

BIOLOGICAS

482

T. D.

Universitat de València

Facultat de Ciències Biològiques



IECOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS
FOTOSINTÉTICOS EN LAS AGUAS
MICROAERÓFILAS Y ANÓXICAS DE LA
LAGUNA DE ARCAS

TESIS DOCTORAL

ANTONIO CAMACHO GONZÁLEZ

1997

UMI Number: U607685

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607685

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Biologicas

Nº Registre 10554

DATA 25-9-97

SIGNATURA T. D. 482

Nº LIBRE: j 20889203

Memoria presentada para optar al Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas por el
licenciado
Antonio Camacho González

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Camacho González', enclosed within a large, loopy oval flourish.

Fdo. Antonio Camacho González

Tesis dirigida por el
Dr. Eduardo Vicente Pedrós
Profesor Titular del Departamento de
Microbiología y Ecología

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Eduardo Vicente Pedrós', written in a cursive style.

Fdo. Prof. Dr. Eduardo Vicente Pedrós

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia todo el apoyo que de ellos he obtenido, no sólo en este trabajo sino a lo largo de toda mi carrera profesional, y especialmente a Lola y Anna la paciencia en estos últimos años.

Al Dr. Eduardo Vicente, amigo y director.

A la Dra. María Rosa Miracle, directora de nuestro grupo de investigación quiero agradecerle no solo su apoyo científico sino, especialmente, el personal.

Quiero agradecer el respaldo sin excepción de todos los compañeros de las Unidades de Ecología y Microbiología de nuestra Facultad, dentro del Departamento de Microbiología y Ecología, dirigido durante la mayoría de los años en los que se hizo este trabajo por el Dr. Federico Uruburu, y especialmente a todos los de la línea de investigación de Limnología. Toñi ha sido compañera y amiga en las alegrías y fatigas desde nuestra entrada, largo tiempo atrás, en el mundo de la investigación científica. Helena, al igual que una variedad de estudiantes de ecología microbiana fueron la ayuda inestimable en muchas campañas de muestreo que de otra manera hubieran sido solitarias. Muchos estudiantes colaboradores han pasado a lo largo de estos años por nuestro grupo, pero quiero destacar la contribución de Juanjo, Isabel, Mari Loli y Dani a este trabajo. Además Javi, Maria Jose, Juan Miguel y Ángeles siempre encontraron un hueco en sus tesis para echar una mano cuando hacía falta, además de obsequiarme con su sincera amistad. Josep Ramón, que llegó a última hora, no dudo en dejar sus obligaciones para hacer “lo que hiciera falta”, igual que Eugenio, que entiende mejor que nadie las esclavitudes de las Tesis.

Mis amigos “de toda la vida” han sido unos de los grandes damnificados de esta tesis, ya que los tengo totalmente abandonados, aunque yo soy el que más pierde.

También quiero agradecer a los Doctores Jacques Capblanc, Lucas Stal, Dick Castenholz y Ferran García su valiosa ayuda científica prestada durante las estancias en sus respectivos laboratorios, así como a los investigadores de los grupos de Ecología Microbiana de Barcelona y Gerona, especialmente a los Doctores Carles Pedrós, Carles Abellà, Jesus Garcia Gil y Xavi Vila su contribución a esta tesis en forma de interesantes comentarios realizados a lo largo de estos años de trabajo. Los Doctores Bland Finlay y Ken Clarke, de la Freshwater Biological Association también aportaron su granito de arena a este trabajo.

Al Ministerio de Educación y Ciencia debo agradecerle el soporte financiero, tanto personal por medio de una beca de F.P.I: como a los proyectos de investigación en los que se enmarcaba este trabajo, a los que también se añadió la

importante contribución de la Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a todos los que de alguna manera han contribuido a este trabajo y que no han sido citados explícitamente.

INDICE

RESUMEN.-	R-1
CAPÍTULO 1.-INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1-2
CAPÍTULO 2.- CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO Y EL TIPO DE MUESTREO.	
2.1.-Introducción	2-2
2.2.-Características de la zona de estudio.....	2-2
2.2.1.Geología	2-6
2.2.2.Morfología.....	2-6
2.2.3.Vegetación y fauna vertebrada	2-8
2.3.- Características climáticas y meteorología de la zona de estudio.....	2-9
2.3.1.Temperatura	2-9
2.3.2.Pluviosidad.....	2-13
2.4.- La toma de muestras en la laguna	2-15
CAPITULO 3.- CARACTERIZACIÓN LIMNOLÓGICA DE LA LAGUNA DE ARCAS.	
3.1.- Introducción	3-2
3.2.- Material y métodos	3-3
3.2.1.Parámetros limnológicos medidos <i>in situ</i>	3-3
3.2.2.Parámetros determinados en el laboratorio	3-5
3.3.- Resultados y discusión	3-20
3.3.1.Estratificación y mezcla térmica	3-20
3.3.2.Otros parámetros: oxígeno, sulfhídrico, ph y Eh.....	3-23
3.3.3.Mineralización	3-33
3.3.4.Nutrientes inorgánicos	3-37
3.3.5.Resumen de las características limnológicas de la laguna.....	3-46

CAPITULO 4.- DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS.

4.1.- Introducción	4-2
4.2.- Material y métodos	4-3
4.2.1. Aislamiento cultivo e identificación de los procariontas fotosintéticos	4-3
4.2.2. Recuentos de microorganismos	4-8
4.2.3. Estimación de parámetros relacionados con la dinámica poblacional.....	4-11
4.2.4. Microscopía electrónica	4-14
4.2.5. Análisis estadístico de los datos.....	4-15
4.3.- Resultados y discusión	4-15
4.3.1. Descripción de las principales especies de microorganismos fotosintéticos.....	4-15
4.3.2. Dinámica poblacional de los principales microorganismos fotosintéticos de las capas microaerobias y anóxicas.....	4-23
4.3.3. Otros organismos de importancia en la laguna: fitoplancton, zooplancton y protozoos ciliados.....	4-55
4.3.4. Análisis estadístico de los parámetros físico-químicos y biológicos.....	4-63

CAPITULO 5.- LUZ, PIGMENTOS Y PRODUCCIÓN PRIMARIA

5.1.- Introducción	5-2
5.2.- Material y métodos.....	5-3
5.2.1. Medida de la radiación luminosa	5-3
5.2.2. Métodos de extracción y evaluación de pigmentos fotosintéticos	5-4
5.2.3. Estima de la producción primaria	5-8
5.3.- Resultados	5-15
5.3.1. Radiación luminosa	5-15
5.3.2. Pigmentos fotosintéticos	5-18
5.3.3. Estima de la producción primaria	5-26
5.4.- Discusión	5-37
5.4.1. Penetración de la luz y pigmentos fotosintéticos.....	5-37
5.4.2. Fotoasimilación de carbono en el perfil vertical de la Laguna de Arcas.....	5-41

5.4.3.Fotoasimilación integrada en las diferentes capas de la laguna e importancia de la fotosíntesis en la quimioclina.....	5-45
5.4.4.La intensidad y calidad de luz como factor limitante de la fotosíntesis.....	5-51
5.4.5.Asimilación oscura	5-53

CAPITULO 6.- ECOFISIOLOGÍA DE LAS CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS DE LA LAGUNA DE ARCAS.

6.1.- Introducción	6-2
6.2.- Material y métodos	6-3
6.2.1.Movilidad y flotación de <i>Oscillatoria ornata</i>	6-3
6.2.2.Fotosíntesis en presencia de sulfhídrico	6-4
6.3.- Resultados	6-8
6.3.1.Movilidad y flotación de <i>Oscillatoria ornata</i>	6-8
6.3.2.Fotosíntesis de las cianobacterias filamentosas de la Laguna de Arcas en presencia de sulfhídrico	6-10
6.4.- Discusión	6-13
6.4.1.Adaptaciones de las cianobacterias filamentosas a las condiciones de la quimioclina de la Laguna de Arcas	6-13
6.4.2.Modelo conceptual de funcionamiento de la población de <i>Oscillatoria ornata</i> en la laguna de Arcas	6-20

CAPITULO 7.-LA BACTERIA EPIBIONTE DE *Chromatium weissei*

7.1.- Introducción.....	7-2
7.2.- Material y métodos.....	7-3
7.3.- Resultados y discusión.....	7-5
CONCLUSIONES.....	C-2
BIBLIOGRAFÍA.....	B-2
ANEXO DE RESULTADOS.....	
ADDENDUM.....	

