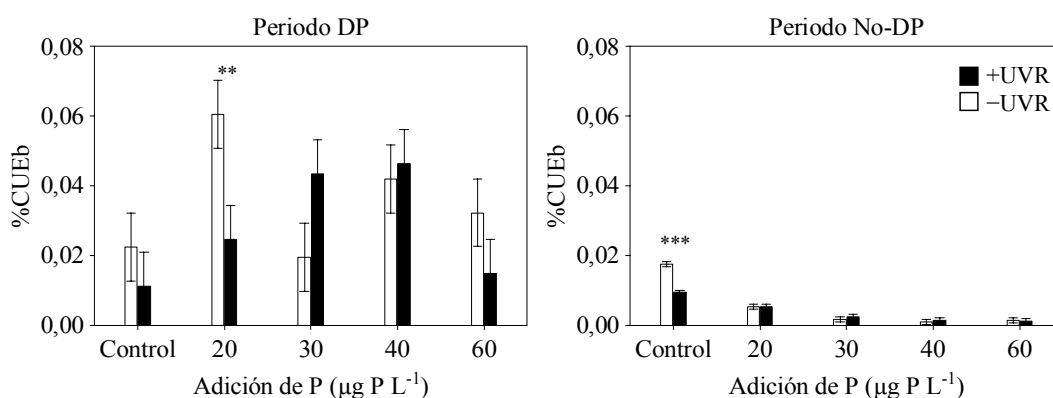


Figura 6-10. Porcentaje de carbono procedente de los exudados algales usado para la producción bacteriana (%CUEb), cuantificados bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes. Las barras indican los valores promedio para el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho). Las barras de error indican los intervalos de confianza al 95%. Significación de comparaciones *post hoc* entre los tratamientos de luz para cada nivel de P: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

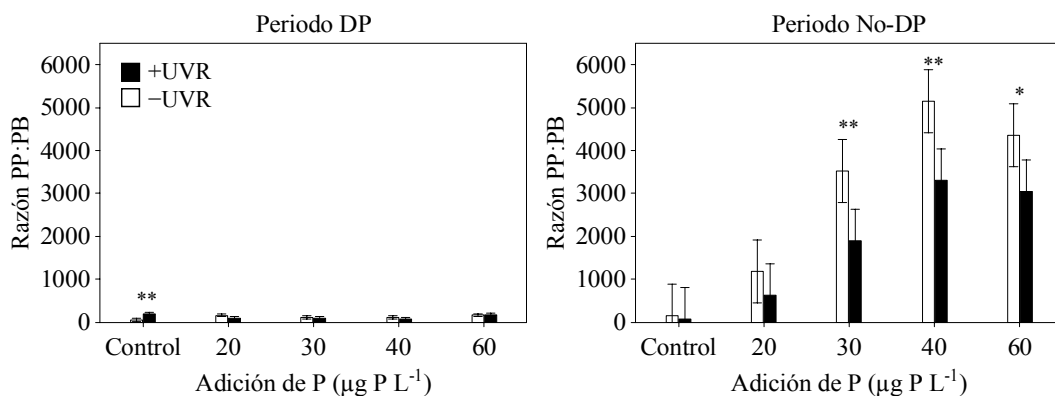


Figura 6-11. Razón producción primaria:producción bacteriana (PP:PB), cuantificada bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes. Las barras indican los valores promedio para el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho). Las barras de error indican los intervalos de confianza al 95%. Significación de comparaciones *post hoc* entre los tratamientos de luz para cada nivel de P: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La razón entre la producción primaria y la producción bacteriana (PP:PB) fue >50 en todos los tratamientos en ambos periodos experimentales, con valores entre uno y dos órdenes de magnitud superiores en el periodo No-DP respecto al periodo DP (Fig. 6-11). En el periodo DP, UVR incrementó la razón PP:PB en el tratamiento sin adición de P (Fig. 6-11, ver controles). El enriquecimiento en P incrementó débilmente dicha razón (Tabla 6-4) y suprimió el efecto estimulador de UVR observado en el tratamiento control, por lo que se encontró un efecto interactivo de naturaleza antagónica (Fig. 6-11, Tabla 6-4). Durante el periodo No-DP, UVR disminuyó globalmente la razón PP:PB (Tabla 6-4), aunque no ejerció en efecto significativo en condiciones no enriquecidas (Fig. 6-11, ver controles). La adición de P estimuló intensamente la razón PP:PB desde 76 y 140 en los tratamientos control hasta un máximo de 5100 en el tratamiento -UVR₄₀ (Fig. 6-11). El análisis ANOVA de dos vías de la combinación de UVR y enriquecimiento en P sobre la razón PP:PB no evidenció significativamente la existencia de efectos interactivos (Tabla 6-4). Sin embargo, el test *post-hoc* (test de Fisher LSD) mostró un efecto inhibitorio de UVR sobre la razón PP:PB en los tratamientos más enriquecidos en P (≥ 30 , Fig. 6-11). Así, en estos tratamientos, los valores encontrados en +UVR fueron entre el 54% y el 70% de los encontrados en -UVR, por lo que se puede

interpretar que hubo un efecto interactivo UVR \times P de carácter sinérgico negativo en este periodo.

La razón alga:bacteria fue siempre >1 , ya que la biomasa algal fue entre dos y tres órdenes de magnitud mayor que la biomasa bacteriana en todos los tratamientos durante ambos periodos experimentales. Durante el periodo DP, UVR disminuyó significativamente (t -test, $p < 0,05$) la razón alga:bacteria en condiciones no enriquecidas en P (desde 2,7 hasta 1,2, Fig. 6-12). La adición de P incrementó significativamente la razón alga:bacteria sólo en el tratamiento +UVR (Tabla 6-1) y suprimió el efecto inhibitorio de UVR observado en los controles, por lo que se observó una interacción antagonista entre los dos factores ensayados (Fig. 6-12). En el periodo No-DP, no se detectó ningún efecto significativo de UVR sobre la razón alga:bacteria. En los dos tratamientos de luz, la adición de P incrementó significativamente la razón alga:bacteria (Tabla 6-1) entre uno y dos órdenes de magnitud respecto a los tratamientos control, llegando en el tratamiento $60 \mu\text{g P L}^{-1}$ a una razón alga:bacteria de ~ 200 (Fig. 6-12). No se detectó ninguna interacción UVR \times P (Tabla 6-2).

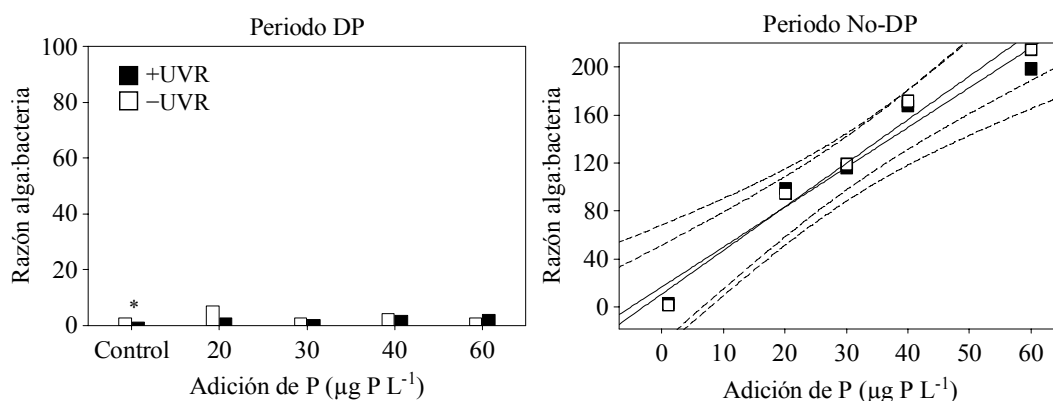


Figura 6-12. Razón alga:bacteria, cuantificada bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR) a lo largo del gradiente de enriquecimiento de P. Los valores representados son el promedio del periodo DP (gráfico izquierdo) y del periodo No-DP (gráfico derecho). Significación de las comparaciones pareadas mediante el test t de Student entre los tratamientos de radiación solar para cada nivel de P: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Las rectas de regresión están insertadas cuando las relaciones entre el gradiente de P y la variable respuesta fueron significativas ($p < 0,05$) en ambos tratamientos de luz. Los intervalos de confianza al 95% están representados por líneas discontinuas para evaluar diferencias significativas del efecto de UVR en cada nivel de enriquecimiento de P.

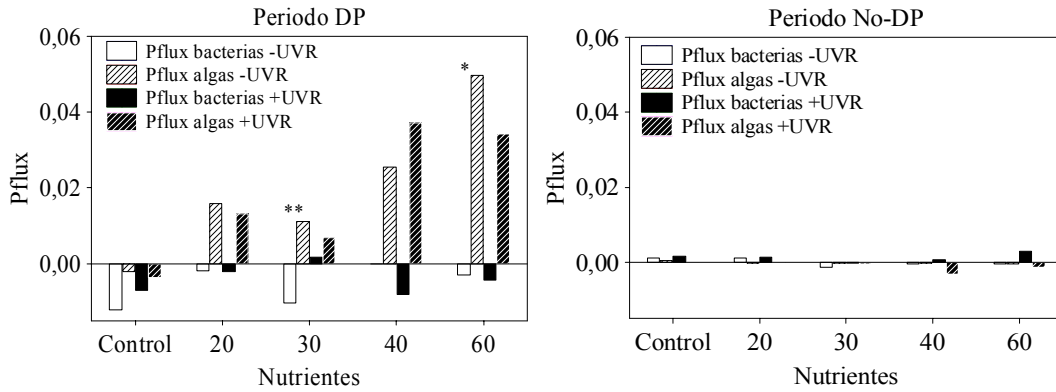
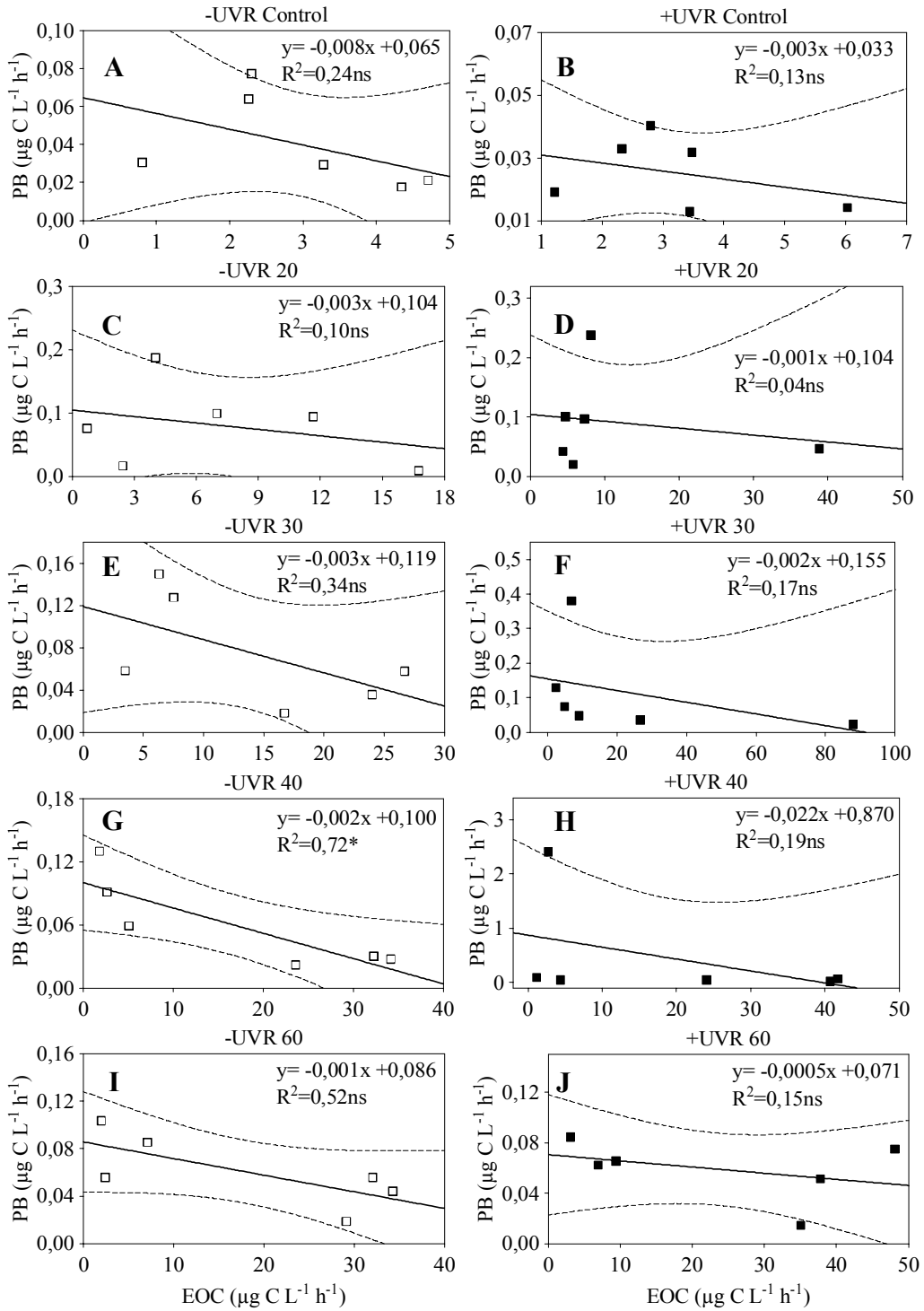


Figura 6-13. Tasas de incorporación de P por unidad de carbono (Pflux) en algas y bacterias, estimadas bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes. Las barras indican los valores promedio para el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho). Significación de las comparaciones pareadas mediante el test *t* de Student entre los valores obtenidos en algas y en bacterias en cada mesocosmos: **p*<0,05; ** *p*<0,01; ****p*<0,001.

Con objeto de evaluar la posible ventaja competitiva en la incorporación de P entre algas y bacterias se comparó la tasa de incorporación de P por unidad de carbono (Pflux) de ambos niveles tróficos. Pflux fue mayor en algas que en bacterias durante el periodo DP, aunque solo se detectaron diferencias significativas en los tratamientos -UVR₃₀ y -UVR₆₀ (Fig. 6-13). En los tratamientos enriquecidos con P, Pflux de bacterias fue generalmente negativo, mientras que Pflux de algas fue positivo, llegando hasta $0,05 \text{ h}^{-1} \mu\text{g C}^{-1}$ en -UVR₆₀ (Fig. 6-13).

Figura 6-14 (página siguiente). Regresiones entre la tasa de excreción de carbono orgánico de origen fotosintético (EOC) y producción bacteriana (PB) a lo largo de todo el periodo experimental. Cada gráfico corresponde a un mesocosmos. Están representados los tratamientos con radiación solar completa (+UVR; serie derecha) y con exclusión de radiación UV (-UVR; serie izquierda), así como los tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes (20, 30, 40 y 60 $\mu\text{g P L}^{-1}$). Las líneas continuas indican la rectas de regresión, mientras que las líneas discontinuas denotan los intervalos de confianza al 95%. La ecuación y el coeficiente de regresión están insertados en cada gráfico. Significación: ns: no significativo; **p*<0,05; ** *p*<0,01; ****p*<0,001.