INDEX

ABSTRACT.-	R-1
CHAPTER 1.- INTRODUCTION.....	1-2
CHAPTER 2.- STUDY SITE AND SAMPLING.	
2.1.-Introduction.-.....	2-2
2.2.- Study site.-.....	2-2
2.2.1.Geology.....	2-6
2.2.2.Morfology.....	2-6
2.2.3.Vegetation and vertebrate fauna.....	2-8
2.3.- Climatic features and meteorology in the zone during the study.....	2-9
2.3.1.Temperature.....	2-9
2.3.2.Rainfall.....	2-13
2.4.- Sampling in Lake Arcas.....	2-15
CHAPTER 3.- LIMNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF LAKE ARCAS	
3.1.- Introduction	3-3
3.2.- Material and methods.....	3-3
3.2.1. Limnological parameters measured <i>in situ</i>	3-3
3.2.2.Parameters determined in the laboratory....	3-5
3.3.- Results and discussion.....	3-20
3.3.1.Stratification and thermal mixing.....	3-20
3.3.2.Other parameters: oxygen, sulfide, pH and Eh	3-23
3.3.3.Mineralization	3-33
3.3.4.Inorganic nutrients.....	3-37
3.3.5.Remarks on the limnological characteristics of the lake.....	3-46
CHAPTER 4.- DESCRIPTION AND POPULATION DYNAMICS OF THE PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS.	
4.1.- Introduction.....	4-2
4.2.- Material and methods.....	4-3
4.2.1.Isolation, culture and identification of the photrophic microorganisms.....	4-3

4.2.2. Cell counts.....	4-8
4.2.3. Parameters related to population dynamics.....	4-11
4.2.4. Electron microscopy.....	4-14
4.2.5. Statistical analyses.....	4-15
4.3.- Results and discussion.....	4-15
4.3.1. Description of the main species of phototrophic microorganisms.....	4-15
4.3.2. Population dynamics of the main phototrophic microorganisms living in microaerobic and anoxic waters.....	4-23
4.3.3. Other important microorganisms in Lake Arcas: phytoplankton, zooplankton and ciliated protozoa.....	4-55
4.3.4. Statistical analysis (PCA).....	4-63

CHAPTER 5.- LIGHT, PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS AND PRIMARY PRODUCTIVITY

5.1.- Introduction	5-2
5.2.- Material and methods.....	5-3
5.2.1. Measurement of light penetration.....	5-3
5.2.2. Methods for the extraction and quantification of photosynthetic pigments.....	5-4
5.2.3. Measurement of inorganic carbon assimilation.....	5-8
5.3.- Results	5-15
5.3.1. Light irradiance	5-15
5.3.2. Photosynthetic pigments	5-18
5.3.3. Inorganic carbon assimilation.....	5-26
5.4.- Discussion.....	5-37
5.4.1. Light penetration and photosynthetic pigments.....	5-37
5.4.2. Carbon photoassimilation in the vertical profile of Lake Arcas.....	5-41
5.4.3. Integrated photoassimilation in the different water layers and importance of the photosynthesis at the chemocline level.....	5-45
5.4.4. Light intensity and quality as the limiting factor for photosynthesis.....	5-51
5.4.5. Dark inorganic carbon assimilation.....	5-53

CHAPTER 6.- PHYSIOLOGICAL ECOLOGY OF THE FILAMENTOUS
CYANOBACTERIA FROM LAKE ARCAS.

6.1.- Introduction.....	6-2
6.2.- Material and methods.....	6-3
6.2.1.Mobility and buoyancy in <i>Oscillatoria ornata</i>	6-3
6.2.2.Photosynthesis under sulfide.....	6-4
6.3.- Results.....	6-8
6.3.1.Mobility and buoyancy in <i>Oscillatoria ornata</i>	6-8
6.3.2.Photosynthesis under sulfide of the filamentous cyanobacteria isolated from Lake Arcas.....	6-10
6.4.- Discussion	6-13
6.4.1.Adaptations of the filamentous cyanobacteria to the conditions of the chemocline of Lake Arcas.....	6-13
6.4.2.Conceptual model of functioning of the <i>Oscillatoria ornata</i> population in Lake Arcas.....	6-20

CHAPTER 7.- THE EPIBIONTIC BACTERIA OF *Chromatium weissei*

7.1.- Introduction.....	7-2
7.2.- Material and methods.....	7-3
7.3.- Results and discussion.....	7-5
CONCLUDING REMARKS.....	C-2
REFERENCES.....	B-2
DATA APPENDIX.....	
ADDENDUM.....	

RESUMEN

RESUMEN

La presencia de poblaciones de microorganismos fotosintéticos en las interfases óxicas-anóxicas de los lagos es un hecho conocido desde hace bastante tiempo. En este trabajo hemos estudiado este tipo de poblaciones que se establecen en la quimioclina de la laguna de Arcas, una laguna cárstica sulfatada de baja relación superficie-volumen (profundidad relativa 31 %), cuyas aguas adoptan una estructura vertical estratificada durante los meses estivales. Esta laguna presenta aguas bastante mineralizadas (conductividad 2,1-3,3 mS/cm), consecuencia de la disolución de los yesos del sustrato, con altas concentraciones de sulfato y calcio en sus aguas.

El proceso de estratificación térmica determina la formación de un hipolimnion anóxico rico en sulfhídrico, en el cual se produce la acumulación de nutrientes inorgánicos (N amoniacal, P, Si) sin duda importantes para los microorganismos fotosintéticos. De ellos, el fósforo resulta especialmente escaso en las aguas óxicas, siendo el nutriente limitante para la productividad primaria en esta zona.

En la quimioclina se establecen densas poblaciones de microorganismos fotosintéticos, entre las que son especialmente abundantes *Cryptomonas* spp. (máximos de cerca de 40000 ind·ml⁻¹), *Oscillatoria ornata* (máximos próximos a 1000 fil ml⁻¹) y *Chromatium weissii* (hasta 2 x 10⁶ cel·ml⁻¹). Las poblaciones aumentan su tamaño durante el periodo de estratificación hasta final del mes de agosto, momento a partir del cual inician un lento declive que se acentúa con la proximidad de la mezcla otoñal, aunque *O. ornata* no presenta tal descenso. Además de *C. weissii* también se encuentran otras especies de bacterias fotosintéticas del azufre pero con mucha menor contribución a la comunidad fotosintética. Resulta reseñable la presencia de ciliados anaerobios, algunos de los cuales se alimentan de *Cryptomonas* spp, así como de rotíferos en las aguas microaerófilas de la laguna. Del análisis estadístico de los parámetros físico-químicos y biológicos estudiados se desprende como factor explicativo principal de la variación común (58 %) la diferencia debida al estado de oxidación o reducción del agua en el perfil vertical.

La penetración luminosa en las aguas de la laguna se ve condicionada por la presencia de organismos fotosintéticos en ella. Durante el periodo de mezcla la luz resulta detectable hasta el fondo de la laguna, mientras que durante la estratificación, las densas poblaciones de microorganismos fotosintéticos situadas en la quimioclina absorben prácticamente toda la luz que les llega. Los fotones que llegan a la quimioclina son mayoritariamente de una longitud de onda comprendida entre 500 y 600 nm, debido a la absorción selectiva en capas superiores por el agua, materia en suspensión y poblaciones fitoplanctónicas. Para poder captar eficientemente la luz en las profundidades en las que se sitúan, estos microorganismos poseen pigmentos accesorios, okenona en el caso de las Cromatiaceas y ficoeritrina en el de *Oscillatoria ornata* (y probablemente también en el de *Cryptomonas* spp.). En cuanto a los pigmentos clorofílicos, la

clorofila *a* alcanza máximos superiores a $150 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en la quimioclina, entre 20 y $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en el resto del hipolimnion y entre 2 y $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en las aguas óxicas de la laguna. La bacterioclorofila *a* en la quimioclina supera los $700 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras en el resto del hipolimnion se encuentra entre 50 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

La producción fotosintética en la laguna, que en las aguas epilimnéticas presenta una limitación debida a la carencia de fósforo, tiene una marcada limitación por la luz disponible en el caso de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos de la quimioclina. La cantidad de carbono fijado por unidad de volumen de agua en la quimioclina es mucho más elevada (hasta cerca de $200 \text{mg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$) que en las aguas epilimnéticas, debido a las elevadas densidades poblacionales de microorganismos fotosintéticos allí encontradas, siendo de las más altas medidas hasta la fecha en este tipo de poblaciones en lagos estratificados templados no eutróficos. Sin embargo estas altas tasas solo se encuentran en un rango de profundidades muy pequeño, e implican a un pequeño volumen de agua, por lo que a pesar de las bajas tasas encontradas en el epilimnion, este contribuye a un 82-83 % de la fotoasimilación registrada durante el periodo estival, siendo el 16-17 % restante lo atribuible a la fotoasimilación en la quimioclina, de la que un 30-35 % era oxigénica en presencia de sulfhídrico, y el resto anoxigénica debida a *Chromatium weissei*.

Tres fueron las cepas de cianobacterias filamentosas aisladas de las aguas de la laguna. *Oscillatoria ornata*, cuyo PSII resulta resistente al sulfhídrico, y *Pseudanabaena* sp., presentaban la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica, especialmente esta segunda, mientras que la actividad fotosintética de *Oscillatoria tenuis* resulta muy inhibida por el sulfhídrico. Es notorio que sólo *O. ornata* desarrollaba densas poblaciones en aguas ricas en sulfhídrico, dado que posee ficoeritrina, pigmento que le permite captar la luz que le llega, aunque canalizándola hacia el PSII, que puede seguir funcionando por su elevada resistencia al sulfhídrico. En base a los resultados de este trabajo se establece un modelo que implica una circulación de los filamentos de *O. ornata* a través de las aguas anóxicas tras cargarse de sustancias de reserva en la capa fotosintéticamente activa, a la que acaban regresando por flotación tras un consumo fermentativo de estas sustancias en el hipolimnion anóxico carente de luz y un aumento del tamaño de sus vacuolas gaseosas.

Chromatium weissei, el microorganismo que forma las poblaciones más densas encontradas en la laguna de Arcas, presenta con frecuencia epibiontes bacterianos Gram-negativos adheridos, cuyo porcentaje de infección aumenta en profundidad. El ciclo vital de este epibionte supone la formación de una estructura de varias células que acaba desarrollando un estado dispersivo. Estos epibiontes, a diferencia de otros descritos en la bibliografía, a pesar de ser específicos de *C. weissei* no han demostrado su capacidad predatora, postulándose que se trate de microorganismos heterótrofos comensales o, en su caso, carroñeros, que aprovecharían su proximidad a la célula del hospedador para asegurarse una fuente de recursos tróficos.

RESUM

La presència de poblacions de microorganismes fotosintètics en les interfases òxiques-anòxiques dels llacs és un procés conegut des de fa prou de temps. En aquest treball hem estudiat aquest tipus de poblacions que s'estableixen en la quimioclina de la llacuna d'Arcas, una llacuna càrstica sulfatada de baixa relació superfície-volum (31 % de profunditat relativa), les aigües de la qual adopten una estructura vertical estratificada al llarg dels mesos d'estiu. Esta llacuna presenta aigües de alta mineralització (conductivitat 2,1-3,3 mS/cm), conseqüència de la dissolució dels guixos damunt dels que s'assenta, amb elevades concentracions de sulfat i calci en les seues aigües.

El procés d'estratificació tèrmica determina la formació d'un hipolimnion anòxic ric en sulfhídric, en el qual es produeix l'acumulació de nutrients inorgànics (N-ammoni, P, Si) de importància per als microorganismes fotosintètics. Dells, el fòsfor resulta especialment escàs en les aigües superficials, sent el nutrient limitant per a la productivitat primària en aquesta zona de la llacuna.

En la quimioclina s'estableixen denses poblacions de microorganismes fotosintètics, entre les que són especialment abundants *Cryptomonas* spp (màxims de prop de 40000 ind·ml⁻¹), *Oscillatoria ornata* (màxims pròxims a 1000 fil·ml⁻¹) i *Chromatium weissii* (fins a 2x10⁶ cel·ml⁻¹). Les seues poblacions augmenten fins l'agost, quan el tamany de les poblacions comença a baixar, mes rapidament encara quan ens acostem al moment de la desestratificació, excepte en *O. ornata* que no mostra eixa baixada. A més, també es troben altres espècies de bacteries fotosintètiques del sofre però amb molta menys contribució a la comunitat fotosintètica. Resulta resenyable la presència de ciliats anaerobis, alguns dels quals s'alimenten de *Cryptomonas* spp., així com de rotífers i ciliats en les aigües microaeròfiles de la llacuna. De l'anàlisi estadístic dels paràmetres físico-químics i biològics estudiats es despren com factor explicatiu principal de la variació comú (58 %) la diferència deguda a l'estat d'oxidació o reducció de l'aigua en el perfil vertical de la llacuna.

La penetració lluminosa en les aigües de la llacuna es veu condicionada per la presència d'organismes fotosintètics en ella. Al llarg del període de mescla la llum resulta detectable fins al fons de la llacuna, mentre que al llarg de l'estratificació les denses poblacions de microorganismes fotosintètics situades en la quimioclina absorbeixen pràcticament tota la llum que els arriba. Els fotons que arriben a la quimioclina són majoritàriament d'una llongitud d'ona compresa entre 500 i 600 nm, degut a l'absorció selectiva en capes superiors per l'aigua, matèria en suspensió i poblacions fitoplànctòniques. Per poder captar eficientment la llum en les profunditats en les que es situen, aquests microorganismes poseixen pigments accessoris, okenona en el cas de les cromatiàcees i ficoeritrina en el de *Oscillatoria ornata* (i probablement també en el de *Cryptomonas* spp.). Pel que fa als pigments fotosintètics, la clorofila *a* a la quimioclina supera els 150 µg·l⁻¹, mentre que a la resta de l'hipolimnion es troba

entre 20 i 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ i a les aigües òxiques està entre 2 i 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. La bacterioclorofila *a* a la quimioclina arriba a estar per dalt de 700 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ i entre 50 i 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en les aigües anòxiques mes fondes.

La producció fotosintètica en la llacuna, que en les aigües epilimnètiques presenta una limitació deguda a la carència de fòsfor, té una marcada limitació per la llum disponible en el cas de les poblacions de microorganismes fotosintètics de la quimioclina. La quantitat de carbó inorgànic fixat per unitat de volum d'aigua en la quimioclina és molt més elevada (fins a prop de 200 $\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$) que en les aigües epilimnètiques, degut a les elevades densitats poblacionals de microorganismes fotosintètics, sent de les mes altes mesurades fins ara en aquest tipus de poblacions en llacs estratificats no eutròfics. Tanmateix, estes altes taxes sols es troben en un rang de profunditats molt menut, i impliquen a un xicotet volum d'aigua, per la qual cosa a pesar de les baixes taxes trobades en l'epilimnion, aquest contribueix a un 82-83% de la fotoassimilació registrada al llarg del període estiuenc, sent el 16-17% que queda l'atribuïble a la fotoassimilació en la quimioclina, de la que un 30-35% era oxigènica amb la presència de sulfhídric y la resta anoxigènica debuda a *Chromatium weissei*.

Tres fòren les soques de cianobactèries filamentoses aïllades de les aigües de la llacuna. *Oscillatoria ornata*, el PSII de la qual resulta resistent al sulfhídric, i *Pseudanabaena* sp., presentaven la capacitat de realitzar fotosíntesis anoxigènica, especialment la segona, mentre que l'activitat fotosintètica de *Oscillatoria tenuis* resulta molt inhibida pel sulfhídric. Tanmateix sols *O. ornata* desenvolupa denses poblacions en aigües riques en sulfhídric, donat que poseix ficoeritrina, cosa que li permet captar la llum que li arriba, encara que canalitzant-la cap al PSII, el qual pot seguir funcionant per la seua elevada resistència al sulfhídric. En base als resultats d'aquest treball s'estableix un model que implica una circulació dels filaments de *O. ornata* a través de les aigües anòxiques després de carregar-se de substàncies de reserva en la capa fotosintèticament activa, a la que acaben tornant per flotació després d'un consum fermentatiu d'aquestes substàncies en el hipolimnion anòxic sense llum i de l'augment de tamany de les seues vesícules de gas.

Chromatium weissei, el microorganisme que forma les poblacions més denses trobades en la llacuna d'Arcas, presenta amb freqüència epibionts bacterians Gram-negatius adherids, augmentant el percentage d'infecció amb la fondaria. El cicle vital de l'epibiont implica la formació de una estructura de més de una cèl·lula, incluint un estat dispersiu. Estos epibionts específic de *C. weissei*, a diferència d'altres descrits en la bibliografia, no han demostrat la seua capacitat predadora, postulant-se que es tracte de microorganismes heteròtrofs comensals o, en el seu cas, carronyers, els quals aprofitarien la seua proximitat als hospedadors per garantir-se una font de recursos tròfics.

ABSTRACT

The presence of populations of photosynthetic microorganisms at the oxic-anoxic boundary of lakes is known since years ago. In this work, we have studied these populations that are established at the chemocline level of Lake Arcas, a karstic sulphate lake having low surface/volume relationship (relative depth 31 %), whose waters vertically stratifies during summer. This lake has highly mineralized waters (conductivity 2.1-3.3 mS/cm), resulting on the dissolution of the gypsum-rich substrate, with high concentrations of sulphate and calcium in the water.

The thermic stratification process determines the formation of a sulfide-rich anoxic hypolimnion, where inorganic nutrients (Ammonium-N, P, Si) accumulates, which are of importance for phototrophic microorganisms. Such is that phosphorus is specially scarce in surface waters, being the limiting nutrient for epilimnetic primary production.