6 Efecto UVR × P sobre la regulación del bucle microbiano



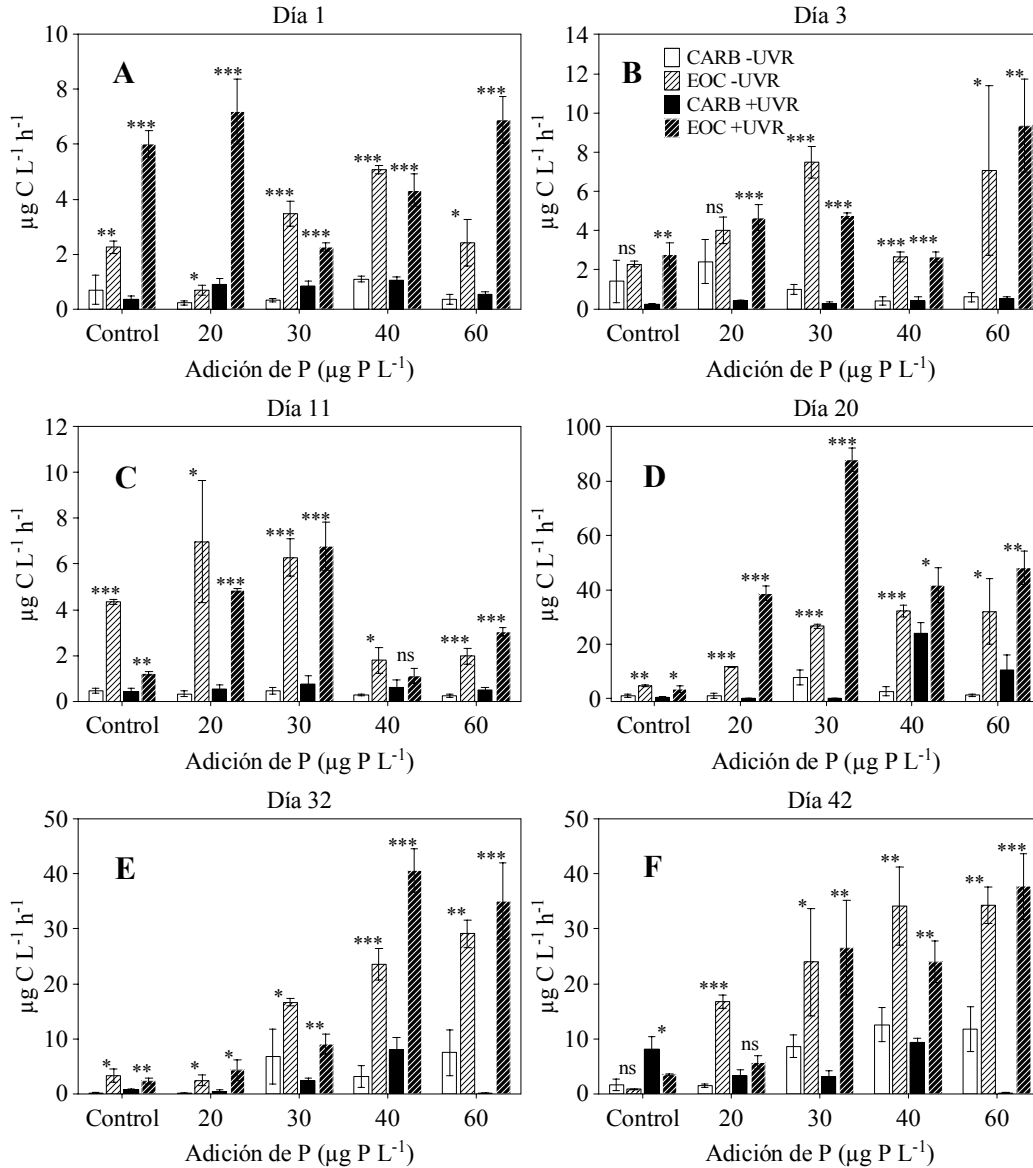


Figura 6-15. Comparación de los valores de los requerimientos de carbono fotosintético por las bacterias (CARB) y la excreción de carbono orgánico de origen fotosintético (EOC) cuantificados bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación ultravioleta (-UVR) en los tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes durante los días 1, 3, 11, 20, 32 y 42 del periodo experimental. Las barras indican la desviación estándar de la variable correspondiente. Significación de análisis *t* de Student entre los valores de CARB y de EOC de cada mesocosmos: ns: no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Factores de control de la producción bacteriana

Los factores considerados en este estudio como potenciales controladores de PB han sido, por un lado, la disponibilidad de recursos (energía y nutrientes), representados por la tasa de suministro de carbono lábil (excreción de carbono orgánico de origen fotosintético, EOC), y por el tiempo de renovación del P disuelto (como un índice de limitación por P), y por otro lado, los procesos de consumo por parte de potenciales depredadores: virus, ciliados.

La tasa de excreción de carbono orgánico de origen fotosintético (EOC) generalmente no explicó las variaciones de la producción bacteriana en los diferentes tratamientos experimentales, en los que se observó una tendencia negativa entre ambas variables. La relación entre EOC y PB fue significativa sólo en el tratamiento $-UVR_{40}$ (Fig. 6-14).

La tasa de excreción de carbono orgánico de origen fotosintético (EOC) generalmente estuvo en exceso en relación con los requerimientos de las bacterias para mantener su producción (CARB). En los días 3, 11 y 42, sólo en tratamientos concretos, los valores de EOC se equipararon con los de CARB, ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambas variables. Excepcionalmente, el

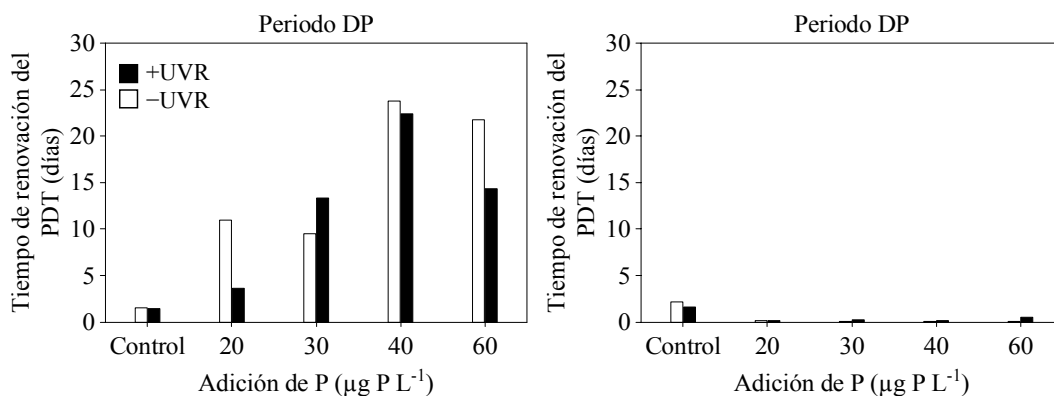


Figura 6-16. Valores promedio del tiempo estimado de renovación del fósforo disuelto total (PDT), cuantificados bajo radiación solar completa (+UVR) y con exclusión de radiación UV (-UVR), en los dos tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes. Las barras indican los valores promedio para el periodo DP (gráfico izquierdo) y el periodo No-DP (gráfico derecho).

día 42 en +UVR_{control} los requerimientos bacterianos de carbono fueron superiores al suministro (Fig. 6-15).

El tiempo de renovación del fósforo disuelto total, fue superior durante el periodo DP con valores promedio comprendidos entre 3,6 días en +UVR₂₀ y >20 días en el nivel de enriquecimiento de 40 µg P L⁻¹ (Fig. 6-16). En cambio, durante el periodo No-DP, el tiempo de renovación del PDT disminuyó hasta valores inferiores a 24 h (entre 0,05 días en -UVR₃₀ y 0,48 días en +UVR₆₀). Estos resultados indican que el grado de limitación por P para el potencial desarrollo de la comunidad bacteriana fue menor durante el período DP.

Tabla 6-5. Resultados del análisis de regresión lineal, en cada uno de los dos tratamientos de radiación solar, de los valores de producción bacteriana (PB) frente a las abundancias de virus y de ciliados y frente a la biomasa bacteriana de todos los niveles de enriquecimiento en nutrientes, en cada día del periodo experimental. UVR = radiación ultravioleta (- ausencia, + presencia). Los números en negrita indican una relación significativa.

Día	UVR	Virus (Partículas ml ⁻¹)		Ciliados (células ml ⁻¹)		Bacterias (µg C L ⁻¹)	
		R ²	p	R ²	p	R ²	p
1	-	0,48	0,196	0,67	0,088	0,00	0,955
	+	0,11	0,590	0,13	0,549	0,00	0,934
3	-	0,04	0,738	0,16	0,507	0,33	0,314
	+	0,45	0,218	0,42	0,234	0,50	0,179
11	-	0,36	0,282	0,62	0,115	0,50	0,183
	+	0,75	0,057	0,06	0,681	0,95	0,005
20	-	0,03	0,775	-	-	0,66	0,094
	+	0,60	0,123	0,09	0,615	0,01	0,904
32	-	0,01	0,855	0,22	0,427	0,36	0,288
	+	0,13	0,555	0,00	0,980	0,23	0,417
42	-	0,32	0,320	0,61	0,118	0,01	0,887
	+	0,62	0,114	0,34	0,301	0,01	0,858

En relación con el control por potenciales depredadores bacterívoros, no se encontraron relaciones significativas entre la producción bacteriana y la abundancia de virus ni de ciliados en ningún día del periodo experimental en ambos tratamientos de luz (Tabla 6-5). En cambio, el promedio de la PB medida durante el periodo DP

explicó según un modelo logarítmico la biomasa conjunta de virus y ciliados registrada el día 11 del experimento (Fig. 6-17). De forma similar, la PB no explicó la biomasa bacteriana, excepto el día 11 del experimento según un modelo lineal (Tabla 6-5).

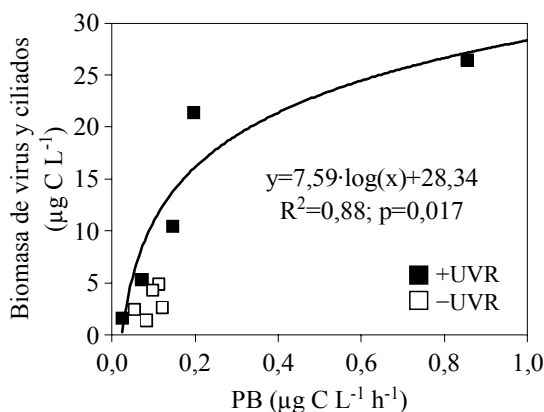
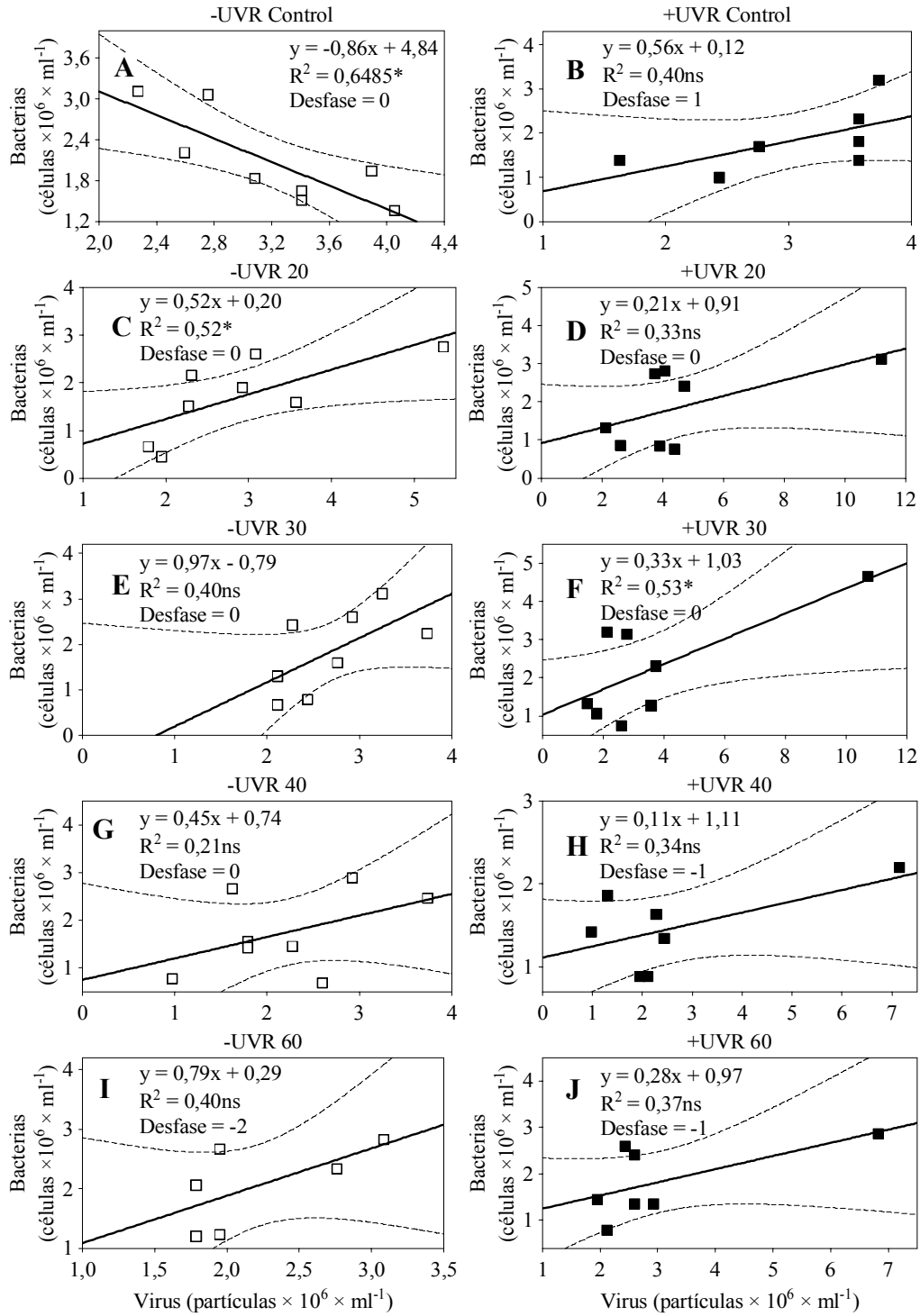


Figura 6-17. Valores promedio, de cada nivel de enriquecimiento en P, de la producción bacteriana (PB) durante el periodo DP (días 1, 3 y 11) frente a la suma de la biomasa de virus y ciliados (en términos de carbono) encontrada el día 11 del experimento. Para cada tratamiento de radiación solar (+UVR radiación solar completa; -UVR exclusión de radiación UV) se presenta el ajuste de la regresión logarítmica cuando ésta fue significativa.

Respecto a las potenciales relaciones entre variables estructurales, no se estableció relación alguna entre la abundancia de bacterias y ciliados en ninguno de los tratamientos (datos no mostrados). Sin embargo, se establecieron relaciones positivas entre abundancias de virus y de bacterias en la mayoría de tratamientos experimentales, aunque fueron significativas sólo en los tratamientos $-UVR_{20}$ y $+UVR_{30}$. No obstante, esta relación fue significativamente negativa en el tratamiento $-UVR_{control}$ (Fig. 6-18). Por el contrario, la biomasa de bacterias se relacionó negativamente con la de algas en la mayoría de los tratamientos, siendo significativas en $-UVR_{20}$, $-UVR_{60}$, $+UVR_{20}$ y $+UVR_{40}$, mientras que la relación fue positiva solo en el tratamiento $-UVR_{control}$ (Fig. 6-19).

Figura 6-18 (página siguiente). Correlaciones entre los valores de la abundancia de virus y de bacterias a lo largo de todo el periodo experimental. Cada gráfico corresponde a un mesocosmos. Están representados los tratamientos con radiación solar completa (+UVR; serie derecha) y con exclusión de radiación UV (-UVR; serie izquierda), así como los tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes (20, 30, 40 y 60 $\mu\text{g P L}^{-1}$). La línea indica la recta de la correlación. La ecuación y el coeficiente de correlación están insertados en cada gráfico. La correlación incluye un desfase temporal de acuerdo con los resultados de un análisis previo de cros-correlación. Significación: ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



6 Efecto UVR × P sobre la regulación del bucle microbiano

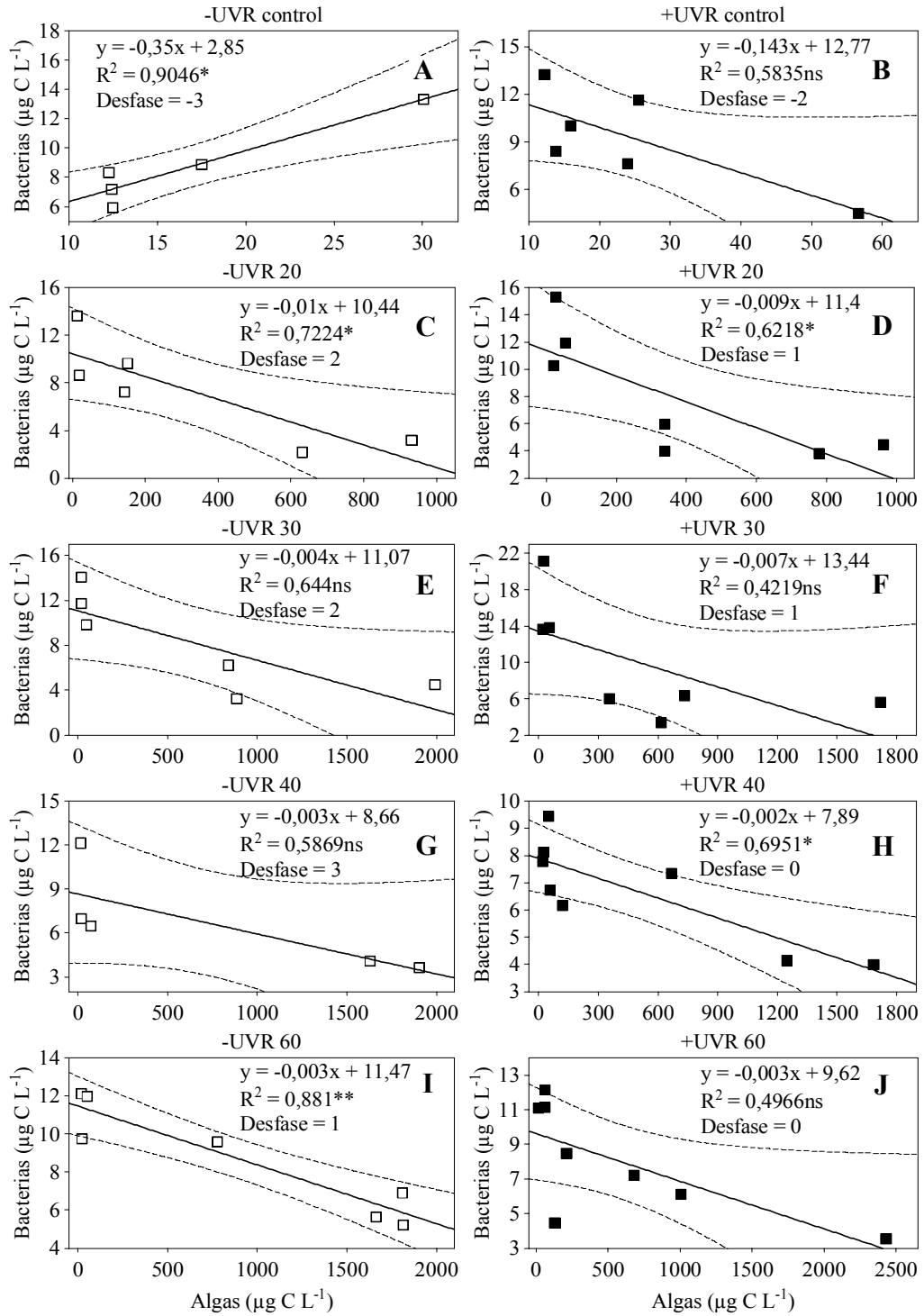


Figura 6-19 (página anterior). Correlaciones entre los valores de la biomasa de algas y de bacterias a lo largo de todo el periodo experimental. Cada gráfico corresponde a un mesocosmos. Están representados los tratamientos con radiación solar completa (+UVR; serie derecha) y con exclusión de radiación UV (-UVR; serie izquierda), así como los tratamientos sin adición (Control) y con adición de nutrientes (20, 30, 40 y 60 $\mu\text{g P L}^{-1}$). Las líneas continuas indican la rectas de regresión, mientras que las líneas discontinuas denotan los intervalos de confianza al 95%. La ecuación y el coeficiente de correlación están insertados en cada gráfico. La correlación incluye un desfase temporal de acuerdo con los resultados de un análisis previo de crosacorrelación. Significación: ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Discusión

Respuesta del bucle microbiano al efecto interactivo UVR \times P

El principal resultado de este capítulo, de acuerdo con nuestra hipótesis inicial, es que UVR y enriquecimiento en P actuaron sinérgicamente estimulando la biomasa del bucle microbiano heterotrófico. Este efecto tuvo lugar sobre una escala temporal media desapareciendo a largo plazo tras el agotamiento de las entradas de nutrientes (Figs. 6-5 y 6-6). Sorprendentemente, este efecto interactivo sinérgico no se observa al analizar los efectos interactivos sobre la estructura de la comunidad bacteriana a pesar de constituir el eslabón trófico basal y representar la mayor proporción de C del bucle microbiano heterotrófico. Sin embargo, sí se encontró un efecto interactivo UVR \times P de naturaleza sinérgica sobre la producción bacteriana (Figs. 6-7 y 6-8). Esta respuesta podría estar relacionada con la convergencia de (i) fenómenos de tolerancia a UVR, (ii) incrementos en la disponibilidad de C orgánico mediados por UVR y (iii) ausencia de limitación por P inorgánico

La tolerancia de las bacterias a UVR puede estar basada en mecanismos de reparación del daño celular. Particularmente, los mecanismos de fotorreparación, favorecidos por la radiación UVA, contrarrestan los daños celulares ejercidos por la radiación UVB sobre el ADN (Mitchell y Karentz 1993, Vincent y Roy 1993). El bajo coste energético de estos mecanismos (Weinbauer et al. 1997) los hace particularmente eficientes en ecosistemas que usualmente reciben altos flujos de UVR y están fuertemente limitados en nutrientes (Davidson y van der Heijden 2000).

Así, el incremento de la producción bajo UVR indica una alta tolerancia de las bacterias a este factor de estrés, consistentemente con resultados obtenidos en estudios anteriores (Carrillo et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2002, 2006).

Adicionalmente, el estímulo de la PB bajo UVR pudo estar generado por la alta disponibilidad de carbono orgánico relacionado con procesos de liberación de carbono fresco de origen algal que fue suficiente para satisfacer los requerimientos bacterianos (Fig. 6-15). Esta idea es soportada por la alta dependencia bacteriana del carbono algal en este ecosistema (Medina-Sánchez et al. 2002). No obstante, los procesos de fotodegradación, que pueden hacer más lábil al C refractario, así como liberar los nutrientes contenidos en estas moléculas complejas, no deberían ser desconsiderados (Wetzel et al. 1995, Obernosterer et al. 1999, Reche et al. 1998).

Finalmente, el efecto estimulador del P sobre PB, consistente con resultados previos (Villar-Argaiz et al. 2002), junto con el estímulo bajo UVR, determinó un efecto interactivo UVR × P no aditivo (sinérgico positivo) sobre esta variable durante el periodo DP. Interesantemente, este efecto interactivo fue máximo en niveles de enriquecimiento intermedios y desapareció tras un pulso de 60 µg P L⁻¹. Esta respuesta es similar a lo observado en recientes estudios sobre un amplio grupo de organismos como peces (Vielma et al. 2002), crustáceos (Plath y Boersma 2001), moluscos (Elser et al. 2005) o insectos (Brooks et al. 2001, Frost y Elser 2002, Perkins et al. 2004), cuyo crecimiento disminuye a altas concentraciones de P en el alimento, aunque no tenemos constancia de estudios que evidencien este tipo de respuestas sobre las bacterias. Boersma y Elser (2006) proponen que estas respuestas en organismos eucariotas son el resultado de un incremento de los costes metabólicos que se deriva de un contenido desbalanceado de nutrientes, incluso cuando se produce en la dirección de un exceso de nutrientes usualmente limitantes. Sin embargo, sería necesario profundizar en el estudio sobre esta llamativa respuesta en organismos procariontas.

Sorprendentemente, el efecto interactivo sinérgico UVR × P observado sobre la PB no se transfirió a la abundancia bacteriana, aunque sí se transmitió como sendos efectos sinérgicos positivos UVR × P sobre las abundancias de ciliados y de virus, sus depredadores en este ecosistema, ya que los nanoflagelados heterotróficos

(HNF) no se desarrollaron durante el experimento, de acuerdo con su escasa representación interanual en este ecosistema (Medina-Sánchez et al. 2004, ver capítulo 3). Más aún, la falta de relación observada entre producción y biomasa bacterianas (Tabla 6-5) sugiere una regulación de la PB por depredación (Billen et al. 1990).

A pesar de la similitud de la respuesta interactiva de PB, virus y ciliados, no existió relación entre la producción bacteriana y cada uno de los depredadores (Tabla 6-5), lo cual puede deberse a los desfases temporales en las respuestas relacionados con los diferentes tiempos de generación de los tres niveles tróficos (Foissner 2008, Patten et al. 2008). Por tanto, cuando fueron considerados los valores promedio de PB durante el periodo DP y la suma de las biomásas de virus y ciliados del día 11 del experimento (coincidiendo con el máximo desarrollo de ambos depredadores), se obtuvo una relación positiva entre ambas variables (Fig. 6-17). Este resultado concuerda con estudios que evidencian que fenómenos similares de rápida aparición de ciliados se corresponden con periodos de una producción bacteriana aumentada (Tadonlélé et al. 2005). Además, distintos estudios evidencian que, en ecosistemas estresados, la bacterivoría es el principal factor que impide el aumento de abundancia bacteriana tras un estímulo de PB bajo UVR (Gustavson et al. 2000) o tras pulsos de nutrientes (Hall y Safi 2001, Duarte et al. 2005, Medina-Sánchez et al. 2006). A raíz de esta información, podríamos afirmar que la bacterivoría fue la responsable de la falta de relación entre producción y biomasa bacterianas, así como de la falta de transmisión del efecto interactivo $UVR \times P$ entre ambas variables.

El consistente efecto positivo de la interacción $UVR \times P$ sobre virus y ciliados, evidencia un efecto estimulador de ambos factores sobre los dos niveles tróficos. Mientras que existe un amplio consenso en los efectos estimuladores de los nutrientes sobre ciliados (Carrillo et al. 2008b, Roberts et al. 2004) y, en ocasiones, sobre virus (Säwström et al. 2007), hay una fuerte controversia sobre el efecto de UVR sobre ambos niveles tróficos. Así, la respuesta positiva que encontramos de los ciliados concuerda con lo observado en lagos de alta montaña (Sommaruga et al. 1999, Modenutti et al. 2005), aunque contrasta con los efectos negativos de UVR encontrados en otros estudios (Häder et al. 1991, Mostajir et al. 1999), lo que indica

que la respuesta de la comunidad de ciliados a este factor puede variar dependiendo de las especies que la componen en cada ecosistema (Wickham y Carstens 1998). En cambio, pocos estudios han encontrado efectos positivos de UVR sobre la abundancia viral (e.g., mediante la activación del ciclo lítico, Maranger et al. 2002), y la mayor parte de los estudios evidencian un efecto negativo neto de UVR sobre las partículas virales (Suttle y Chen 1992, Murray y Jackson 1993, Jeffrey et al. 2000, Wilhelm et al. 2003) incluso en lagos de alta montaña (Sommaruga 2001).

Efecto interactivo UVR \times P sobre la interacción productor-bucle microbiano

Las algas dominaron a nivel funcional y estructural en todas las condiciones experimentales ensayadas, como se desprende de los altos valores de la razón PP:PB (>50) y alga:bacteria (>1). El predominio de la fracción autotrófica parece estar determinado por su mayor capacidad para incorporar P tras un pulso, lo que generó sobre una escala temporal larga una relación directa entre la concentración de P añadido y las razones PP:PB y alga:bacteria. Resultados similares se han obtenido en estudios realizados en este lago con enriquecimientos experimentales de fósforo (Villar-Argaiz et al. 2001, Carrillo et al. 2008b) o tras episodios de entrada natural de polvo sahariano rico en P (Carrillo et al. 1990, Morales-Baquero et al. 2006). La ventaja competitiva de las algas sobre las bacterias para incorporar e inmovilizar P en diferentes condiciones de luz (Fig. 6-13 y 6-16) puede deberse a su mayor capacidad de almacenamiento que las bacterias (Bergeron y Vincent 1997), sobre todo ante altas concentraciones de nutrientes inorgánicos (Tarapchak y Moll 1990), o cuando las entradas de P son pulsadas (Cotner y Wetzel 1992, Villar-Argaiz 1999, 2002, Duarte et al. 2000). Más aún, la relación negativa que generalmente se estableció entre algas y bacterias en las distintas condiciones experimentales soporta que la interacción entre ambos niveles tróficos sea predominantemente de naturaleza competitiva. Carrillo et al. (2008b) proponen que la razón N:P bacteriana es un predictor del tipo de relación que se establece entre ambos niveles tróficos. De acuerdo con su modelo, valores desequilibrados en la razón N:P bacteriana (>20-24) generan una interacción competitiva. De hecho, los valores de la razón N:P bacteriana fueron superiores a 30 a lo largo de todo el periodo experimental.

Interesantemente existió una alta disponibilidad de carbono algal, entre uno y dos órdenes de magnitud superior a lo cuantificado en otros estudios (Carrillo et al. 2002), por lo que hubo carbono suficiente para satisfacer los requerimientos bacterianos sin que este llegara a ser limitante. De ahí se desprende que la comunidad bacteriana no estuvo controlada por una interacción comensalista, que es la predominante en este ecosistema (Carrillo et al. 2002, Medina-Sánchez et al. 2002, 2006). Soportando esta interpretación obtuvimos (i) ausencia de relación directa entre la tasa de excreción de carbono orgánico algal y la producción bacteriana (Fig. 6-14); (ii) desacople entre los patrones de respuesta a UVR y P de la producción bacteriana, la eficiencia de asimilación del carbono fotosintético por las bacterias (%PEA, Fig. 6-9) y de la eficiencia de uso del C algal por las bacterias (%CUEb, Fig. 6-10), lo que evidencia que parte del flujo de C procedente de las algas no es utilizado por el bucle microbiano.

Con objeto de extrapolar los resultados experimentales a las condiciones del lago, analizamos los controles bióticos en los tratamientos sin adición de nutrientes. Es interesante destacar que independientemente de la calidad de la radiación solar encontramos una alta razón PP:PB, resultados que concuerdan con los obtenidos en ecosistemas oligotróficos con altos flujos de UVR como el océano Antártico (Ducklow et al. 2001, Agustí et al. 2004, Agustí y Duarte 2005) y lagos de alta montaña (Carrillo et al. 2002). Asimismo, los resultados de la alta razón alga:bacteria están de acuerdo con los obtenidos en el océano Antártico (Anadon y Estrada 2002, Duarte et al. 2005), lagos boreales (Elser et al. 2003) y de alta montaña (Callieri et al. 1999, Medina-Sánchez et al. 2004, este estudio). Estos resultados indican que el predominio de la comunidad algal no está directamente determinado por UVR.

La mayor contribución relativa de las algas en nuestros encerramientos sin adición de nutrientes pudo ser consecuencia del conjunto de interacciones bióticas que restringen el desarrollo de la comunidad bacteriana. Así, cuando se excluyó la radiación UV, el control por lisis viral, evidenciado por la relación inversa observada entre la abundancia de bacterias y de virus (Fig. 6-18 A), pudo contrarrestar la relación positiva de la comunidad bacteriana vs. comunidad algal (Fig. 6-19 A). No

obstante, las bacterias no estuvieron controladas por comensalismo, dada la ausencia de relación directa entre la excreción de carbono algal y PB (Fig. 6-14 A). Por el contrario, bajo UVR, la relación positiva entre las abundancias viral y bacteriana (Fig. 6-18 B), idéntica tendencia a la obtenida en condiciones naturales (ver capítulo 3, Fig. 3-), sugiere la ausencia de un control de las bacterias por lisis viral. Sin embargo, en este encerramiento se detectó una relación negativa entre algas y bacterias (Fig. 6-19 B), similar a la encontrada en los tratamientos enriquecidos (Fig. 6-19 desde C hasta J) y que nosotros interpretamos como un control de las bacterias por competencia (ver arriba).

En resumen, el escaso desarrollo de la comunidad bacteriana en este ecosistema puede deberse a restricciones bióticas, bien como consecuencia del control por competencia por los nutrientes limitantes ejercido por algas, o bien a la existencia de controles por depredación por parte de otros niveles tróficos bacterívoros. En relación a este último, nuestros resultados evidencian un control por lisis viral potencialmente más importante en condiciones de oligotrofia, mientras que la depredación ejercida por ciliados potencialmente cobra más importancia con el aumento de disponibilidad de nutrientes, coincidiendo con los resultados obtenidos en estudios realizados a lo largo de gradientes tróficos (Pedrós-Alió et al. 2000).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que el efecto de estos controles biológicos podría ser más intenso en los ecosistemas oligotróficos de aguas claras, expuestos a altos niveles de UVR, que en el resto de ecosistemas oligotróficos en los que se ha observado la tendencia general del predominio bacteriano en la biomasa nanoplanctónica (Cho y Azam 1988, Ducklow y Carlson 1992, Legendre y Rassoulzadegan 1995, Gasol et al. 1997, Cotner 2000, Biddanda et al. 2001).

Conclusión

Nuestros resultados muestran que el incremento de flujos de factores de cambio global como la radiación UV y las entradas de P atmosférico de origen sahariano ejerce sinérgicamente un efecto estimulador sobre la comunidad bacteriana

heterotrófica de ecosistemas oligotróficos. Sin embargo, debido a que este efecto estimulador se traslada hacia otros niveles tróficos consumidores de bacterias, propios del bucle microbiano heterotrófico, tiene un débil reflejo en la propia estructura de la comunidad bacteriana. Estos efectos positivos tienen lugar sobre una escala temporal corta y desaparecen inmediatamente tras el consumo del pulso de P.

Además de estar sometidas a un fuerte control por depredación, la comunidad bacteriana es menos competitiva que la comunidad algal. Por estos motivos, la biomasa nanoplanctónica del lago de La Caldera está dominada por algas, cuya posición de dominancia aumenta con las entradas de nutrientes.

Por último, las algas están controladas fundamentalmente por factores abióticos, en este caso por entradas de P y por presencia de UVR, mientras que la comunidad bacteriana está controlada principalmente por factores bióticos, entre los que destaca la depredación por virus y ciliados.