Dense populations of phototrophic microorganisms are found at the chemocline of Lake Arcas, being *Cryptomonas* spp. (up to 40000 cell ml⁻¹), *Oscillatoria ornata* (up to 1000 fil ml⁻¹) and *Chromatium weissii* (near 2 x 10⁶ cell ml⁻¹) the most abundant. Their population densities increase until the end of August, then they decreased (all but *O. ornata*), faster when closer to the vertical mixing. Moreover, other phototrophic sulfur bacteria are found, but their contribution to the phototrophic community is much lower. It is of interest the presence of anaerobic ciliates within the anoxic hypolimnion, some of them feeding on *Cryptomonas* spp., as well as rotifers and ciliates at the microaerophilic waters. A principal component analysis gives redox state of the water as the main factor (58 %) explaining spatial and temporal heterogeneity through the vertical profile.

Light penetration into the water is conditioned by the presence of photosynthetic organisms. During mixing period light arrives to the lake bottom, whereas during the stratification period the dense chemocline photosynthetic populations almost harvest all light arriving to this depth. Photons reaching the chemocline mostly have a wavelength of 500-600 nm, due to the selective absorption of underlying water, particulate material and phytoplankton. The microorganisms living at the chemocline level have accessory pigment complexes in order to be able to collect light of these wavelengths, okenone in Chromatiaceae and phycoerythrin in *Oscillatoria ornata* (and probably in *Cryptomonas* spp.). In respect to the chlorophyll pigments, chlorophyll *a* reach more than 150 µg·l⁻¹ at the chemocline level, whereas these values are comprised between 20 and 50 µg·l⁻¹ in deeper anoxic waters, as well as 2 to 5 µg·l⁻¹ in oxic waters. Bacteriochlorophyll *a* reach values higher than 700 µg·l⁻¹ at the chemocline, being comprised between 50 and 100 µg·l⁻¹ in the deeper waters.

Photosynthetic production, which is phosphorus limited in epilimnetic waters, is light limited at the chemocline. The amount of carbon fixed per unit volume at

the chemocline is much higher than in the epilimnetic waters (up to $200 \text{ mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$), due to the high population densities of phototrophic microorganisms, being one of the highest rates measured in such kind of populations in warm stratified non eutrophic lakes. However these high rate is only found in a quite narrow depth range, involving only a few water volume. Thus, in spite of the low epilimnetic rates of photoassimilation in epilimnetic waters, 82-83 % of carbon photoassimilation takes place in the epilimnion. The remainder, 16-17 % is made at the chemocline, where 30-35 % is due to oxygenic photosynthesis under sulfide, and the rest is mainly anoxygenic due to *Chromatium weissei*.

Three strains of filamentous cyanobacteria were isolated from Lake Arcas. *Oscillatoria ornata*, which have a PSII highly resistant to sulfide, and mainly *Pseudanabaena* sp., showed the ability to perform sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis, whereas *Oscillatoria tenuis* photosynthetic activity is strongly inhibited by sulfide. However, only *O. ornata* develops dense populations in sulfide-rich waters. Since light collected by phycoerythrin is funneled through the PSII, it is advantageous to have a PSII highly resistant to sulfide, as *O. ornata* do. Based on our results, a model is established which implies a circulation of the *O. ornata* filaments throughout the anoxic waters. This cyanobacterium fall into the dark hypolimnetic waters after it accumulates substances at the photosynthetically active layer, where they came back by bouyancy after a fermentative respiration of these substances in the dark anoxic hypolimnetic waters and synthesis of new gas vesicles.

Chromatium weissei, which forms the most dense populations of phototrophic microorganisms in Lake Arcas, often have epibiotic bacteria, being higher the percentage of infection with depth. The life cycle of the epibiont includes the formation of an structures composed by several cells, with a dispersive stage. These epibiotic bacteria specific from *C. weissei*, contrasting with other previously reported, did not show a predatory behaviour, showing a comensalistic relationship with their bacterial host, but a scavenger activity should also be considered. They take profit of its closer relationship to get a continuous source of food.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

La península ibérica es una zona en la que, a pesar de la abundancia de zonas húmedas, los lagos son relativamente escasos. Sin embargo, en las zonas cársticas son relativamente frecuentes los pequeños lagos, de reducido diámetro pero con una profundidad importante en función de la superficie. Miracle y colaboradores (1992) resumen los estudios biológicos realizados en los lagos cársticos españoles, que mayoritariamente se han centrado en las zonas cársticas de Cuenca, Banyoles (Girona) y en el pre-Pirineo.

La geomorfología de las zonas en las que se asientan los lagos cársticos tiene en gran parte un origen basado en la disolución de materiales solubles, principalmente carbonatos, siendo mucho menos frecuentes los sistemas cársticos asentados sobre substratos de yesos. Este es el caso del humedal de Arcas, en el que existen un gran número de dolinas, muchas de ellas llenas de agua de forma temporal o permanente. La disolución de los yesos confiere al agua de estas lagunas una elevada concentración de sulfatos, lo que lleva a que en caso de estratificarse las aguas de la laguna, se forme, por efecto de la sulfato-reducción, un hipolimnion anóxico rico en sulfhídrico

La morfometría de las lagunas cársticas, en muchos casos de forma prácticamente circular, y con una elevada profundidad en comparación con su superficie, favorece la estratificación vertical de sus aguas cuando las condiciones meteorológicas determinan un calentamiento diferencial de las capas más superficiales. En otros casos, además de la estratificación térmica, se establece una estratificación debida a diferencias en las concentraciones de sustancias químicas entre los diferentes estratos de la laguna, originándose un sistema meromíctico. Si únicamente se establece una estratificación térmica, esta perdura durante el periodo estival dando lugar a una circulación vertical que usualmente tiene lugar hacia principio de otoño.

Muchos ecosistemas en los que los microorganismos están presentes son estructuras organizadas espacialmente en las que los microorganismos proliferan en gradientes de sustancias biológicamente activas, así como de gradientes físicos de temperatura, densidad, presión, luz, fuerza iónica, potencial de óxido-reducción y pH (Wimpenny, 1982, Tyler, 1992). En un sistema cárstico sulfatado, el proceso de respiración anaerobia dominante es la sulfato-reducción, que libera grandes cantidades de sulfhídrico a las aguas anóxicas, acumulándose éste en el hipolimnion. En consecuencia, se establece una interfase a una determinada profundidad, que supone un tránsito de aguas que contienen oxígeno en disolución a unas aguas anóxicas ricas en sulfhídrico. lo que lleva aparejado un gradiente de gran número de factores ambientales. En estas interfases, donde la disponibilidad de luz permite el desarrollo de microorganismos fotosintéticos perfectamente adaptados para la vida en estas aguas, se encuentran a menudo poblaciones muy densas de bacterias fotosintéticas, que utilizan el sulfhídrico como dador electrónico para realizar un proceso fotosintético que oxida el sulfhídrico a azufre elemental, sulfato, u otros compuestos oxidados de azufre.

Además de estos microorganismos fotosintéticos anoxigénicos, también pueden encontrarse poblaciones de algas eucariotas, con frecuencia criptofíceas, y cianobacterias, que presentan adaptaciones a la vida en aguas sulfhídricas, así como a la composición espectral de la luz que llega a estas profundidades.

El sulfhídrico es una sustancia generalmente tóxica (Castenholz y Utkilen, 1984), que en bajas o moderadas concentraciones puede dañar a muchos organismos, pero que a altas concentraciones afecta prácticamente a todos los seres vivos. Muchas cianobacterias no toleran el sulfhídrico (Castenholz, 1976), mientras que en otras su fotosistema II resulta relativamente poco sensible a concentraciones moderadas de esta sustancia, y un tercer grupo de cianobacterias pasa a tener una actividad fotosintética anoxigénica utilizándolo como dador electrónico (Cohen *et al.*, 1975a,b; Castenholz 1976, 1977; Garlick *et al.*, 1977, Cohen *et al.*, 1986, De Wit y Van Gemerden, 1987a)

La ecología microbiana estudia el comportamiento y las actividades de los microorganismos en los ecosistemas naturales (Brock, 1993), o, dicho de otra manera, la interacción de los microorganismos con el medio físico-químico y con otros micro y macroorganismos (Trüper, 1993). Sería pues su objeto el estudio de la autoecología de los microorganismos, las relaciones con su medio, así como las relaciones intermicrobianas. La quimioclina de los lagos es, en este sentido, un paraíso para el ecólogo microbiano (Tyler, 1992), ya que en una pequeña zona del lago se pueden encontrar multitud de estrategias con las que los microorganismos se enfrentan al medio en el que viven. Por tanto, las comunidades microbianas de la quimioclina son un objeto de estudio muy adecuado para probar hipótesis ecológicas referentes a la distribución de diferentes especies en un gradiente ambiental (Caldwell y Tiedje, 1975).