Síntesis

Sierra Nevada amplía el horario de esquí para el puente del 1 de Mayo

La nevada más significativa se produjo la tarde noche del domingo y vino a paliar los efectos de una nube africana que el sábado ensució la nieve de Sierra Nevada. Sin embargo, la borrasca de ayer no solo 'blanqueó' nuevamente toda la montaña sino que consolidó la superficie esquiable de la estación invernal.

Publicado en Granada Digital el 28/4/2009

En este capítulo se integran los resultados más relevantes en relación con los efectos ejercidos por UVR y P sobre la red trófica microbiana, que han sido predominantemente interactivos (no aditivos). Con objeto de clarificar la terminología sobre la naturaleza de los efectos interactivos obtenidos, seguida en esta Tesis Doctoral en relación con la usualmente empleada en la literatura científica, hemos denominado sinérgico al efecto interactivo $UVR \times P$ que resulta cuando la adición de P incrementa o desenmascara un efecto de UVR, con independencia de si el efecto potenciado de UVR resulta positivo o negativo sobre la variable respuesta considerada. De forma similar, hemos interpretado como antagónico al efecto interactivo $UVR \times P$ cuando existe una atenuación del efecto (positivo o negativo) de UVR frente a los pulsos de P ensayados. Justificamos nuestra interpretación basándonos en dos aspectos fundamentales:

1.- UVR tiene un efecto generalizado perjudicial sobre los organismos, particularmente en ecosistemas de aguas claras, como los lagos de alta montaña.

2.- El incremento en fósforo tiene un efecto estimulador generalizado sobre las comunidades en ecosistemas oligotróficos.

De ahí, el efecto interactivo $UVR \times P$ ha sido discutido como la modificación del efecto dañino de UVR por la adición de P.

Es importante destacar que con esta interpretación nos alejamos de la propuesta clásica que se desarrolla a partir del modelo de efectos aditivos, en el que el antagonismo y el sinergismo se definen como un efecto de la combinación de factores menor o mayor, respectivamente, que la suma de los efectos de los factores individuales por separado (Folt et al. 1999, Christensen et al. 2006, Crain et al. 2008). Así por ejemplo, nosotros interpretamos al efecto interactivo $UVR \times P$ sobre variables estructurales de agregación de la comunidad algal como un sinergismo negativo, mientras que Folt et al. (1999) lo interpretaría como un efecto antagónico. Esta diferencia de interpretación en muchos casos está determinada por la falta de respuesta que fundamentalmente los productores primarios presentaron frente al efecto individual de UVR. Así, el efecto de este factor solo se evidenció cuando los organismos, intensamente limitados por P para crecer, disponían de este nutriente. Este resultado evidencia que la escasez de fósforo es el principal factor que restringe el desarrollo de la biota en este ecosistema de alta montaña.

Podemos sintetizar los resultados obtenidos en relación a los efectos interactivos estudiados siguiendo distintas ópticas de análisis:

1) La escala temporal de análisis:

- Escala media (11 días): se manifestó un efecto sinérgico positivo de la interacción $UVR \times P$ sobre los componentes heterotróficos microbianos (bacterias, virus y ciliados), desapareciendo el mismo tras el agotamiento del pulso.
- Escala larga (2 meses): se observó un efecto sinérgico negativo $UVR \times P$ sobre distintas variables que evalúan la respuesta de la comunidad algal.

Estos resultados sugieren que la velocidad de las respuestas está relacionada con los tiempos de generación de los organismos. Sin embargo, la naturaleza y el signo de la interacción podría relacionarse con (i) distintas tolerancias de las especies que constituyen la red trófica microbiana a ambos factores; (ii) mecanismos compensatorios a nivel fisiológico en los organismos; y (iii) mecanismos compensatorios ecológicos que pueden estar relacionados con las interacciones entre los distintos niveles tróficos o que pueden manifestarse entre los distintos niveles de organización de la red trófica.

2) Tipo de organismo:

El efecto interactivo $UVR \times P$ fue de naturaleza sinérgica negativa sobre la abundancia algal (el pulso de P desenmascaró el efecto negativo de UVR) mientras que fue antagonico sobre la abundancia bacteriana (el pulso de P inhibió el efecto positivo de UVR) y sinérgico positivo sobre virus y ciliados (el pulso de P desenmascara el efecto positivo de UVR). Estos resultados evidencian que toda la comunidad microbiana muestra una alta tolerancia a UVR y particularmente las bacterias heterotróficas crecen mejor bajo UVR. Igualmente, todas las especies algales mostraron una alta tolerancia a la adición de P excepto las flageladas. Las distintas tolerancias de especies singulares (flageladas vs. no flageladas; bacterias vs. virus o ciliados) parecen ser responsables de la naturaleza de los efectos interactivos. Sin embargo, el signo de la interacción parece depender de otros aspectos adicionalmente al tipo de organismos.

3) Tipos de variable:

Estequiométricas: El efecto interactivo UVR \times P fue antagónico sobre la razón N:P algal (la adición de P disminuyó la razón N:P atenuando el efecto de disminución ejercido por UVR), mientras que no se encontró efecto sobre la razón N:P bacteriana. Tampoco se obtuvo efecto interactivo sobre la razón C:P algal, aunque esta variable disminuyó por efecto de la UVR independientemente del nivel de P añadido. Estas variaciones están en la base de la tolerancia o aclimatación de las algas frente a UVR.

Funcionales: existió un débil efecto interactivo UVR \times P sinérgico negativo sobre la producción primaria (la adición de P desenmascaró un efecto dañino de UVR) y un fuerte efecto UVR \times P sinérgico positivo sobre la producción bacteriana (la adición de P puso de manifiesto un efecto positivo de UVR). El porcentaje de excreción de carbono por parte de las algas siguió una respuesta semejante a la obtenida en la razón C:P, con mayor excreción bajo UVR. Esta respuesta nos ha permitido proponer una nueva estrategia de tolerancia de las algas bajo UVR, basada en que la excreción de carbono es el resultado de una ruta catabólica alternativa durante los procesos de fotosíntesis que permite el reciclado interno de P y, por lo tanto, potenciaría los mecanismos de reparación del daño causado por UVR.

Este conjunto de respuestas algales (estequiométricas y funcionales), evidencian la existencia de importantes mecanismos compensatorios a nivel fisiológico frente al daño por UVR. Estos mecanismos, al implicar una mayor excreción de carbono orgánico, restringen el crecimiento y determinan respuestas sinérgicas negativas sobre variables fisiológicas complementarias como clorofila/C cuando son estimuladas por la adición de P.

Estructurales: En relación a las variables de agregación de los productores primarios (abundancia y biomasa) UVR \times P ejerció un efecto sinérgico negativo. La adición de P invirtió un efecto positivo de UVR sobre la tasa de crecimiento de las algas no flageladas, desenmascarando un efecto dañino de UVR a altos niveles de adición de nutrientes. No obstante, el pulso de P estimuló la tasa de crecimiento de estas especies frente al intenso efecto inhibitorio ejercido sobre la tasa de crecimiento de las algas flageladas, determinando su rápida desaparición. UVR no ejerció ningún efecto sobre la tasa de crecimiento de algas flageladas.

En relación a variables de comunidad que representan propiedades emergentes, el efecto interactivo UVR \times P fue antagónico sobre la diversidad algal y por extensión sobre la diversidad del conjunto de la comunidad nanoplanctónica. Es interesante destacar que el pulso de P es el factor dominante *sensu* Crain et al. (2008) que genera el colapso de la diversidad algal, anulando el efecto estimulador de UVR sobre esta variable.

Estos resultados sugieren que, generalmente, las algas son tolerantes a UVR, llegando a ser estimuladas por este factor en determinados niveles de organización (i.e., tasa de crecimiento de no flageladas y diversidad).

El efecto interactivo UVR \times P sobre la estructura del conjunto del bucle microbiano heterotrófico (biomasa) fue de naturaleza sinérgica positiva. Esta variable mostró una respuesta unimodal al gradiente de adición de P, contrariamente a la respuesta lineal obtenida en las variables estructurales algales de agregación.

4) Tipo de metabolismo:

Heterotrofia: El efecto interactivo UVR \times P sobre la comunidad bacteriana fue de naturaleza antagónica, contrastando con el efecto sinérgico positivo ejercido sobre PB. El cambio en la naturaleza y signo de estos efectos interactivos es el resultado de mecanismos compensatorios ecológicos mediados por restricciones bióticas (lisis viral y depredación por ciliados), que dieron lugar a efectos interactivos sinérgicos positivos sobre los consumidores de bacterias.

Autotrofia: Sin embargo, el efecto sinérgico negativo UVR \times P sobre los productores primarios varía a lo largo de los distintos niveles de organización de esta comunidad. Así, este efecto es más intenso sobre variables fisiológicas (e.g., clorofila/C), se debilita a nivel funcional debido a los mecanismos compensatorios fisiológicos mediados por cambios estequiométricos, y se transfiere como un efecto sinérgico negativo más intenso sobre variables estructurales (e.g., abundancia, biomasa), que finalmente y debido a la pérdida de mixótrofos genera un efecto antagónico negativo sobre la diversidad de la comunidad.

De los resultados obtenidos se desprende que existen distintos **umbrales** de intensidad de pulsos de P, determinando la naturaleza y el signo de su interacción con UVR sobre distintas variables:

Un nivel del pulso de nutrientes de $30 \mu\text{g P L}^{-1}$ generó un efecto negativo de UVR sobre variables algales fisiológicas (i.e., chl *a*, clorofila/C), mientras que el efecto negativo de UVR sobre variables estructurales agregadas (i.e., abundancia, biomasa) tuvo lugar a partir de un pulso de P de $40 \mu\text{g P L}^{-1}$. Sorprendentemente, la adición de P incluso en sus niveles mas bajos ($20 \mu\text{g P L}^{-1}$, generó un efecto interactivo UVR \times P antagónico negativo sobre la diversidad, reflejo de la escasa tolerancia de las especies flageladas a cualquier intensidad de adición de P. La pérdida de las algas flageladas con metabolismo mixotrófico, frente al desarrollo en *bloom* de autótrofos estrictos de crecimiento rápido, supone la pérdida de un importante grupo funcional en estos ecosistemas, ya que constituyen un cortocircuito en el flujo de energía entre el bucle microbiano y la cadena de pastoreo (Medina-Sánchez et al. 2004).

Respecto al bucle microbiano, hasta el umbral $30 \mu\text{g P L}^{-1}$ existió un efecto UVR \times P sinérgico positivo que dio lugar al máximo desarrollo del mismo. El pulso de $40 \mu\text{g P L}^{-1}$, a pesar de generar la mayor respuesta observada de la producción bacteriana, dio lugar a un descenso en la biomasa del bucle microbiano por intensos controles ejercidos por virus y ciliados. Este descenso se acentúa con el pulso de mayor intensidad ($60 \mu\text{g P L}^{-1}$).

Es interesante destacar que el valor máximo de pulsos naturales registrados en un único evento de deposición en La Caldera es de $30 \mu\text{g P L}^{-1}$ (Villar-Argaiz et al. 2001), umbral a partir del que se empiezan a desenmascarar los efectos negativos de UVR sobre algas (e.g., clorofila). Sin embargo, esa máxima intensidad de pulso no alcanza ninguno de los umbrales que limitan el desarrollo del bucle microbiano. Por tanto, resulta sorprendente que siendo el efecto UVR \times P de naturaleza sinérgica positiva sobre el conjunto del bucle microbiano heterotrófico (lo que significa que estimula su desarrollo) y negativa sobre las algas, sean estas últimas las que dominen la comunidad nanoplanctónica incluso tras un pulso de esta intensidad. Este llamativo resultado podría explicarse como consecuencia de la ventaja competitiva de las algas en la captura e inmovilización del pulso de P independientemente de la calidad de la luz, constituyendo el control biótico por competencia el principal mecanismo que restringe el desarrollo del bucle microbiano heterotrófico.

Aunque tradicionalmente UVR ha sido considerado un factor dañino para los organismos (ver revisión de Häder et al. 2007), las comunidades planctónicas de los lagos de Sierra Nevada expuestas experimentalmente a UVR fueron más diversas. Este resultado indica que estas comunidades están altamente aclimatadas a UVR y a la extrema oligotrofia característica de estos ecosistemas, gracias al desarrollo de distintas estrategias adaptativas a lo largo de los niveles de organización para

soportar esta adversidad. Nuestros resultados muestran que los pulsos de P generan una pérdida de diversidad y, por lo tanto, la entrada de P, más que su escasez, actúa como un factor de estrés en ecosistemas crónicamente limitados por nutrientes minerales. De aquí se desprende la elevada vulnerabilidad de La Caldera a las entradas pulsadas de nutrientes, aspecto que es relevante en un escenario de incremento de la intensidad de pulsos de P (eutrofización) asociados a transporte atmosférico de aerosoles, como consecuencia del cambio global.

Conclusión

En este estudio se demuestra experimentalmente que la red trófica microbiana del lago de La Caldera está fuertemente aclimatada a altos flujos de radiación ultravioleta y a extrema oligotrofia, ambas características propias de los lagos de alta montaña. La tolerancia a estas condiciones se manifiesta por una disminución en el desarrollo de bacterias y una pérdida de diversidad al excluir la radiación ultravioleta. Esta tolerancia se basa en la existencia de mecanismos compensatorios fisiológicos, que en los productores primarios están ligados al mantenimiento de la homeostasis estequiométrica.

Los pulsos de P acentuaron el efecto positivo de la radiación ultravioleta sobre el bucle microbiano heterotrófico, y desenmascararon su efecto negativo sobre la biomasa algal. Por tanto predominan los efectos interactivos, no aditivos. Sin embargo, fue el efecto individual de la adición de P el que principalmente controló el desarrollo de la comunidad algal, su diversidad y su prevalencia sobre los organismos heterotróficos. La ventaja competitiva de las algas sobre las bacterias en la captura e inmovilización de P, junto con la existencia de mecanismos compensatorios ecológicos (depredación por virus y ciliados) determinan el escaso desarrollo del bucle microbiano heterotrófico bajo ambos factores estimuladores (UVR y P). Estas interacciones bióticas podrían ser responsables de que el predominio generalizado del bucle microbiano en medios oligotróficos, no se mantenga en ecosistemas transparentes a la radiación ultravioleta.

Finalmente, en este estudio establecemos que pulsos naturales de nutrientes que excedan un umbral de $20 \mu\text{g P L}^{-1}$, pueden conducir a la desaparición de las especies flageladas con metabolismo mixotrófico. La pérdida de este importante grupo funcional, que constituye un cortocircuito en el flujo de energía entre el bucle microbiano y la cadena de pastoreo, podría reducir la resiliencia de estos ecosistemas de alta montaña donde los mixótrofos generalmente dominan la comunidad algal. De aquí que la entrada de pulsos de P, más que su escasez, sea el principal factor de estrés en estos ecosistemas limitados por nutrientes minerales, evidenciando su elevada vulnerabilidad en el actual escenario de cambio global.

Bibliografía

- Aas, P., M. M. Lyons, R. Pledger, D. L. Mitchell, W. H. Jeffrey (1996). Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquatic Microbial Ecology* **11**: 229-238.
- Agustí, S., C. M. Duarte (2005). Threshold of gross primary production for planktonic metabolic balance in the Southern Ocean: An experimental test. *Limnology and Oceanography* **50**: 1334-1339.
- Agustí, S., M. P. Satta, M. P. Mura (2004). Summer community respiration and pelagic metabolism in upper surface Antarctic waters. *Aquatic Microbial Ecology* **35**: 197-205.
- Anadón, R., M. Estrada (2002). The FRUELA cruises. A carbon flux study in productive areas of the Antarctic Peninsula (December 1995-February 1996). *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **49**: 567-583.
- Andersson, A., K. Samuelsson, P. Haecky, J. Albertsson (2006). Changes in the pelagic microbial food web due to artificial eutrophication. *Aquatic Ecology* **40**: 299-313.
- American Public Health Association (APHA) (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th edn. American Public Health Association, Washington, USA.
- Aota, Y., H. Nakajima (2001). Mutualistic relationships between phytoplankton and bacteria caused by carbon excretion from phytoplankton. *Ecological Research* **16**: 289-299.
- Auerbach, S. I. (1981). Ecosystem response to stress: a review of concepts and approaches. In: *Stress effects on natural ecosystems* (eds. Barrett GW, Rosenberg R), John Wiley and Sons Ltd, pp. 29-41.

- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyerreil, F. Thingstad (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology-Progress Series* **10**: 257-263.
- Azam, F. (1998). Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* **280**: 694-696
- Banaszak A. T. (2003) Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. In: *UV Effects in aquatic organisms and ecosystems* (eds. Helbling EW, Zagarese HE), pp. 329–356. *Comprehensive series in Photochemistry and Photobiology*. Cambridge Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Barrett, G. W., G. M. van Dyne, E. P. Odum (1976). Stress ecology. *BioScience* **26**: 192-194.
- Behrenfeld, M. J., H. Lee, L. F. Small (1994). Interactions Between Nutritional-Status and Long-Term Responses to Ultraviolet-B Radiation Stress in A Marine Diatom. *Marine Biology* **118**: 523-530.
- Belzile, C., S. Demers, G. A. Ferreyra, I. Schloss, C. Nozais, K. Lacoste, B. Mostajir, S. Roy, M. Gosselin, E. Pelletier, S. M. F. Giancesella, M. Vernet (2006). UV effects on marine planktonic food webs: A synthesis of results from mesocosm studies. *Photochemistry and Photobiology* **82**: 850-856.
- Benton, T. G., M. Solan, J. M. J. Travis, S. M. Sait (2008). Microcosm experiments can inform global ecological problems. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 516-521
- Bergametti, G. L., E. Remoudaki, R. Losno, E. Steiner, B. Chatenet, P. Buat-Ménard (1992). Source, transport and deposition of atmospheric phosphorus over the northwestern Mediterranean. *Journal of atmospheric chemistry* **14**: 501-513.

- Bergeron, M., W. F. Vincent (1997). Microbial food web responses to phosphorus supply and solar UV radiation in a subarctic lake. *Aquatic Microbial Ecology* **12**: 239-249.
- Berman-Frank, I., Z. Dubinsky (1999). Balanced growth in aquatic plants: Myth or reality? Phytoplankton use the imbalance between carbon assimilation and biomass production to their strategic advantage. *Bioscience* **49**: 29-37.
- Bern, L. (1985). Autoradiographic studies of (methyl-³H]thymidine incorporation in a cyanobacterium (*Microcystis wesenbergii*)-bacterium association and in selected algae and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 232-233.
- Bertoni, R., C. Callieri (1999). Effects of UVB radiation on freshwater autotrophic and heterotrophic picoplankton in a subalpine lake. *Journal of Plankton Research* **21**: 1373-1388.
- Biddanda, B., M. Ogdahl, J. Cotner (2001). Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnology and Oceanography* **46**: 730-739.
- Billen, G., P. Servais, S. Becquevort (1990). Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments - bottom-up or top-down control. *Hydrobiologia* **207**: 37-42.
- Billick, I., T. J. Case (1994). Higher-order interactions in ecological communities - what are they and how can they be detected. *Ecology* **75**: 1529-1543.
- Bintz, J. C., S. W. Nixon, B. A. Buckley, S. L. Granger (2003). Impacts of temperature and nutrients on coastal lagoon plant communities. *Estuaries* **26**: 765-776.
- Bjørnsen, P. K. (1988). Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it? *Limnology and Oceanography* **33**, 151–154.

- Blanck, H. (2002). A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. *Human and Ecological Risk Assessment* **8**: 1003-1034.
- Blumthaler, M., W. Ambach, W. Rehwald (1992). Solar UV-A and UV-B radiation fluxes at two alpine stations at different altitudes. *Theoretical and Applied Climatology* **46**: 39-44.
- Boechat, I. G., G. Weithoff, A. Kruger, B. Gucker, R. Adrian (2007). A biochemical explanation for the success of mixotrophy in the flagellate *Ochromonas sp.* *Limnology and Oceanography* **52**: 1624-1632.
- Boersma, M., J. J. Elser (2006). Too much of a good thing: On stoichiometrically balanced diets and maximal growth. *Ecology* **87**: 1325-1330.
- Boone, M. D., R. D. Semlitsch, E. E. Little, M. C. Doyle (2007). Multiple stressors in amphibian communities: Effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecological Applications* **17**: 291-301.
- Bothwell, M. L., D. Sherbot, A. C. Roberge, R. J. Daley (1993). Influence of natural ultraviolet-radiation on lotic periphytic diatom community growth, biomass accrual, and species composition - short-term versus long-term effects. *Journal of Phycology* **29**: 24-35.
- Bothwell, M. L., D. M. J. Sherbot, C. M. Pollock (1994). Ecosystem Response to Solar Ultraviolet-B Radiation - Influence of Trophic-Level Interactions. *Science* **265**: 97-100.
- Bratbak, G., M. Heldal, S. Norland, T. F. Thingstad (1990). Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 100-105.

- Bratbak, G., M. Heldal, T. F. Thingstad, B. Riemann, O. H. Haslund (1992). Incorporation of viruses into the budget of microbial C-transfer - a 1st approach. *Marine Ecology-Progress Series* **83**: 273-280.
- Breitburg, D. L., J. W. Baxter, C. A. Hatfield, R. W. Howarth, C. G. Jones, G. M. Lovett, C. Wigand (1998). Understanding effects of multiple stressors: ideas and challenges. In: *Successes, limitations, and frontiers in ecosystem science* (eds. Pace ML, Groffman PM), Springer, pp. 416-431.
- Breitburg, D., S. Seitzinger, J. Sanders (1999). The effects of multiple stressors on freshwater and marine ecosystems - Preface. *Limnology and Oceanography* **44**: 737-738.
- Breitburg, D., G. F. Riedel (2005). Multiple stressors in marine systems. In: *Marine conservation biology: the science of maintaining the sea's biodiversity* (eds. Norse EA, Crowder LB). pp. 167-182.
- Brooks, S. J., H. Bennion, H. J. B. Birks (2001). Tracing lake trophic history with a chironomid-total phosphorus inference model. *Freshwater Biology* **46**: 513-533.
- Brutemark, A., K. Rengefors, N. J. Anderson (2006). An experimental investigation of phytoplankton nutrient limitation in two contrasting low arctic lakes. *Polar Biology* **29**: 487-494.
- Bruland, K. W., J. R. Donat, D. A. Hutchins (1991). Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnology and Oceanography* **36**: 1555-1577.
- Bullejos, F. J., M. Villar-Argaiz, J. M. Medina-Sanchez, J. A. Delgado-Molina, P. Carrillo (2008) Impacts of UV radiation and nutrients on the elemental composition of zooplankton in a Mediterranean high mountain lake. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **30**: 623-626.

- Buma, A. G. J., P. Boelen, W. H. Jeffrey (2003). UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. In: UV Effects in aquatic organisms and ecosystems. Comprehensive series in Photochemistry and Photobiology (eds Helbling EW, Zagarese HE), pp. 291–327. Cambridge Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Butterwick, C., S. I. Heaney, J. F. Talling (1982). A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. *British Phycological Journal* **17**: 69-79.
- Børsheim, Y., G. Bratbak, M. Heldal (1990). Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electro microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 352-366.
- Cabrera, S., M. Lopez, B. Tartarotti (1997). Phytoplankton and zooplankton response to ultraviolet radiation in a high-altitude Andean lake: short- versus long-term effects. *Journal of Plankton Research* **19**: 1565-1582.
- Callieri, C., G. Morabito, Y. Huot, P. J. Neale, E. Litchman (2001). Photosynthetic response of pico- and nanoplanktonic algae to UVB, UVA and PAR in a high mountain lake. *Aquatic Sciences* **63**: 286-293.
- Callieri, C., A. Pugnetti, M. Manca (1999). Carbon partitioning in the food web of a high mountain lake: from bacteria to zooplankton. *Journal of Limnology* **58**: 144-151.
- Carpenter, S. R. (1996). Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. *Ecology* **77**: 677-680.
- Carrillo, P. (1989). Análisis de las interacciones tróficas en el plancton de un sistema oligotrófico. PhD. Thesis. University of Granada: 212 pp.

- Carrillo, P., L. Cruz-Pizarro, P. Sánchez-Castillo (1990). Analysis of phytoplankton-zooplankton relationships in an oligotrophic lake under natural and manipulated conditions. *Hydrobiologia* **200**: 49-58.
- Carrillo, P., P. Sánchez-Castillo, L. CruzPizarro (1991). Coincident Zooplankton and Phytoplankton Diel Migrations in A High Mountain Lake (la Caldera, Sierra-Nevada, Spain). *Archiv fur Hydrobiologie* **122**: 57-67.
- Carrillo, P., I. Reche, P. Sánchez-Castillo, L. Cruz-Pizarro (1995). Direct and indirect effects of grazing on the phytoplankton seasonal succession in an oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research* **17**: 1363-1379.
- Carrillo, P., I. Reche, L. Cruz-Pizarro (1996). Intraspecific stoichiometric variability and the ratio of nitrogen to phosphorus resupplied by zooplankton. *Freshwater Biology* **36**: 363-374.
- Carrillo, P., J. M. Medina-Sánchez, M. Villar-Argaiz (2002). The interaction of phytoplankton and bacteria in a high mountain lake: Importance of the spectral composition of solar radiation. *Limnology and Oceanography* **47**: 1294-1306.
- Carrillo, P., J. M. Medina-Sánchez, M. Villar-Argaiz, J. A. Delgado-Molina, F. J. Bullejos (2006). Complex interactions in microbial food webs: Stoichiometric and functional approaches. *Limnetica* **25**: 189-204.
- Carrillo, P., J. A. Delgado-Molina, J. M. Medina-Sánchez, F. J. Bullejos, M. Villar-Argaiz (2008a). Phosphorus inputs unmask negative effects of ultraviolet radiation on algae in a high mountain lake. *Global Change Biology* **14**: 423-439.
- Carrillo, P., M. Villar-Argaiz, J. M. Medina-Sanchez (2008b). Does Microorganism Stoichiometry Predict Microbial Food Web Interactions After a Phosphorus Pulse? *Microbial Ecology*.

- Chapin, F. S., K. Autumn, F. Pugnaire (1993). Evolution of suites of traits in response to environmental-stress. *American Naturalist* **142**: S78-S92.
- Chatila, K., S. Demers, B. Mostajir, M. Gosselin, J. P. Chanut, P. Monfort, D. Bird (2001). The responses of a natural bacterioplankton community to different levels of ultraviolet-B radiation: A food web perspective. *Microbial Ecology* **41**: 56-68.
- Cho, B. C., F. Azam (1988). Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the oceans interior. *Nature* **332**: 441-443.
- Christensen, M. R., M. D. Graham, R. D. Vinebrooke, D. L. Findlay, M. J. Paterson, M. A. Turner (2006). Multiple anthropogenic stressors cause ecological surprises in boreal lakes. *Global Change Biology* **12**: 2316-2322.
- Chrzanowski, T. H., J. P. Grover 2001. Effects of mineral nutrients on the growth of bacterio- and phytoplankton in two southern reservoirs. *Limnology and Oceanography* **46**: 1319-1330.
- Cotner, J. B. (2000). Intense winter heterotrophic production stimulated by benthic resuspension. *Limnology and Oceanography* **45**: 1672-1676.
- Cotner, J. B., B. A. Biddanda (2002). Small players, large role: Microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* **5**: 105-121.
- Cotner, J. B., R. G. Wetzel (1992). Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus-compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnology and Oceanography* **37**: 232-243.
- Cottingham, K. L., S. R. Carpenter, A. L. St Amand (1998). Responses of epilimnetic phytoplankton to experimental nutrient enrichment in three small seepage lakes. *Journal of Plankton Research* **20**: 1889-1914.

- Crain, C. M., K. Kroeker, B. S. Halpern (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters* **11**: 1304-1315.
- Crutzen, P. J. (1992). Ozone depletion - Ultraviolet on the increase. *Nature* **356**: 104-105.
- Cruz-Pizarro, L. (1981). Estudio de la comunidad zooplanctónica de un lago de alta montaña (La Caldera, Sierra Nevada, Granada). PhD. University of Granada. 186 pp.
- Currie, D. J. (1990). Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton and phosphorus. *Limnology and Oceanography* **35**: 1437-1455
- Darling, E. S., I. M. Côté (2008). Quantifying the evidence for ecological synergies. *Ecology Letters* **11**.
- Daufresne, T., M. Loreau (2001). Ecological stoichiometry, primary producer-decomposer interactions, and ecosystem persistence. *Ecology* **82**: 3069-3082.
- Davidson, A., L. Belbin (2002). Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on the marine microbial community. *Aquatic Microbial Ecology* **27**: 159-174.
- Davidson, A. T., A. van der Heijden (2000). Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* **21**: 257-264.
- Day, T. A., P. J. Neale (2002). Effects of UV-B radiation on terrestrial and aquatic primary producers. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 371-396.
- De Hoyos, C., J. J. Aldasoro, M. Toro, F. A. Comin (1998). Specific composition and ecology of chrysophyte flagellates in Lake Sanabria (NW Spain). *Hydrobiologia* **370**: 287-295.

- Delgado-Molina, J. A., P. Carrillo, J. M. Medina-Sánchez, M. Villar-Argaiz, F. J. Bullejos (2009). Interactive effects of phosphorus loads and ambient ultraviolet radiation on the algal community in a high-mountain lake. *Journal of Plankton Research* **31**: 619-634.
- Del Giorgio, P.A., J. J. Cole (1998). Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 503-541.
- Del Giorgio, P. A., J. J. Cole, A. Cimleris (1997). Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature* **385**: 148-151.
- Diaz, M. M., F. L. Pedrozo, P. F. Temporetti (1998). Phytoplankton of two Araucanian lakes of differing trophic status (Argentina). *Hydrobiologia* **369-370**: 45-57.
- Dickman, E. M., M. J. Vanni, M. J. Horgan (2006). Interactive effects of light and nutrients on phytoplankton stoichiometry. *Oecologia* **149**: 676-689.
- Diffey, B. L. (2002). What is light? *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **18**: 68-74.
- Dodson, S. I., S. E. Arnott, K. L. Cottingham (2000). The relationship in lake communities between primary productivity and species richness. *Ecology* **81**: 2662-2679.
- Donahue, W. F., D. W. Schindler, S. J. Page, M. P. Staiton (1998). Acid-induced changes in DOC quality in an experimental whole-lake manipulation. *Environmental Science & Technology* **32**: 2954-2960.
- Doval, M. D., X. Álvarez-Salgado, C. G. Castro, F. F. Pérez (2002). Dissolved organic carbon distributions in the Bransfield and Gerlache Straits, Antarctica. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **49**: 663-674.

- Doyle, S. A., J. E. Saros, C. E. Williamson (2005). Interactive effects of temperature and nutrient limitation on the response of alpine phytoplankton growth to ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* **50**: 1362-1367.
- Duarte, C. M., S. Agustí, J. M. Gasol, D. Vaqué, E. Vazquez-Dominguez (2000). Effect of nutrient supply on the biomass structure of planktonic communities: an experimental test on a Mediterranean coastal community. *Marine Ecology-Progress Series* **206**: 87-95.
- Duarte, C. M., S. Agustí, D. Vaqué, N. S. R. Agawin, J. Felipe, E. O. Casamayor, J. M. Gasol (2005). Experimental test of bacteria-phytoplankton coupling in the Southern Ocean. *Limnology and Oceanography* **50**: 1844-1854.
- Duarte, C. M., J. Dachs, M. Llabres, P. onso-Laita, J. M. Gasol, A. Tovar-Sanchez, S. Sanudo-Wilhemly, S. Agusti (2006). Aerosol inputs enhance new production in the subtropical northeast Atlantic. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences* **111**: doi:10.1029/2005JG000140.
- Ducklow, H., C. Carlson, M. Church, D. Kirchman, D. Smith, G. Steward (2001). The seasonal development of the bacterioplankton bloom in the Ross Sea, Antarctica 1994-1997. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **48**: 4199-4221.
- Ducklow, H. W., C. A. Carlson (1992). Oceanic bacterial production. *Advances in Microbial Ecology* **12**: 113-181.
- Ducklow, H. W., D. A. Purdie, P. J. L. Williams, J. M. Davies (1986). Bacterioplankton - A sink for carbon in a coastal marine plankton community. *Science* **232**: 865-867.
- Duthie, H. C., C. J. Hart (1987). The phytoplankton of the subarctic Canadian Great Lakes. *Advances in Limnology* **25**: 1-9.

- Echevarría, F., P. Carrillo, F. Jiménez, P. Sánchez-Castillo, L. Cruz-Pizarro, J. Rodríguez (1990). The Size Abundance Distribution and Taxonomic Composition of Plankton in An Oligotrophic, High Mountain Lake (La-Caldera, Sierra-Neveda, Spain). *Journal of Plankton Research* **12**: 415-422.
- Eloranta, P. (1995). Phytoplankton of the national park lakes in central and southern Finland. *Annales Botanici Fennici* **32**: 193-209.
- Eloranta, P. (1989). Scaled chrysophytes (chrysophyceae and cynurophyceae) from national-park lakes in southern and central Finland. *Nordic Journal of Botany* **8**: 671-681.
- Elser, J. J., M. Kyle, W. Makino, T. Yoshida, J. Urabe (2003). Ecological stoichiometry in the microbial food web: a test of the light : nutrient hypothesis. *Aquatic Microbial Ecology* **31**: 49-65.
- Elser, J. J., J. H. Schampel, M. Kyle, J. Watts, E. W. Carson, T. A. Dowling, C. Tang, P. D. Roopnarine (2005). Response of grazing snails to phosphorus enrichment of modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology* **50**: 1826–1835.
- Escudero, M., S. Castillo, X. Querol, A. Avila, M. Alarcon, M. M. Viana, A. Alastuey, E. Cuevas, S. Rodriguez (2005). Wet and dry African dust episodes over eastern Spain. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **110**: doi: 10.1029/2004JD004731.
- Fagerbakke, K. M., M. Heldal, S. Norland (1996). Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* **10**: 15-27.
- Felip, M., F. Bartomeus, S. Halac, J. Catalán (1999). Microbial plankton assemblages, composition and biomass, during two ice-free periods in a deep high mountain lake (Estany Redó, Pyrenees). *Journal of Limnology* **58**: 193-202.

- Felip, M., M. L. Pace, J. J. Cole (1996). Regulation of planktonic bacterial growth rates: The effects of temperature and resources. *Microbial Ecology* **31**: 15-28.
- Foissner, W. (2008). Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodiversity and Conservation* **17**: 235-242.
- Folt, C. L., C. Y. Chen, M. V. Moore, J. Burnaford (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnology and Oceanography* **44**: 864-877.
- Frost, P. C., C. T. Cherrier, J. H. Larson, S. Bridgham, G. A. Lamberti (2007). Effects of dissolved organic matter and ultraviolet radiation on the accrual, stoichiometry and algal taxonomy of stream periphyton. *Freshwater Biology* **52**: 319-330.
- Frost, P. C., J. J. Elser (2002). Effects of light and nutrients on the net accumulation and elemental composition of epilithon in boreal lakes. *Freshwater Biology* **47**: 173-183.
- Frost, P. C., M. A. Evans-White, Z. V. Finkel, T. C. Jensen, V. Matzek (2005). Are you what you eat? Physiological constraints on organismal stoichiometry in an elementally imbalanced world. *Oikos* **109**: 18-28.
- Frost, T. M., P. K. Montz, T. K. Kratz, T. Badillo, P. L. Brezonik, M. J. Gonzalez, R. G. Rada, C. J. Watras, K. E. Webster, J. G. Wiener, C. E. Williamson, D. P. Morris (1999). Multiple stresses from a single agent: Diverse responses to the experimental acidification of Little Rock Lake, Wisconsin. *Limnology and Oceanography* **44**: 784-794.
- Fuhrman, J. A., F. Azam (1982). Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Marine Biology* **66**: 109-120.

- Gao, K., P. Li, T. Watanabe, W. E. Helbing (2008). Combined effects of ultraviolet radiation and temperature on morphology, photosynthesis and DNA of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta). *Journal of Phycology* **44**: 777-786.
- García-Pichel, F. (1994). A Model for Internal Self-Shading in Planktonic Organisms and Its Implications for the Usefulness of Ultraviolet Sunscreens. *Limnology and Oceanography* **39**: 1704-1717.
- Gasol, J. M., P. A. Del Giorgio, C. M. Duarte (1997). Biomass distribution in marine planktonic communities. *Limnology and Oceanography* **42**: 1353-1363.
- Goes, J. I., N. Handa, S. Taguchi, T. Hama, H. Saito (1996). Metabolism of neutral monosaccharide constituents of storage and structural carbohydrates in natural assemblages of marine phytoplankton exposed to ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* **41**: 1478-1489.
- Goldman, J. C., D. A. Caron, M. R. Dennet (1987) Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by C:N ratio. *Limnology and Oceanography* **32**: 1239-1252.
- Grice, G. D., M. R. Reeve (1982). *Marine mesocosms: Biological and chemical research in experimental ecosystems*. Springer-Verlag. New York.
- Guerzoni, S., R. Chester, F. Dulac, B. Herut, M. D. Loye-Pilot, C. Measures, C. Migon, E. Molinaroli, C. Moulin, P. Rossini, C. Saydam, A. Soudine, P. Ziveri (1999). The role of atmospheric deposition in the biogeochemistry of the Mediterranean Sea. *Progress in Oceanography* **44**: 147-190.
- Gustavson, K., K. Garde, S. Å. Wängberg, J. S. Selmer (2000). Influence of UV-B radiation on bacterial activity in coastal waters. *Journal of Plankton Research* **22**: 1501-1511.

- Hader, D. P., H. D. Kumar, R. C. Smith, R. C. Worrest (2007). Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences* **6**: 267-285.
- Halac, S., M. Felip, L. Camarero, S. Sommaruga-Wograth, R. Psenner, J. Catalan, R. Sommaruga (1997). An in situ enclosure experiment to test the solar UVB impact on plankton in a high-altitude mountain lake. I. Lack of effect on phytoplankton species composition and growth. *Journal of Plankton Research* **19**: 1671-1686.
- Hall, E. K., J. B. Cotner (2007). Interactive effect of temperature and resources on carbon cycling by freshwater bacterioplankton communities. *Aquatic Microbial Ecology* **49**: 35-45.
- Hall, J. A., K. Safi (2001). The impact of in situ Fe fertilisation on the microbial food web in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **48**: 2591-2613.
- Hanson, P. J., S. D. Wullschleger, R. J. Norby, T. J. Tschaplinski, C. A. Gunderson (2005). Importance of changing CO₂, temperature, precipitation, and ozone on carbon and water cycles of an upland-oak forest: incorporating experimental results into model simulations. *Global Change Biology* **11**: 1402-1423.
- Hansson, L. A., C. Brönmark (2002). Environmental issues in lakes and ponds: current state and perspectives. *Environmental Conservation* **29**: 290-307.
- Harrington, R., I. Woiwod, T. Sparks (1999). Climate change and trophic interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 146-150.
- Havskum, H., B. Riemann (1996). Ecological importance of bacterivorous, pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Marine Ecology-Progress Series* **137**: 251-263.

- Hay, M. E., Q. E. Kappel, W. Fenical (1994). Synergisms in plant defence against herbivores: Interactions of chemistry, calcification, and plant quality. *Ecology* **75**: 1714–1727.
- Healey, F. P., L. L. Hendzel (1980) Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **37**: 442–453.
- Helbling, E. W., E. R. Marguet, V. E. Villafañe, O. Holm-Hansen (1995). Bacterioplankton viability in Antarctic waters as affected by solar ultraviolet radiation. *Marine Ecology Progress Series* **126**: 293-298.
- Helbling, E. W., H. Zagarese (2003). UV effects in aquatic organisms and ecosystems. *Comprehensive series in Photochemistry and Photobiology*. Cambridge Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Henry, H. A. L., J. D. Juarez, C. B. Field, P. M. Vitousek (2005). Interactive effects of elevated CO₂, N deposition and climate change on extracellular enzyme activity and soil density fractionation in a California annual grassland. *Global Change Biology* **11**: 1808-1815.
- Heraud, P., S. Roberts, K. Shelly, J. Beardall (2005). Interactions between UV-B exposure and phosphorus nutrition. II. Effects on rates of damage and repair. *Journal of Phycology* **41**: 1212-1218.
- Herndl, G. J., G. Mulleriklas, J. Frick (1993). Major role of ultraviolet-B in controlling bacterioplankton growth in the surface-layer of the ocean. *Nature* **361**: 717-719.
- Herut, B., D. Krom, G. Pan, R. Mortimer (1999). Atmospheric input of nitrogen and phosphorus to the Southeast Mediterranean: Sources, fluxes and possible impact. *Limnology and Oceanography* **44**: 1683–1692.

- Herut, B., R. Collier, M. D. Krom (2002). The role of dust in supplying nitrogen and phosphorus to the Southeast Mediterranean. *Limnology and Oceanography* **47**: 870–878.
- Hessen, D. O., H. J. De Lange, E. van Donk (1997). UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshwater Biology* **38**: 513–524.
- Hessen, D. O., P. J. Faerovig, T. Andersen (2002). Light, nutrients, and P : C ratios in algae: Grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology* **83**: 1886–1898.
- Hessen, D. O., E. Leu, P. J. Færøvig, S. F. Petersen (2008) Light and spectral properties as determinants of C:N:P-ratios in phytoplankton. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **55**: 2169–2175.
- Hill, W. R., S. E. Fanta (2008). Phosphorus and light colimit periphyton growth at subsaturating irradiances. *Freshwater Biology* **53**: 215–225.
- Hiriart, V. P., B. M. Greenberg, S. J. Guildford, R. E. H. Smith (2002). Effects of ultraviolet radiation on rates and size distribution of primary production by Lake Erie phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**: 317–328.
- Hoagland, K. D., R. W. Drenner, J. D. Smith, D. R. Cross (1993). Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**: 627–637.
- Hoffman, J. R., L. J. Hansen, T. Klinger (2003). Interactions between UV radiation and temperature limit inferences from single-factor experiments. *Journal of Phycology* **39**: 268–272.

- Horne, M. T., W. A. Dunson (1995). The interactive effects of low pH, toxic metals, and DOC on a simulated temporary pond community. *Environmental Pollution* **89**: 155-161.
- Hough, R. A., R. L. Thompson (1996). The influence of a dissolved inorganic nitrogen gradient on phytoplankton community dynamics in a chain of lakes. *Hydrobiologia* **319**: 225-235.
- Huovinen, P., J. Matos, I. S. Pinto, F. L. Figueroa (2006). The role of ammonium in photoprotection against high irradiance in the red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquatic Botany* **84**: 308-316.
- Huston, M. A. (1999). Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology: Synthesis of comments. *Ecology* **80**: 1088-1089.
- Isaksson, A., A. K. Bergstrom, P. Blomqvist, M. Jansson (1999). Bacterial grazing by phagotrophic phytoflagellates in a deep humic lake in northern Sweden. *Journal of Plankton Research* **21**: 247-268.
- Izaguirre, I., A. Vinocur, G. Mataloni, M. Pose (1998). Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Hydrobiologia* **370**: 73-87.
- Jacobson, T., A. Prevodnik, B. Sundelin (2007). Combined effects of temperature and a pesticide on the Baltic amphipod *Monoporeia affinis*. *Aquatic Biology* **1**: 269-276.
- Jaenicke, R., L. Schütz (1978). Comprehensive study of physical and chemical properties of the surface aerosols in the Cape Verde Islands region. *Journal of Geophysical Research* **83**: 3585–3589.
- Jansson, M., P. Blomqvist, A. Jonsson, A. K. Bergstrom (1996). Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and

- heterotrophic nanoflagellates in Lake Ortrasket. *Limnology and Oceanography* **41**: 1552-1559.
- Jeffrey, S. W., G. F. Humphrey (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **167**: 191-194.
- Jeffrey, W. H., R. J. Pledger, P. Aas, S. Hager, R. B. Coffin, R. VonHaven, D. L. Mitchell (1996). Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Marine Ecology-Progress Series* **137**: 283-291.
- Jeffrey, W. H., J. P. Kase, S. W. Wielm (2000). UV radiation effects on heterotrophic bacterioplankton and viruses in marine ecosystems. In: *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment* (eds. de Mora SJ, Demers S, Vernet M), pp. 206-236. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jickells, T. D., Z. S. An, K. K. Andersen, A. R. Baker, G. Bergametti, N. Brooks, J. J. Cao, P. W. Boyd, R. A. Duce, K. A. Hunter, H. Kawahata, N. Kubilay, J. laRoche, P. S. Liss, N. Mahowald, J. M. Prospero, A. J. Ridgwell, I. Tegen, R. Torres (2005). Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. *Science* **308**: 67-71.
- Joint, I., P. Henriksen, G. A. Fonnes, D. Bourne, T. F. Thingstad, B. Riemann (2002). Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology* **29**: 145-159.
- Jones, J. C. (1979). A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in freshwater. FBA Scientific Publication N° 39.
- Kaiser, E., G. J. Herndl (1997). Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4026-4031.

- Karentz, S., J. E. Cleaver, D. L. Mitchell (1991). Dna Damage in the Antarctic. *Nature* **350**: 28.
- Keil, M., D. R. Jackson, M. C. Hort (2007). The January 2006 low ozone event over the UK 2006. *Atmospheric Chemistry and Physics* **7**: 961–972.
- Kemp, W. M., J. E. Petersen, R. H. Gardner (2001) Scale dependence and the problem of extrapolation: Implications for experimental and natural coastal ecosystems. In *Scaling relations in experimental ecology* (eds. Gardner RH, Kemp WM, Kennedy VS, Petersen JE), pp. 3-57. Columbia University Press, New York.
- Kashian, D. R., R. E. Zuellig, K. A. Mitchell, W. H. Clements (2007). The cost of tolerance: Sensitivity of stream benthic communities to UV-B and metals. *Ecological Applications* **17**: 365-375.
- Kneitel, J. M., J. M. Chase (2004). Trade-offs in community ecology: linking spatial scales and species coexistence. *Ecology Letters* **7**: 69-80.
- Kononen, K., E. O. Lahdes, L. Gronlund (1993). Physiological and Community Responses of Summer Plankton to Nutrient Manipulation in the Gulf of Finland (Baltic Sea) with Special Reference to Phosphorus. *Sarsia* **78**: 243-253.
- Korbee-Peinado, N., R. T. A. Diaz, F. L. Figueroa, E. W. Helbling (2004). Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *Journal of Phycology* **40**: 248-259.
- Laurion, I., M. Ventura, J. Catalan, R. Psenner, R. Sommaruga (2000). Attenuation of ultraviolet radiation in mountain lakes: Factors controlling the among- and within-lake variability. *Limnology and Oceanography* **45**: 1274-1288.

- Laurion, I., W. F. Vincent (1998). Cell size versus taxonomic composition as determinants of UV-sensitivity in natural phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography* **43**: 1774-1779.
- Lee, S., J. A. Fuhrman (1987). Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1298-1303.
- Leech, D. M., C. E. Williamson (2001). In situ exposure to ultraviolet radiation alters the depth distribution of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* **46**: 416-420.
- Legendre, L., F. Rassoulzadegan (1995). Plankton and nutrient dynamics in marine waters. *Ophelia* **41**: 153-172.
- Lenihan, H. S., F. Micheli, S. W. Shelton, C. H. Peterson (1999). The influence of multiple environmental stressors on susceptibility to parasites: An experimental determination with oysters. *Limnology and Oceanography* **44**: 910-924.
- Lepistö, L., U. Rosenström (1998). The most typical phytoplankton taxa in four types of boreal lakes. *Hydrobiologia* **370**: 89-97.
- Leu, E., P. J. Færøvig, D. O. Hessen (2006). UV effects on stoichiometry and PUFAs of *Selenastrum capricornutum* and their consequences for the grazer *Daphnia magna*. *Freshwater Biology* **51**: 2296–2308.
- Leu, E., S. Falk-Petersen, D. O. Hessen (2007). Ultraviolet radiation negatively affects growth but not food quality of arctic diatoms. *Limnology and Oceanography* **52**: 787–797.
- Lichtenstein, E. P., T. T. Liang, B. N. Anderegg (1973). Synergism of insecticides by herbicides. *Science* **181**: 847-849.

- Lignell, R. (1992). Problems in filtration fractionation of ^{14}C primary productivity samples. *Limnology and Oceanography* **37**: 172–178.
- Litchman, E., P. J. Neale (2005). UV effects on photosynthesis, growth and acclimation of an estuarine diatom and cryptomonad. *Marine Ecology-Progress Series* **300**: 53-62.
- Lotze, H. K., B. Worm (2002). Complex interactions of climatic and ecological controls on macroalgal recruitment. *Limnology and Oceanography* **47**: 1734-1741.
- Luo, Y., D. Gerten, G. Le Marie, W. J. Parton, E. Weng, X. Zhou, C. Keough, C. Beier, P. Ciais, W. Cramer, J. S. Dukes, B. Emmett, P. J. Hanson, A. Knapp, S. Linder, D. Nepstad, L. Rustad (2008). Modeled interactive effects of precipitation, temperature, and $[\text{CO}_2]$ on ecosystem carbon and water dynamics in different climatic zones. *Global Change Biology* **14**: 1986-1999.
- Macek, K. J. 1975. Acute toxicity of pesticide mixtures to bluegills. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* **14**: 648–652.
- MacFadyen, E. J., C. E. Williamson, G. Grad, M. Lowery, W. H. Jeffrey, D. L. Mitchell (2004). Molecular response to climate change: temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulex*. *Global Change Biology* **10**: 408-416.
- Madronich, S., R. L. McKenzie, L. O. Björn, M. M. Cadwell (1998). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **46**: 5–19.
- Mahowald, N. M., C. Luo (2003). A less dusty future? *Geophysical Research Letters* **30**: 1903, doi: 10.1029/2003GL017880.