El ecólogo microbiano interesado en la fisiología de las poblaciones naturales enfrenta el problema de una manera diferente a la del fisiólogo microbiano, el cual únicamente trabaja en la regulación de las actividades metabólicas con cultivos de microorganismos (Konopka, 1984). Los microorganismos normalmente regulan sus actividades metabólicas mediante la integración de diversos factores ambientales. Para entender el estado fisiológico de las poblaciones microbianas, el ecólogo microbiano debe determinar no solo que factores afectan a la actividad microbiana, sino como la interacción entre ellos resulta determinante para la población de microorganismos. Esta interacción cobra especial importancia en medios en los que, como en la quimioclina de los lagos estratificados, se establecen importantes gradientes en esos factores, encontrándose en estos lugares poblaciones finamente estratificadas cuya distribución vertical se explica por la superposición de factores tales como oxígeno, sulfhídrico, luz y nutrientes, entre otros.

Las poblaciones microbianas de la quimioclina de los lagos, debido a su elevada densidad, alcanzan altas tasas de producción fotosintética, aunque su

contribución a la producción fotosintética del conjunto del lago suele ser por lo general bastante baja dado que esas altas tasas solo tienen lugar en un rango espacial muy estrecho. Esto se debe a que la conjunción de factores necesarios sólo se da en la parte superior de las poblaciones, ya que ellas mismas absorben la luz que les llega en las capas superiores, dejando sin ese recurso a sus congéneres situados por debajo. No obstante, sea cual fuere la actividad fotosintética, la fijación de carbono a nivel de la interfase puede resultar muy importante para el mantenimiento del sistema trófico en el hipolimnion anaerobio.

Además de las relaciones con el medio, la ecología microbiana estudia las interrelaciones entre los microorganismos, no sólo en su competencia por los recursos, sino también relaciones más íntimas hasta el punto de suponer una interacción física entre ellos. Así, desde la predación de organismos de eslabones superiores de la cadena trófica hasta la hipotética relación trófica de una bacteria epibionte y su hospedador, constituyen aspectos interesantes a estudiar en la Laguna de Arcas.

El objetivo de este trabajo es arrojar luz sobre la ecología de los microorganismos fotosintéticos que viven en la quimioclina de la Laguna de Arcas, en aras a ampliar el conocimiento disponible acerca de su ecología, adaptaciones metabólicas y sus relaciones con otros organismos. Ciertamente es que el término quimioclina es propio de lagos meromíticos, pero aún no siéndolo la Laguna de Arcas, en nuestro trabajo se ha utilizado este término para denominar de una forma escueta a la zona de la laguna en la que se establece un fuerte gradiente físico-químico, y que separa una zona superior en la que dominan los procesos aerobios de una inferior en la que imperan las condiciones anaerobias.

Esta memoria se estructura en una serie de capítulos, precedidos por un capítulo introductorio y corolados por unas conclusiones generales que se expresan de una forma hilvanada, por lo que no aparecen numeradas. Los capítulos se presentan con una breve introducción, que va seguida de una descripción del material y métodos referente a los trabajos incluidos en ese capítulo, terminado con unos resultados y discusión que en algunos capítulos se presentan de forma conjunta y en otros por separado. Dado que este trabajo optará al Doctorado Europeo, una parte del mismo debe estar elaborada en una lengua de la Comunidad Europea distinta a las oficiales en el país y comunidad autónoma a la que corresponde la Universidad en la que se presenta. Se ha elegido la lengua inglesa por ser la más ampliamente difundida entre la comunidad científica internacional, incluyéndose una versión en inglés del resumen, las conclusiones y los pies de las figuras, así mismo el castellano o el inglés han sido utilizados de manera indistinta en la rotulación de las figuras. Se incluye también una versión en valenciano del resumen y las conclusiones, lo que en el fondo esconde el deseo de haber utilizado más nuestra lengua en la redacción de esta memoria.

Tras una breve introducción general, recogida en el capítulo 1 encontramos el capítulo 2, que describe el medio físico y el entorno ecológico, las características climáticas de la zona y la metodología de muestreo, que debido a las especiales características de las poblaciones, requiere métodos especiales. En el capítulo 3 se estudia la limnología de la Laguna de Arcas, que incluye una completa descripción de la físico-química de las aguas de la laguna y la evolución de estos parámetros en el ciclo anual. En el capítulo 4 se presenta a los principales microorganismos fotosintéticos presentes en la Laguna de Arcas, con especial atención a los de la interfase óxico-anóxica, relatando el desarrollo y evolución de sus poblaciones en relación a sus factores determinantes. En el capítulo 5 se incluye el estudio de la asimilación fotosintética de carbono, especialmente en la zona de la quimioclina, relacionando este parámetro con las características cuantitativas y cualitativas de la luz disponible. En el capítulo 6 se detallan las adaptaciones metabólicas a la presencia de sulfhídrico de las cianobacterias filamentosas aisladas de las aguas de la Laguna de Arcas, principalmente *Oscillatoria ornata* que forma densas poblaciones en la quimioclina e hipolimnion, estableciéndose un modelo de funcionamiento de la población de dicho microorganismo en la laguna. En el capítulo 7 se estudia la relación entre un microorganismo epibionte y su hospedador, *Chromatium weissei*, postulándose una hipótesis en torno a la interrelación entre ambos. Finalmente figuran las conclusiones, bibliografía, y anexos en los que se recoge una parte de los datos obtenidos en las muestras tomadas en la Laguna de Arcas, así como una parte de la tesis que ya ha sido publicada.

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO Y EL TIPO DE MUESTREO

2.1.- INTRODUCCIÓN

Este capítulo se enfoca desde un punto de vista descriptivo, tratando de resumir diversas características de la zona en la que se enmarca la laguna que centra nuestro estudio. Así, se describen aquí las características morfométricas de la laguna, algunos parámetros de otras lagunas del humedal, la geología de la zona y la vegetación y fauna de la laguna. Algunas de estas características, si bien abordadas de forma descriptiva, resultan fundamentales a la hora de entender los procesos fisico-químicos que tienen lugar en la laguna. Por ejemplo, la geología de la zona determina la composición iónica del agua, lo que repercute finalmente en las comunidades biológicas, mientras que la morfometría juega un importante papel en los fenómenos de estratificación y mezcla de las aguas de la laguna.

Las características climáticas y la meteorología resultan también determinantes en los procesos físicos que implican el establecimiento de la estratificación de las aguas, por lo que el conocimiento de los valores típicos de diversos parámetros meteorológicos y su comparación con los acaecidos durante el periodo de estudio de campo permite inferir la importancia del componente climático y de sus variaciones.

En este capítulo, que podría ser tomado como el cajón de sastre de la tesis, se describe además el método de muestreo utilizado en este trabajo. El alto grado de estratificación que presenta la comunidad de organismos fotosintéticos en las zonas microaeróbicas y anóxicas de la laguna exige la utilización de métodos cuidadosos de muestreo, que permitan obtener unos resultados que reproduzcan fielmente la situación real de estos microorganismos en la laguna.

2.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO

El humedal de Arcas está localizado entre las poblaciones de Arcas, Ballesteros y Olmedilla de Arcas, en la margen derecha del río San Martín. La Laguna de Arcas, perteneciente al grupo aquí denominado de Los Cedazos, se encuentra situada en el término municipal de Valdetórtola (30SWK7327), fronterizo con el de Arcas, formando parte de un complejo lagunar que incluye un total de 35 dolinas de las cuales algunas presentan agua de forma permanente y otras sólo con carácter estacional. Este complejo, incluido en los términos de Arcas del Villar, Villar de Olalla y Valdetórtola, era bastante desconocido, como lo denota el hecho de que Pardo (1948), en su Catalogo de los lagos de España sólo cita dos lagunas en la zona de Arcas. En la tabla 2-1 se detallan algunas de las características de las lagunas de la zona de Arcas, de acuerdo con Cirujano (1995) y también según los muestreos previos realizados por nuestro grupo de investigación en la misma zona, recogidos en Rodrigo (1997). La figura 2-1

muestra la situación de las diferentes lagunas de acuerdo a la nomenclatura de (Cirujano (1995).

Tabla 2.1.- Algunas características de las lagunas del humedal de Arcas.
Table 2.1.- Some features of the different lakes of the Arcas wetland

Denominación según Cirujano	Denominación según Rodrigo	Carácter	Prof.max. según Cirujano	Cond (µs/cm) según Cirujano	Prof.max. según Rodrigo	Cond. (µs/cm) según Rodrigo
Arcas-1	Ballesteros-6	Permanente	5,84	2390	5,5	3390±280
Arcas-2	Ballesteros-4	Permanente	6,25	3680-4000	6	3457±153
Arcas-3	Barraganes-2	Permanente	7,5	1500	7,2	2383±76
Arcas-4	Ballesteros-5	Permanente	7,14	3800	6,5	3390±280
Arcas-5	Ballesteros-1	Permanente	3,34	3145	3,75	2840±111
Arcas-6			0,76	6580		
Arcas-7			1,27			
Arcas-8	Los Barraganes-1	Permanente	11,4	2440	12,25	2394±46
Arcas-9-cub.1	Arcas-2-cub.1	Permanente	11,5	2560	14,2	2487±251
Arcas-9-cub.2	Arcas-2-cub.2	Permanente	4,25	2560	4,2	2487±251
Arcas-10-cub.1	Arcas-3-cub.1	Permanente	7,38	2630	7,5	2683±201
Arcas-10-cub.2	Arcas-3-cub.2	Permanente	8,06	2800	8	2785±92
Arcas-11		Temporal	1,64	2470		
Arcas-12		Temporal	0,55	2470		
Arcas-13		Temporal	1,25	3660		
Arcas-14	Arcas-1	Permanente	10,56	2390	9	2395±82
Arcas-15			1,75	3900		
Arcas-16			3,06	11660		
Arcas-17			0,6	2780		
Arcas-18			0,9	2090		
Arcas-19	El Rincón	Permanente	5,71	2680	5,25	2577±166



Figura 2.1.- Situación de las lagunas en el humedal de Arcas-Ballesteros, según Cirujano (1995)
Figure 2.1.- Location of the different lakes in the Arcas-Ballesteros wetland, according to Cirujano (1995).



Figura 2.2 - Vista aérea general del humedal de Arcas-Ballesteros
Figure 2.2 - Aerial view of the Arcas-Ballesteros wetland (general view)

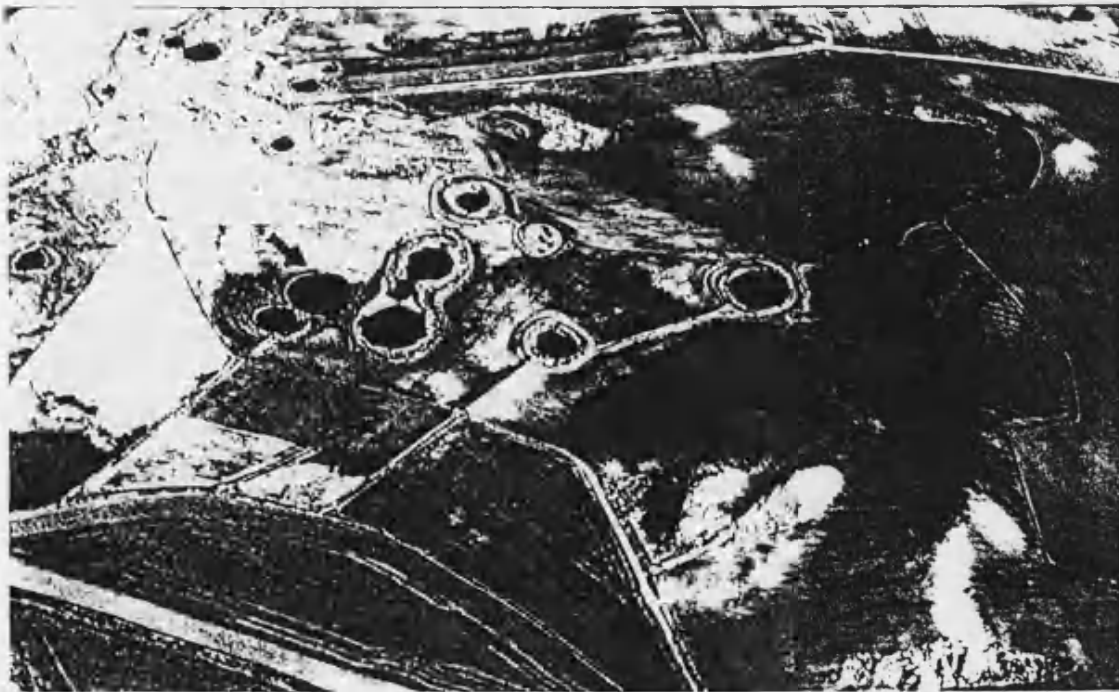


Figura 2.3 - Vista aérea de la zona del humedal de Arcas-Ballesteros, señalando la cubeta estudiada en la Laguna de Arcas
Figure 2.3 - Aerial view of Arcas-Ballesteros wetland, arrow shows the basin studied in Lake Arcas

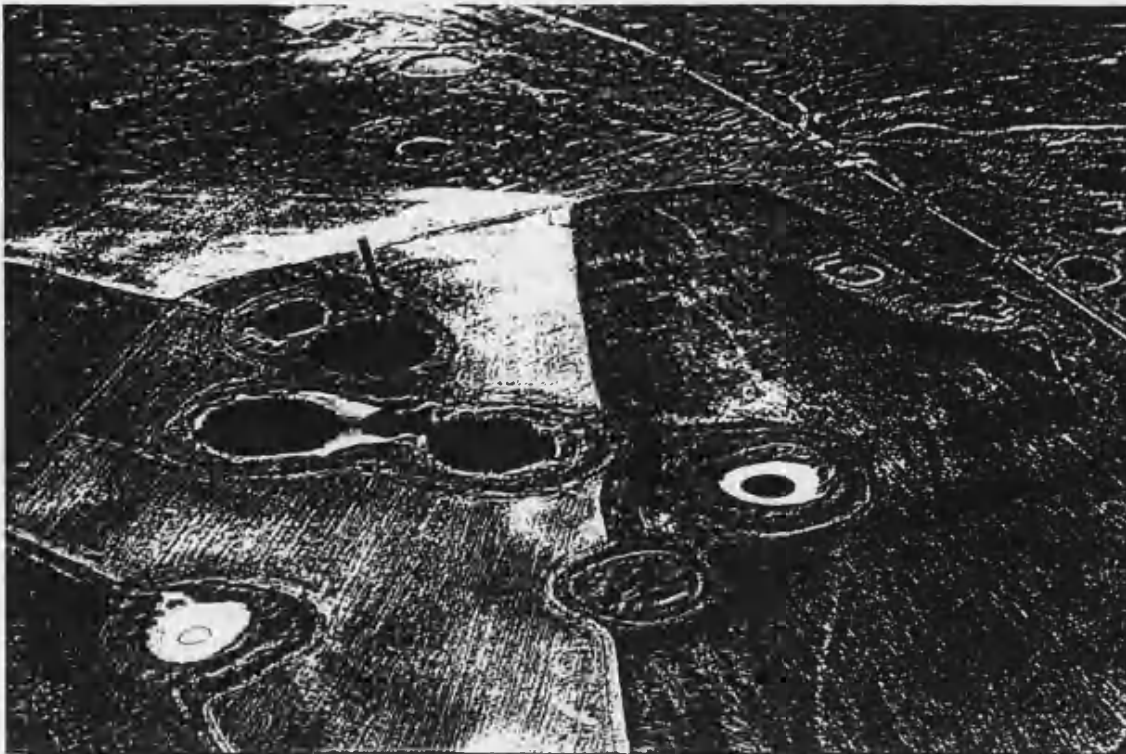


Figura 2 4 - Vista aerea del grupo de lagunas de "Los Cedazos", entre el que se encuentra la laguna estudiada

Figure 2 4 - Aerial view of "Los Cedazos" Lakes, one of which was the site studied



Figura 2 5 - Detalle de las dos cubetas que forman la Laguna de Areas

Figure 2 5 - Detail of the two basins of Lake Areas

La actividad económica de esta zona está basada en la agricultura, que está representada principalmente por cultivos de girasol, cereales y pequeñas extensiones de cultivos forrajeros. También existe un aprovechamiento ganadero extensivo, siendo utilizados los pastos naturales colindantes a las lagunas para palear en ellos por los rebaños de ovejas de los municipios cercanos.

2.2.1.- GEOLOGÍA

El conjunto de los materiales solubles, la fisuración, el agua circulante y el trabajo de disolución y erosión inherentes a la circulación cárstica, constituyen lo que podemos denominar un aparato cárstico (Llopis, 1970). La zona superficial del aparato cárstico o zona de absorción posee formas muy características, que se denominan formas de absorción o exocársticas. La disolución de los materiales solubles y la separación de las arcillas de descalcificación determina el hundimiento lento de toda la zona afectada a partir de su centro, originándose una depresión circular en forma de embudo, llamada dolina. Cuando los materiales son muy solubles, como el yeso, las dolinas pueden sufrir una evolución bastante rápida hacia formas abiertas, como las simas o sumideros.