- Maranger, R., P. A. Del Giorgio, D. F. Bird (2002). Accumulation of damaged bacteria and viruses in lake water exposed to solar radiation. *Aquatic Microbial Ecology* **28**: 213-227.
- Marcoval, M. A., V. E. Villafane, E. W. Helbling (2007). Interactive effects of ultraviolet radiation and nutrient addition on growth and photosynthesis performance of four species of marine phytoplankton. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **89**: 78-87.
- Margalef, R. (1969). Counting. In: *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments* (ed. Vollenweider R). I.B.P. No 12. Blackwell. Oxford, pp. 213.
- Margalef, R. (1980). *Perspectives in Ecological Theory*. University Chicago Press.
- Markaki, Z., K. Oikonomou, M. Kocak, G. Kouvarakis, A. Chaniotaki, N. Kubilay, N. Mihalopoulos (2003). Atmospheric deposition of inorganic phosphorus in the Levantine Basin, eastern Mediterranean: Spatial and temporal variability and its role in seawater productivity. *Limnology and Oceanography* **48**: 1557–1568.
- Martínez, R. (1977). Phytoplankton species, biomass, and diversity in lake La Caldera (S. Nevada). *Acta Hydrobiologica* **19**: 95-107.
- Maurin, N., C. Amblard, G. Bourdier (1997). Phytoplanktonic excretion and bacterial reassimilation in an oligomesotrophic lake: molecular weight fractionation. *Journal of Plankton Research* **19**: 1045–1068.
- Medina-Sanchez, J. M. (2002). El eslabón fitoplancton-bacteria en un ecosistema de alta montaña: Estructura, función y regulación. PhD. Thesis. University of Granada: 241 pp.

- Medina-Sanchez, J. M., M. Villar-Argaiz, P. Carrillo (2002). Modulation of the bacterial response to spectral solar radiation by algae and limiting nutrients. *Freshwater Biology* **47**: 2191-2204.
- Medina-Sanchez, J. M., M. Villar-Argaiz, P. Carrillo (2004). Neither with nor without you: A complex algal control on bacterioplankton in a high mountain lake. *Limnology and Oceanography* **49**: 1722-1733.
- Medina-Sánchez, J. M., M. Villar-Argaiz, P. Carrillo (2006). Solar radiation-nutrient interaction enhances the resource and predation algal control on bacterioplankton: A short-term experimental study. *Limnology and Oceanography* **51**: 913-924.
- Medina-Sanchez, J. M., M. Villar-Argaiz, P. Sanchez-Castillo, L. Cruz-Pizarro, P. Carrillo (1999). Structure changes in a planktonic food web: biotic and abiotic controls. *Journal of Limnology* **58**: 213-222.
- Migon, C., V. Sandroni (1999). Phosphorus in rainwater: partitioning inputs and impact on the surface coastal ocean. *Limnology and Oceanography* **44**: 1160-1165.
- Miki, T., S. Jacquet (2008). Complex interactions in the microbial world: underexplored key links between viruses, bacteria and protozoan grazers in aquatic environments. *Aquatic Microbial Ecology* **51**: 195-208.
- Mitchell, D. L., D. Karentz (1993). The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In: *Environmental UV photobiology* (eds. Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W). Plenum Press, New York, N.Y., pp. 345-375.
- Mittelbach, G. G., C. F. Steiner, S. M. Scheiner, K. L. Gross, H. L. Reynolds, R. B. Waide, M. R. Willig, S. I. Dodson, L. Gough (2001). What is the observed relationship between species richness and productivity? *Ecology* **82**: 2381–2396.

- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro, C. Callieri, R. Bertoni, C. P. Queimalinos (2005). Effect of UV-B and different PAR intensities on the primary production of the mixotrophic planktonic ciliate *Stentor araucanus*. *Limnology and Oceanography* **50**: 864-871.
- Moisander, P. H., T. F. Steppe, N. S. Hall, J. Kuparinen, H. W. Paerl (2003). Variability in nitrogen and phosphorus limitation for Baltic Sea phytoplankton during nitrogen-fixing cyanobacterial blooms. *Marine Ecology-Progress Series* **262**: 81-95.
- Molis, M., M. Lenz, M. Wahl (2003). Radiation effects along a UV-B gradient on species composition and diversity of a shallow-water macrobenthic community in the western Baltic. *Marine Ecology-Progress Series* **263**: 113-125.
- Möller, H., W. Geller (1993). Maximum growth rates of aquatic ciliated protozoa: the dependence on body size and temperature reconsidered. *Archiv für Hydrobiologie* **126**: 315-327.
- Morales-Baquero, R., P. Carrillo, I. Reche, P. Sánchez-Castillo (1999). Nitrogen-phosphorus relationship in high mountain lakes: effects of the size of catchment basins. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**: 2227.
- Morales-Baquero, R., E. Pulido-Villena, I. Reche (2006). Atmospheric inputs of phosphorus and nitrogen to the southwest Mediterranean region: Biogeochemical responses of high mountain lakes. *Limnology and Oceanography* **51**: 830-837.
- Mora, C., R. Metzger, A. Rollo, R. Myers (2007). Experimental simulations about the effects of overexploitation and habitat fragmentation on populations facing environmental warming. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**: 1023-1028.

- Morris, D. P., W. M. Lewis (1988). Phytoplankton Nutrient Limitation in Colorado Mountain Lakes. *Freshwater Biology* **20**: 315-327.
- Morris, D. P., H. Zagarese, C. E. Williamson, E. G. Balseiro, B. R. Hargreaves, B. Modenutti, R. Moeller, C. Queimalinos (1995). The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography* **40**: 1381-1391.
- Mostajir, B., S. Demers, S. de Mora, C. Belzile, J. P. Chanut, M. Gosselin, S. Roy, P. Z. Villegas, J. Fauchot, J. Bouchard, D. Bird, P. Monfort, M. Levasseur (1999). Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnology and Oceanography* **44**: 586-596.
- Moulin, C., C. E. Lambert, F. Dulac, U. Dayan (1997). Control of atmospheric export of dust from North Africa by the North Atlantic oscillation. *Nature* **387**: 691-694.
- Muller-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-Niklas, G., A. Heissenberger, S. Puskaric, G. J. Herndl (1995). Ultraviolet-B Radiation and Bacterial Metabolism in Coastal Waters. *Aquatic Microbial Ecology* **9**: 111-116.
- Murphy, J., J. P. Riley (1962). A modified single solution methods for the determination of phosphate in natural waters. *Annalytica Chimica Acta* **27**: 31-36.
- Murray, A. G., G. A. Jackson (1993). Viral Dynamics .2. A Model of the Interaction of Ultraviolet-Light and Mixing Processes on Virus Survival in Seawater. *Marine Ecology-Progress Series* **102**: 105-114.
- Myers, N. (1995). Environmental unknowns. *Science* **269**: 358–360.

- Neale, P. J., W. E. Helbing, H. Zagarese (2003). Modulation of UVR exposure and effects by vertical mixing and advection, p. 107-134. *In* [eds.], W. E. Helbing and H. Zagarese UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry and Springer Verlag.
- Norland, S. (1993). The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Handbook of methods in aquatic microbial ecology (eds. Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ). Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 303-307
- Nouguier, J., B. Mostajir, E. Le Floc'h, F. Vidussi (2007). An automatically operated system for simulating global change temperature and ultraviolet B radiation increases: application to the study of aquatic ecosystem responses in mesocosm experiments. *Limnology and Oceanography-Methods* **5**: 269-279.
- Obernosterer, I., B. Reitner, G. J. Herndl (1999). Contrasting effects of solar radiation on dissolved organic matter and its bioavailability to marine bacterioplankton. *Limnology and Oceanography* **44**: 1645-1654.
- Ochs, C. A., J. J. Cole, G. E. Likens (1995). Population-dynamics of bacterioplankton in an oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research* **17**:365-391.
- Ogbebo, F. E., C. A. Ochs (2008). Bacterioplankton and phytoplankton production rates compared at different levels of solar ultraviolet radiation and limiting nutrient ratios. *Journal of Plankton Research* **30**: 1271–1284.
- Pakker, H., R. S. T. Martins, P. Boelen, A. G. J. Buma, O. Nikaido, A. M. Breeman (2000). Effects of temperature on the photoreactivation of ultraviolet-B-induced DNA damage in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* **36**: 334-341.
- Parker, J. G. (1979). Toxic effects of heavy metals upon cultures of *Uronema marinum* (Ciliophora: Uronematidae). *Marine Biology* **54**: 17-24.

- Patten, N. L., J. G. Mitchell, M. Middelboe, B. D. Eyre, L. Seuront, P. L. Harrison, R. N. Glud (2008). Bacterial and viral dynamics during a mass coral spawning period on the Great Barrier Reef. *Aquatic Microbial Ecology* **50**: 209-220.
- Paul, N. D., D. Gwynn-Jones (2003). Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 48-55.
- Pausz, C., G. J. Herndl (2002). Role of nitrogen versus phosphorus availability on the effect of UV radiation on bacterioplankton and their recovery from previous UV stress. *Aquatic Microbial Ecology* **29**: 89-95.
- Pedrés-Alió, C., J. I. Calderon-Paz, J. M. Gasol (2000). Comparative analysis shows that bacterivory, not viral lysis, controls the abundance of heterotrophic prokaryotic plankton. *FEMS Microbiology Ecology* **32**: 157-165.
- Pennings, S. C. (1996). Testing for synergisms between chemical and mineral defences - a comment. *Ecology* **77**: 1948-1950.
- Perez, G. L., C. P. Queimalinos, B. E. Modenutti (2002). Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *Journal of Plankton Research* **24**: 591-599.
- Perin, S., D. Lean (2004). The effects of ultraviolet-B radiation on freshwater ecosystems of the Arctic: Influence from stratospheric ozone depletion and climate change. *Environmental Reviews* **12**: 1-70.
- Perkins, M. C., H. A. Woods, J. F. Harrison, J. J. Elser (2004). Dietary phosphorus affects the growth of larval *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **55**: 153-168.
- Persaud, A. D., C. E. Williamson (2005). Ultraviolet and temperature effects on planktonic rotifers and crustaceans in northern temperate lakes. *Freshwater Biology* **50**: 467-476.

- Petchey, O.L., A. L. Downing, G. G. Mittelbach, L. Persson, C. F. Steiner, P. H Warren, G. Woodward (2004). Species loss and the structure and functioning of multitrophic aquatic systems. *Oikos* **104**, 467-478.
- Peters, R. H. (1977). The availability of atmospheric orthophosphate. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*. **34**: 918-924.
- Petersen, J. E., C. C. Chen, W. M. Kemp (1997). Scaling aquatic primary productivity: Experiments under nutrient- and light-limited conditions. *Ecology* **78**: 2326-2338.
- Petersen, J. E., W. M. Kemp, R. Bartleson, W. R. Boynton, C.C. Chen, J. C. Cornwell, R. H. Gardner, D. C. Hinkle, E. D. Houde, T. C. Malone, W. P. Mowitt, L. Murray, L. P. Sanford, J. C. Stevenson, K. L. Sundberg, S. E. Suttles (2003). Multiscale experiments in coastal ecology: Improving realism and advancing theory. *BioScience* **53**: 1181-1197.
- Plath, K., M. Boersma (2001). Mineral limitation of zooplankton: stoichiometric constraints and optimal foraging. *Ecology* **82**: 1260-1269.
- Plaxton, W. C., M. C. Carswell (1999). Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. In: *Plant Responses to Environmental Stresses* (ed. Lerner HR), pp. 349–372. Marcel Dekker Inc., New York.
- Pomeroy, L. R. (1974). Oceans food web, a changing paradigm. *Bioscience* **24**: 499-504.
- Porter, K. G., Y. S. Feig (1980). Use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* **25**: 943-948.
- Prospero, J. M., P. J. Lamb (2003). African droughts and dust transport to the Caribbean: Climate change implications. *Science* **302**: 1024-1027.

- Przeslawski, R., A. R. Davis, K. Benkendorff (2005). Synergistic effects associated with climate change and the development of rocky shore molluscs. *Global Change Biology* **11**: 515-522.
- Psenner, R., F. Zapf (1990). High mountain lakes in the Alps: peculiarities and biology. In: *Acidification processes in remote mountain lakes. Air pollution research report 20* (eds. Johannessen M, Mosello R, Barth H). Commission of the European Communities, Brussels, pp. 22-37.
- Psenner, R. (1999). Living in a dusty world: Airborne dust as a key factor for alpine lakes. *Water Air and Soil Pollution* **112**: 217-227.
- Pugnetti, A., R. Bettinetti (1999). Biomass and species structure of the phytoplankton of an high mountain lake (Lake Paione Superiore, Central Alps, Italy). *Journal of Limnology* **58**: 127-130.
- Pulido-Villena, E. (2004). El papel de la deposición atmosférica en la biogeoquímica de lagunas de alta montaña (Sierra Nevada, España). Ph.D. thesis. Universidad de Granada.
- Pulido-Villena, E., I. Reche, R. Morales-Baquero (2006). Significance of atmospheric inputs of calcium over the southwestern Mediterranean region: High mountain lakes as tools for detection. *Global Biogeochemical Cycles* **20**.
- Pulido-Villena, E., I. Reche, R. Morales-Baquero (2008). Evidence of an atmospheric forcing on bacterioplankton and phytoplankton dynamics in a high mountain lake. *Aquatic Sciences* **70**: 1-9.
- Putt, M., D. K. Stoecker (1989). An experimentally determined carbon:volume ratio for marine "oligotrichous" ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnology and Oceanography* **34**: 1097-1103.

- Quinn, G. P., M. J. Keough (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 527.
- Raffaelli, D. (2004). How extinction patterns affect ecosystems. *Science* **306**: 1141-1142.
- Reche, I., P. Sanchezcastillo, P. Carrillo (1994). The principal regulating mechanism on the structure of the phytoplankton community in a high-mountain lake. *Archiv fur Hydrobiologie* **130**: 163-178.
- Reche, I. (1995). Análisis de las conexiones entre el flujo de carbono y el reciclado de nutrientes en un sistema oligotrófico. PhD Thesis, University of Granada, Spain, 186 pp.
- Reche, I., A. Pugnetti, L. Cruz-Pizarro, P. Carrillo (1996). Relationship between bacteria and phytoplankton in a high-mountain lake: Importance of the organic carbon released by pelagic algae for bacterioplankton. *Archiv fur Hydrobiologie* **48**: 31-38.
- Reche, I., P. Carrillo, L. Cruz-Pizarro (1997). Influence of metazooplankton on interactions of bacteria and phytoplankton in an oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research* **19**: 631-646.
- Reche, I., M. L. Pace, J. J. Cole (1998). Interactions of photobleaching and inorganic nutrients in determining bacterial growth on coloured dissolved organic carbon. *Microbial Ecology* **36**: 270-280.
- Reche, I., E. Pulido-Villena, J. M. Conde-Porcuna, P. Carrillo (2001). Photoreactivity of dissolved organic matter from high mountain lakes of Sierra Nevada (Spain). *Arctic, Antarctic and Alpine Research* **33**: 426-434.
- Redfield, A. C. (1958). The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist* **46**: 205-221.

- Relyea, R., J. Hoverman (2006). Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* **9**: 1157-1171.
- Reynolds, C. S. (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge, 384 pp.
- Ridame, C., C. Guieu (2002). Saharan input of phosphate to the oligotrophic water of the open western Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* **47**: 856-869.
- Riedel, G. F., J. G. Sanders, D. L. Breitburg (2003). Seasonal variability in response of estuarine phytoplankton communities to stress: Linkages between toxic trace elements and nutrient enrichment. *Estuaries* **26**: 323-338.
- Robarts, R. D., R. J. Wicks (1989). [Methyl-³H]thymidine macromolecular incorporation and lipid labeling: Their significance to DNA labeling during measurements of aquatic bacterial growth rate. *Limnology and Oceanography* **34**: 213-222.
- Roberts, E. C., J. C. Priscu, J. Laybourn-Parry (2004). Microplankton dynamics in a perennially ice-covered Antarctic lake - Lake Hoare. *Freshwater Biology* **49**: 853-869.
- Rocha, O., A. Duncan (1985). The Relationship Between Cell Carbon and Cell-Volume in Fresh-Water Algal Species Used in Zooplanktonic Studies. *Journal of Plankton Research* **7**: 279-294.
- Romo, S., M. J. Villena (2005). Phytoplankton strategies and diversity under different nutrient levels and planktivorous fish densities in a shallow Mediterranean lake. *Journal of Plankton Research* **27**: 1273-1286.
- Roos, J. C., W. F. Vincent (1998). Temperature dependence of UV radiation effects on Antarctic cyanobacteria. *Journal of Phycology* **34**: 118-125.