Este karst, modelado sobre los materiales paleógenos del núcleo anticlinal de Villar del Saz, contiene buenos ejemplos de dolinas de disolución y colapso, cuya singularidad, al estar formadas en yesos, lo hacen altamente valorable desde el punto de vista geológico. El terreno está formado por margas y arcillas, entre las que se intercalan masivos yesos y delgados lentejones de calizas dolomíticas paleógenas (IGME, 1975). Las dolinas de la zona de Arcas están originadas por la carstificación subterránea de los niveles lenticulares de yesos, seguido de un hundimiento de las arcillas de las capas superiores. La presencia de yesos, altamente solubles, es la responsable de la elevada conductividad del agua en la mayoría de las lagunas. Se trata de una formación cárstica bastante activa, como lo denota el hecho de la formación reciente de una dolina en 1978. El proceso de carstificación ha derivado, como es normal en estos casos, en un campo de dolinas. Estos campos de dolinas son propios de regiones que presentan materiales de alta solubilidad.

2.2.2.- MORFOLOGÍA

La Laguna de Arcas está formada por dos cubetas de márgenes abruptos, de 14,2 (cubeta-1) y 4,2 (cubeta-2) metros de profundidad respectivamente, habiéndose realizado este trabajo en la más profunda, cuya superficie es de aproximadamente 0,15 hectáreas. La cubeta en la que se ha realizado este estudio es la más profunda de todas las lagunas que se encuentran en el humedal, en lo sucesivo nos referiremos a ella simplemente como "Laguna de Arcas". Su fondo es de una profundidad bastante uniforme (alrededor de 11,5-12 metros), a excepción de un

pozo central de forma cilíndrica de unos 3 metros de diámetro y 2,5 de profundidad. Ambas cubetas son dolinas isótropas, esto es, prácticamente circulares, originadas independientemente, como denota el que la conexión de ambas sea casi a nivel del terreno, tratándose de una zona muy somera. Este tipo de fenómenos de conjugación de dos dolinas son bastante frecuentes, originándose lo que popularmente se conoce como cedazos, y que en terminología cárstica, aunque ya en un estado más avanzado, se denomina "uvala".

El nivel del agua de la laguna, que se medía usando una escala situada en una de sus orillas, permaneció bastante constante a lo largo del periodo estudiado, con variaciones máximas de 12 cm a lo largo del periodo estudiado. La laguna es un sistema hidrológicamente cerrado en lo que se refiere a los intercambios superficiales con la zona circundante, a excepción, claro está, de los intercambios con la atmósfera y la escorrentía del entorno inmediato. La alimentación es por aguas subterráneas, no existiendo ningún aporte externo encauzado, ya que la escorrentía del paraje no discurre hacia esta laguna, sino que el drenaje conduce las aguas hacia el río San Martín. En cuanto a las salidas, existe un pequeño tubo de drenaje, por lo que nunca se supera el nivel de las aguas marcado por este drenaje artificial.

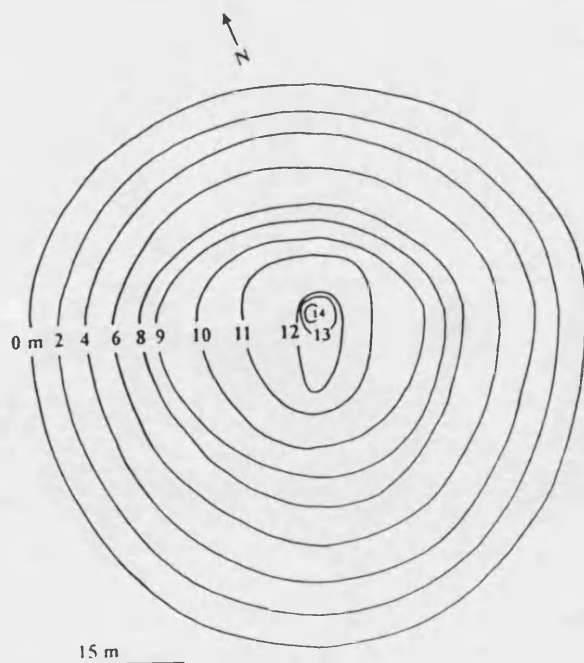


Figura 2.6.- Mapa batimétrico de la cubeta más profunda de la Laguna de Arcas
 Figure 2.6.- Bathimetric map of Lake Arcas

La morfometría de la laguna determina unas condiciones muy favorables para la estratificación de sus aguas, dada su elevada profundidad relativa (31,2 %, según Rodrigo, 1997). La forma de la cubeta más profunda supone una relación superficie/volumen muy baja, lo que dificulta la mezcla en condiciones climatológicas adversas. Ello permite que en el periodo comprendido entre los meses de mayo y octubre se mantenga una estratificación permanente que permite el desarrollo de un hipolimnión anóxico rico en sulfhídrico. Además, durante los meses anteriores al establecimiento de la estratificación permanente (usualmente marzo y abril, e incluso febrero en ocasiones) se producen cortos periodos en los que ya aparece una cierta estratificación vertical asociada a la formación de una capa anóxica en profundidad, aunque dichos periodos pueden ser truncados por la aparición de condiciones climatológicas adversas que determinan una brusca mezcla de las aguas de la laguna.

2.2.3.- VEGETACIÓN Y FAUNA VERTEBRADA

La vegetación actual de este complejo lagunar fue estudiada por Cirujano (1995), dentro de un amplio estudio sobre la flora y vegetación de las lagunas y humedales de la provincia de Cuenca. Este autor califica como únicas las formaciones de carófitos que cubren las orillas y fondos de la mayoría de las lagunas de este humedal, habiendo encontrado hasta diez taxones diferentes pertenecientes al género *Chara*. A la importancia, por su vitalidad cobertura y estructura, de la vegetación sumergida, se añade una extraordinaria representación de la vegetación perilagunar y helofítica asociada a las zonas pantanosas y a las lagunas castellano-manchegas situadas sobre substratos de yesos, donde coexisten carrizales, masegares, praderas de juncos, pastizales subhalófilos y formaciones de cárices. La singularidad botánica de este enclave permite contemplar la sucesión vegetal propia de una zona pantanosa, algo cada vez más difícil en la actualidad dada la creciente degradación de nuestras zonas húmedas.

Dentro de este rico complejo lagunar, desde el punto de vista botánico, la Laguna de Arcas representa uno de los más modestos exponentes, ya que lo abrupto de sus márgenes y la profundidad de sus aguas impide el desarrollo de carófitos, encontrándose únicamente *Potamogetum pectinatus*, mientras que los márgenes están colonizados por *Cladium mariscus*, que forma una orla alrededor de la laguna. Contiguamente a dicha orla se encuentran ya los cultivos agrícolas, consistentes en plantaciones de girasol y hierbas forrajeras (rye-gras, centeno forrajero).

La fauna directamente relacionada con las lagunas no es muy abundante, aunque a lo largo de los años de estudio se han podido detectar ejemplares de diversas especies animales. Debido a la amplitud del humedal, no es raro observar la presencia de aves acuáticas, especialmente anátidas, aunque en ocasiones se han

observado algunos ejemplares de ardéidas, especialmente de garzas. También se han observado diversas rapaces como ratoneros, milanos y aguilucho lagunero además de otras especies de aves. En la fauna propiamente acuática se ha observado la presencia de ratas de agua (*Arvicola sapidus*), que anidan en los márgenes de la laguna, así como culebras de agua (*Natrix* sp.). La laguna cuenta con una escasamente variada fauna piscícola, al tratarse de ejemplares introducidos o descendientes de estos, cuya asignación específica desconocemos.

2.3.- CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS Y METEOROLOGÍA DE LA ZONA DURANTE EL ESTUDIO

El clima de una región determina extraordinariamente las características de una masa de agua (Demers y Kalf, 1993). Por ello resulta de gran importancia conocer los valores que toman diversos parámetros meteorológicos a la hora de explicar la evolución limnológica de la laguna. Para ello se obtuvieron los datos meteorológicos registrados por la estación meteorológica de Cuenca, situada a poco más de cinco kilómetros del humedal de Arcas. Esta estación viene registrando de manera continuada los datos de temperatura y pluviosidad desde 1940, por lo que la meteorología de los años en los que se llevó a cabo el estudio pudo ser comparada con las medias de los últimos 45 años. También existen bastantes datos disponibles de años anteriores a 1940, pero con numerosas carencias, que aconsejan no utilizar esos datos para el cálculo de los valores medios. Se han considerado, en lugar de los años civiles, los periodos comprendidos entre el mes de octubre de un año dado y el mes de septiembre del siguiente, lo que se puede interpretar como un año limnológico, ya que comprende un ciclo completo de mezcla-estratificación de la laguna, lo cual supone una aproximación desde el punto de vista del calendario ecológico (Balvay, 1991). Así mismo, para facilitar el cálculo de los valores estacionales, no se ha utilizado como límite de las estaciones las fechas de los equinoccios y los solsticios, sino que se han considerado los meses completos de octubre, noviembre y diciembre para el cálculo de los valores correspondientes al otoño, y así sucesivamente con los siguientes meses y estaciones. Como se comprobará en el capítulo 4, la meteorología de la zona permite explicar los procesos de estratificación y mezcla que se han observado en la laguna durante el periodo de estudio.