- Rott, E. (1981). Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* **43**: 34-62.
- Sala, O. E., F. S. Chapin, J. J. Armesto, E. Berlow, J. Bloomfield, R. Dirzo, E. Huber-Sanwald, L. F. Huenneke, R. B. Jackson, A. Kinzig, R. Leemans, D. M. Lodge, H. A. Mooney, M. Oesterheld, N. L. Poff, M. T. Sykes, B. H. Walker, M. Walker, D. H. Wall (2000). Biodiversity - global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* **287**: 1770-1774.
- Salonen, K., S. Jokinen (1988). Flagellate Grazing on Bacteria in A Small Dystrophic Lake. *Hydrobiologia* **161**: 203-209.
- Samuelsson, K., J. Berglund, P. Haecky, A. Andersson (2002). Structural changes in an aquatic microbial food web caused by inorganic nutrient addition. *Aquatic Microbial Ecology* **29**: 29-38.
- Sanchez-Castillo, P., L. Cruz-Pizarro, P. Carrillo (1989). Caracterización del fitoplancton de las lagunas de alta montaña de Sierra Nevada (Granada, Spain) en relación con las características fisico-químicas del medio. *Limnetica* **5**: 37-50.
- Sanders, R. W., A. L. Macaluso, T. J. Sardina, D. L. Mitchell (2005). Photoreactivation in two freshwater ciliates: differential responses to variations in UV-B flux and temperature. *Aquatic Microbial Ecology* **40**: 283-292.
- Sävström, C., I. Pearce, A. T. Davidson, P. Rosén, J. Laybourn-Parry (2008). Influence of environmental conditions, bacterial activity and viability on the viral component in 10 Antarctic lakes. *FEMS Microbiology Ecology* **63**: 12-22.
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science* **195**: 260-262.

- Schindler, D. W. (2001). The cumulative effects of climate warming and other human stresses on Canadian freshwaters in the new millennium. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 18-29.
- Servais, P., J. Martínez, G. Billen, J. Vives-Rego (1987). Determining [³H]thymidine incorporation into bacterioplankton DNA: Improvement of the method by DNase treatment. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1977-1979.
- Shelly, K., P. Heraud, J. Beardall (2002). Nitrogen limitation in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) leads to increased susceptibility to damage by Ultraviolet-B radiation but also increased repair capacity. *Journal of Phycology* **38**: 713–720.
- Shelly, K., S. Roberts, P. Heraud, J. Beardall (2005). Interactions between UV-B exposure and phosphorus nutrition. I. Effects on growth, phosphate uptake, and chlorophyll fluorescence. *Journal of Phycology* **41**: 1204-1211.
- Sherr, E. B., B. F. Sherr (1996). Temporal offset in oceanic production and respiration processes implied by seasonal changes in atmospheric oxygen: the role of heterotrophic microbes. *Aquatic Microbial Ecology* **11**: 91-100.
- Shindell, D. T., D. Rind, P. Lonergan (1998). Increased polar stratospheric ozone losses and delayed eventual recovery owing to increasing greenhouse-gas concentrations. *Nature* **392**: 589-592.
- Sobrino, C., P. J. Neale (2007). Short-term and long-term effects of temperature on photosynthesis in the diatom *Thalassiosira pseudonana* under UVR exposures. *Journal of Phycology* **43**: 426-436.
- Sommaruga, R. (2001). The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **62**: 35-42.
- Sommaruga, R., I. Obernosterer, G. J. Herndl, R. Psenner (1997). Inhibitory effect of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and

marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4178-4184.

Sommaruga, R., R. Psenner (2001). High-mountain lakes and streams: Indicators of a changing world. *Arctic Antarctic and Alpine Research* **33**: 383-384.

Sommaruga, R., B. Sattler, A. Oberleiter, A. Wille, S. Wogarth-Sommaruga, R. Psenner, M. Felip, L. Camarero, S. Pina, R. Girones, J. Catalán (1999). An in situ enclosure experiment to test the solar UVB impact on plankton in a high-altitude mountain lake. II. Effects on the microbial food web. *Journal of Plankton Research* **21**: 859-876.

Sommer, U. (1985). Comparison between steady-state and non-steady state competition - Experiments with natural phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **30**: 335-346.

Srivastava, D. S., M. Vellend (2005). Biodiversity-ecosystem function research: Is it relevant to conservation? *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **36**: 267-294.

StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.

Steemann-Nielsen, E. (1952). The use of radioactive carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* **18**: 117-140.

Steffen, W., A. Sanderson, P. Tyson, J. Jaeger, P. Matson, B. Moore, F. Oldfield, K. Richardson, H. Schellnhuber, B. Turner, R. Wasson, W. Steffen, A. Sanderson, P. Tyson, J. Jaeger, P. Matson, B. Moore, F. Oldfield, K. Richardson, H. Schellnhuber, B. Turner, R. Wasson (2004). *Global change and the Earth system: a planet under pressure*. 1st edn. Springer, New York, pp. 332.

- Sterner, R. W., J. J. Elser, E. J. Fee, S. J. Guildford, T. H. Chrzanowski (1997). The light:nutrient ratio in lakes: The balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *American Naturalist* **150**: 663-684.
- Sterner, R. W., J. J. Elser (eds.) (2002). *Ecological Stoichiometry*. Princeton University Press, Princeton.
- Straškrabová, V., C. Callieri, J. Fott (1999a). Pelagic food webs in mountain lakes-Mountain Lakes Research Program. *Journal of Limnology* **58**: 77-222.
- Straškrabová, V., C. Callieri, P. Carrillo, L. Cruz-Pizarro, J. Fott, P. Hartman, M. Macek, J. M. Medina-Sanchez, J. Nedoma, K. Simek (1999b). Investigations on pelagic food webs in mountain lakes - aims and methods. *Journal of Limnology* **58**: 77-87.
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 801-812.
- Tadonleke, R. D., D. Planas, A. Lucotte (2005). Microbial food webs in boreal humic lakes and reservoirs: Ciliates as a major factor related to the dynamics of the most active bacteria. *Microbial Ecology* **49**: 325-341.
- Talbot, R. W., R. C. Harriss, E. V. Browell, G. L. Gregory, D. I. Sebacher, S. M. Beck (1986). Distribution and geochemistry of aerosols in the tropical North-Atlantic troposphere - Relationship to saharan dust. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **91**: 5173-5182.
- Tank, S. E., D. W. Schindler, M. T. Arts (2003). Direct and indirect effects of UV radiation on benthic communities: epilithic food quality and invertebrate growth in four montane lakes. *Oikos* **103**: 651-667.
- Tank, S. E., M. A. Xenopoulos, L. L. Hendzel (2005). Effect of ultraviolet radiation on alkaline phosphatase activity and planktonic phosphorus acquisition in Canadian boreal shield lakes. *Limnology and Oceanography* **50**: 1345-1351.

- Tarapchak, S. J., R. A. Moll (1990). Phosphorus sources for phytoplankton and bacteria in Lake Michigan. *Journal of Plankton Research* **12**: 743-758.
- Teira, E., M. J. Pazo, P. Serret, E. Fernández (2001). Dissolved organic carbon production by microbial populations in the Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography* **46**: 1370-1377.
- Thomas, W. H., B. C. Cho, F. Azam (1991). Phytoplankton and bacterial production and biomass in sub-Alpine Eastern Brook Lake, Sierra-Nevada, California .1. Seasonal interrelationships between the 2 biotic groups. *Arctic and Alpine Research* **23**: 287-295.
- Tilman, D. (1986). Nitrogen-limited growth in plants from different successional stages. *Ecology* **67**: 555-563.
- Tilman, D., J. A. Downing (1994). Biodiversity and stability in grasslands. *Nature* **367**: 363-365.
- Torreton, J. P., M. Bouvy (1991). Estimating bacterial DNA synthesis from ³H-thymidine incorporation: Discrepancies among macromolecular extraction procedures. *Limnology and Oceanography* **36**: 299-306.
- Urabe, J., M. Kyle, W. Makino, T. Yoshida, T. Andersen, J. J. Elser (2002). Reduced light increases herbivore production due to stoichiometric effects of light/nutrient balance. *Ecology* **83**: 619-627.
- Uthermöl, H. (1958). Zur weinklommung der quantitative phytoplankton methidik. *Mitt International Verein Limnologie* **9**: 1-38.
- Vadstein, O., B. O. Harkjerr, A. Jensen, Y. Olsen, H. Reinertsen (1989). Cycling of organic carbon in the photic zone of a eutrophic lake with special reference to the heterotrophic bacteria. *Limnology and Oceanography* **34**: 840-855.

- van Donk, E., B. A. Faafeng, H. J. De Lange, D. O. Hessen (2001). Differential sensitivity to natural ultraviolet radiation among phytoplankton species in Arctic lakes (Spitsbergen, Norway). *Plant Ecology* **154**: 247-259.
- Ventura, M., L. Liboriussen, T. Lauridsen, M. Sondergaard, M. Sondergaard, E. Jeppesen (2008). Effects of increased temperature and nutrient enrichment on the stoichiometry of primary producers and consumers in temperate shallow lakes. *Freshwater Biology* **53**: 1434-1452.
- Vielma, J., J. Koskela, K. Ruohonen (2002). Growth, bone mineralization, and heat and low oxygen tolerance in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) fed with graded levels of phosphorus. *Aquaculture* **212**: 321-333.
- Villafañe, V. E. (2004). Ultraviolet radiation and primary productivity in temperate aquatic environments of Patagonia (Argentina). Ph.D. dissertation. Groningen. 134 pp.
- Villafañe, V. E., K. S. Gao, P. Li, G. Li, E. W. Helbling (2007). Vertical mixing within the epilimnion modulates UVR-induced photoinhibition in tropical freshwater phytoplankton from southern China. *Freshwater Biology* **52**: 1260-1270.
- Villar-Argaiz, M. (1999). Redes tróficas pelágicas: una perspectiva estequiométrica. PhD Thesis, University of Granada, Spain, 242 pp.
- Villar-Argaiz, M., J. M. Medina-Sanchez, F. J. Bullejos, J. A. Delgado-Molina, P. Carrillo (2008). Is biochemical resource quality for herbivorous consumers enhanced by the manipulation of light and nutrient regimes? *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **30**: 577-580.
- Villar-Argaiz, M., J. M. Medina-Sanchez, P. Carrillo (2002). Microbial plankton response to contrasting climatic conditions: insights from community structure, productivity and fraction stoichiometry. *Aquatic Microbial Ecology* **29**: 253-266.

- Villar-Argaiz, M., J. M. Medina-Sanchez, L. Cruz-Pizarro, P. Carrillo (2001). Inter- and intra-annual variability in the phytoplankton community of a high mountain lake: the influence of external (atmospheric) and internal (recycled) sources of phosphorus. *Freshwater Biology* **46**: 1017-1034.
- Villar-Argaiz, M., J. M. Medina-Sánchez, F. J. Bullejos, J. A. Delgado-Molina, P. Carrillo (2009). UV radiation and phosphorus interact to influence the biochemical composition of phytoplankton. *Freshwater Biology*, doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02170.x
- Vincent, W. F., S. Roy (1993). Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: Damage, protection, and recovery. *Environmental Reviews* **1**: 1-12.
- Vinebrooke, R. D., K. L. Cottingham, J. Norberg, M. Scheffer, S. I. Dodson, S. C. Maberly, U. Sommer (2004). Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* **104**: 451-457.
- Vinebrooke, R. D., P. R. Leavitt (1998). Direct and interactive effects of allochthonous dissolved organic matter, inorganic nutrients, and ultraviolet radiation on an alpine littoral food web. *Limnology and Oceanography* **43**: 1065-1081.
- Vinebrooke, R. D., P. R. Leavitt (1999). Differential responses of littoral communities to ultraviolet radiation in an alpine lake. *Ecology* **80**: 223-237.
- Vinebrooke, R. D., P. R. Leavitt (2005). Mountain lakes as indicators of the cumulative impacts of ultraviolet radiation and other environmental stressors. In: *Global Change and Mountain Regions – A State of Knowledge Overview* (eds. Huber UM, Bugmann KM, Reasoner MA), pp. 497–509. Springer-Verlag.

- Vinebrooke, R. D., D. W. Schindler, D. L. Findlay, M. A. Turner, M. Paterson, K. H. Milis (2003). Trophic dependence of ecosystem resistance and species compensation in experimentally acidified lake 302S (Canada). *Ecosystems* **6**: 101-113.
- Vuorio, K., A. Lagus, J. M. Lehtimäki, J. Suomela, H. Helminen (2005). Phytoplankton community responses to nutrient and iron enrichment under different nitrogen to phosphorus ratios in the northern Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **322**: 39-52.
- Watkins, E. M., D. W. Schindler, M. A. Turner, D. Findlay (2001). Effects of solar ultraviolet radiation on epilithic metabolism, and nutrient and community composition in a clear-water boreal lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 2059-2070.
- Weinbauer, M. G., S. W. Wilhelm, C. A. Suttle, D. R. Garza (1997). Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine virus communities. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2200-2205.
- Wetzel, R. G., P. G. Hatcher, T. S. Bianchi (1995). Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Limnology and Oceanography* **40**: 1369-1380.
- Wickham, S., M. Carstens (1998). Effects of ultraviolet-B radiation on two arctic microbial food webs. *Aquatic Microbial Ecology* **16**: 163-171.
- Wilhelm, S. W., J. M. DeBruyn, O. Gillor, M. R. Twiss, K. Livingston, R. A. Bourbonniere, L. D. Pickell, C. G. Trick, A. L. Dean, R. M. L. McKay (2003). Effect of phosphorus amendments on present day plankton communities in pelagic Lake Erie. *Aquatic Microbial Ecology* **32**: 275-285.
- Willen, E. (1976). A simplified method of phytoplankton counting. *British Phycological Journal* **11**: 265-278.

- Williamson, C. E., G. Grad, H. J. De Lange, S. Gilroy, D. M. Karapelou (2002). Temperature-dependent ultraviolet responses in zooplankton: Implications of climate change. *Limnology and Oceanography* **47**: 1844-1848.
- Winder, M., D. A. Hunter (2008). Temporal organization of phytoplankton communities linked to physical forcing. *Oecologia* **156**: 179-192.
- Wommack, K. E., R. R. Colwell (2000). Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 69-+.
- Wood, A. M., L. M. van Valen (1990). Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. *Marine Microbial Food Webs* **4**: 103-116.
- Woodward, S., D. L. Roberts, R. A. Betts (2005). A simulation of the effect of climate change-induced desertification on mineral dust aerosol. *Geophysical Research Letters* **32**.
- Xenopoulos, M. A., P. C. Frost (2003). UV radiation, phosphorus, and their combined effects on the taxonomic composition of phytoplankton in a boreal lake. *Journal of Phycology* **39**: 291-302.
- Xenopoulos, M. A., P. C. Frost, J. J. Elser (2002). Joint effects of UV radiation and phosphorus supply on algal growth rate and elemental composition. *Ecology* **83**: 423-435.
- Xenopoulos, M. A., Y. T. Prairie, D. F. Bird (2000). Influence of ultraviolet-B radiation, stratospheric ozone variability, and thermal stratification on the phytoplankton biomass dynamics in a mesohumic lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**: 600-609.
- Zavaleta, E. S., M. R. Shaw, N. R. Chiariello, H. A. Mooney, C. B. Field (2003). Additive effects of simulated climate changes, elevated CO₂, and nitrogen deposition on grassland diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 7650-7654.

Bibliografía

Zubkov, M. V., G. A. Tarran (2008). High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature* **455**: 224–226.

Zudaire, L., S. Roy (2001). Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **62**: 26-34.

ABREVIATURAS

AT	Actividad total
CARB	Requerimientos bacterianos de carbono de origen algal
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
%CUEb	Eficiencia de uso de carbono fotosintético por las bacterias
DIN	Dissolved inorganic nitrogen - Nitrógeno inorgánico disuelto
DOC	Carbono orgánico disuelto < 0.2 μm
DP	Periodo de disponibilidad de P
EOC	Excreción de carbono orgánico
%EOC	% de excreción de carbono orgánico con respecto al producido
HNF	Nanoflagelados heterotróficos
IT	Tasa de incorporación de timidina
Kd	Coefficiente de atenuación vertical de la radiación incidente
NDT	Nitrógeno disuelto total
No-DP	Periodo de no disponibilidad de P
No-PA	No P-availability period
NT	Nitrógeno total
PA	P-availability period
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PB	Producción bacteriana
PDT	Fósforo disuelto total
PE	P-exhausted period
%PEA	Eficiencia de asimilación de C fotosintético por las bacterias
Pflux	Tasa de incorporación de P por unidad de carbono
POC₁	Carbono orgánico particulado $\geq 2 \mu\text{m}$
POC₂	Carbono orgánico particulado 0,2-1,0 μm
PP	Producción primaria
PR	P-repleted period
PT	Fósforo total
r	Tasa de crecimiento
SRP	Fósforo reactivo soluble
TP	Total phosphorus
TOC	Carbono orgánico total
TN	Total nitrogen
UVA	Radiación ultravioleta A
UVB	Radiación ultravioleta B
UVR	Radiación ultravioleta