2.3.1.- TEMPERATURA

El régimen de temperaturas de la zona se caracteriza por presentar importantes diferencias estacionales, siendo enero el mes más frío y julio el más cálido. La tabla 2-2 permite observar los valores medios y la desviación típica de las

temperaturas en el periodo 1940-94. Si comparamos estos valores con los medidos en los años de estudio, que incluirían desde 1988-89 hasta 1991-92, observamos que en general este periodo se caracteriza por la relativa bondad de las temperaturas, presentándose por lo general valores medios superiores a las medias de los últimos 45 años. En la tabla 2-3 se detallan los valores de las temperaturas media, máxima y mínima del periodo 1988-91, acompañados de la desviación respecto a la media del periodo 1940-94.

Tabla 2.2.- Media y desviación típica de las temperaturas registradas en el observatorio meteorológico de la ciudad de Cuenca. Se reseñan la media mensual y media de las máximas y de las mínimas, así como las temperaturas máxima y mínima en cada mes del periodo indicado
Table 2.2. Mean and standard deviation of temperatures registered in Cuenca weather Station. Monthly mean, mean of the maxima and mean of the minima, as well as absolute maxima and minima are shown.

PERIODO 1940-1994					
MES	MEDIA Y DESVIACIÓN TÍPICA DE LAS TEMPERATURAS:				
				MÁXIMAS	MÍNIMAS
	MEDIAS	MÁXIMAS	MÍNIMAS	ABSOLUTAS	ABSOLUTAS
Octubre	12,5±1,6	18,5±2,4	6,5±1,3	25,5±2,6	0,1±2,1
Noviembre	7,6±1,4	12,9±1,4	2,2±1,7	19,6±2,6	-4,2±2,0
Diciembre	4,7±1,6	9,4±1,5	-0,2±2,0	15,9±2,5	-6,5±2,2
Enero	3,7±1,7	9,0±1,9	-1,4±2,3	15,6±2,6	-8,1±3,5
Febrero	4,8±1,8	10,2±2,3	-0,7±2,1	17,8±2,8	-7,4±3,5
Marzo	7,4±1,5	13,7±1,7	1,2±1,7	21,4±2,5	-5,1±3,2
Abril	9,9±1,3	16±1,8	3,6±1,3	23,3±2,4	-2,0±1,8
Mayo	13,7±1,7	20,2±2,4	7,1±1,3	27,5±3,3	1,1±1,8
Junio	18,3±1,6	25,6±2	11,0±1,2	32,6±2,2	5,0±1,8
Julio	22,3±1,2	30,7±1,6	14,0±1,4	35,7±1,4	8,5±2,0
Agosto	22±1,4	29,9±1,5	14,0±1,5	35,1±1,8	8,6±2,0
Septiembre	18,2±1,7	25,5±2,2	11,0±1,5	31,7±2,6	4,6±2,2

Considerando las desviaciones estacionales acumuladas respecto a los valores medios de temperatura del periodo 1940-94, que se detallan en la figura 2-7 podemos observar con más detalle el régimen de temperaturas acaecido durante el estudio. Así, en el periodo 1988-89 el otoño y el invierno fueron algo más cálidos de lo habitual, especialmente el final del invierno, la primavera, aún con importantes variaciones mensuales, se mantuvo en torno a las temperaturas medias, mientras que el verano fue también más caluroso. El periodo 1989-90 es, de manera clara, el que presentó una desviación positiva de las temperaturas marcadamente más alta, ya que todos los meses, a excepción de abril, presentaron valores superiores tanto en las temperaturas medias como en las medias de las máximas y las mínimas. El otoño fue extraordinariamente suave, con mínimas muy superiores a las habituales, especialmente en diciembre; el invierno, en concreto el mes de febrero, también fue mucho más cálido de lo habitual; en la primavera, el mes de abril supuso un paréntesis en la bondad de las temperaturas,

que se recuperaron hacia valores bastante superiores a los medios en los siguientes meses de la primavera y el verano. En el periodo 1990-91, a diferencia de los anteriores, las características térmicas de otoño invierno y primavera fueron bastante similares a los valores medios del periodo de referencia, pero el verano, especialmente el mes de julio, fue el mas caluroso de los tres años comprendidos en el estudio, dando paso a un otoño, ya del periodo 1991-92 ligeramente más frío de lo habitual.

Tabla 2.3.- Temperaturas medias, máximas y mínimas registradas en la estación meteorológica de Cuenca durante el periodo de estudio de campo y desviación respecto a los valores medios del periodo 1940-1994.

Table 2.3.- Mean, maximal and minimal temperatures registered at the weather station of Cuenca during the field study period, and deviation from mean values from the period 1940-1994.

PERIODO 1988-89						PERIODO 1989-90							
Mes	Temp Med.	Desv.	Temp Max.	Desv.	Temp Min.	Desv.	Mes	Temp Med.	Desv.	Temp Max.	Desv.	Temp Min.	Desv.
Octubre	13,7	+1,2	20,0	+1,5	7,4	+0,9	Octubre	14,2	+1,7	20,7	+2,2	7,7	+1,2
Noviembre	8,2	+0,6	13,7	+0,8	2,7	+0,5	Noviembre	9,8	+1,8	13,0	+0,1	6,5	+4,3
Diciembre	6,7	+2,0	11,3	+1,9	-2,2	-2,0	Diciembre	8,3	+3,9	11,2	+1,8	5,3	+5,5
Enero	4,5	+0,8	11,1	+2,1	-2,1	-0,7	Enero	4,5	+0,8	9,2	+0,2	-0,3	+1,1
Febrero	6,0	+1,2	11,5	+1,3	0,4	+1,1	Febrero	9,4	+4,6	15,6	+5,4	1,9	+2,6
Marzo	10,1	+2,7	16,5	+2,8	3,7	+2,5	Marzo	9,0	+1,6	15,3	+1,6	2,8	+1,6
Abril	8,1	-1,8	12,8	-3,2	3,3	-0,3	Abril	8,5	-1,4	13,6	-2,4	3,4	-0,2
Mayo	15,2	+1,5	22,0	+1,8	8,4	+1,3	Mayo	15,3	+1,6	22,5	+2,5	8,1	+1,0
Junio	19,1	+0,8	26,2	+0,6	12,0	+1,0	Junio	20,8	+2,5	28,5	+2,9	13,1	+2,1
Julio	24,2	+1,9	32,0	+1,3	16,4	+2,4	Julio	23,6	+1,3	31,6	+0,9	15,6	+1,6
Agosto	23,8	+1,8	31,2	+1,3	16,4	+2,4	Agosto	23,2	+1,2	30,3	+0,4	16,1	+2,1
Septiembre	17,7	+0,5	23,7	-1,8	11,6	+0,6	Septiembre	20,2	+2,0	26,2	+0,7	14,1	+3,1
PERIODO 1990-91						OTOÑO 1991							
Mes	Temp Med.	Desv.	Temp Max.	Desv.	Temp Min.	Desv.	Mes	Temp Med.	Desv.	Temp Max.	Desv.	Temp Min.	Desv.
Octubre	12,6	-1,8	17,0	-3,0	8,5	-0,6	Octubre	10,7	-1,5	20,0	-3,5	7,4	-0,3
Noviembre	7,6	-0,6	12,1	-0,6	3,0	-0,5	Noviembre	7,0	+1,9	13,7	+3,2	2,7	+0,6
Diciembre	2,8	+0,9	8,2	+1,0	-2,6	+1,0	Diciembre	5,6	+1,1	11,3	+0,7	-2,2	+1,8
Enero	4,5	-0,8	8,1	-0,3	-0,8	-1,6							
Febrero	4,0	+0,3	8,4	+1,8	-0,5	-1,2							
Marzo	8,6	+0,8	12,7	+0,8	4,5	+0,6							
Abril	10,5	+1,2	15,3	+1,7	2,8	+0,9							
Mayo	12,8	+2,7	20,1	+2,8	5,5	+2,8							
Junio	20,9	-3,5	28,5	-5,3	13,3	-1,8							
Julio	23,9	-0,8	35,9	-0,5	16,0	-1,1							
Agosto	24,9	+1,2	32,6	+0,9	17,2	+1,5							
Septiembre	19,6	+1,1	25,7	+1,0	13,5	+1,2							

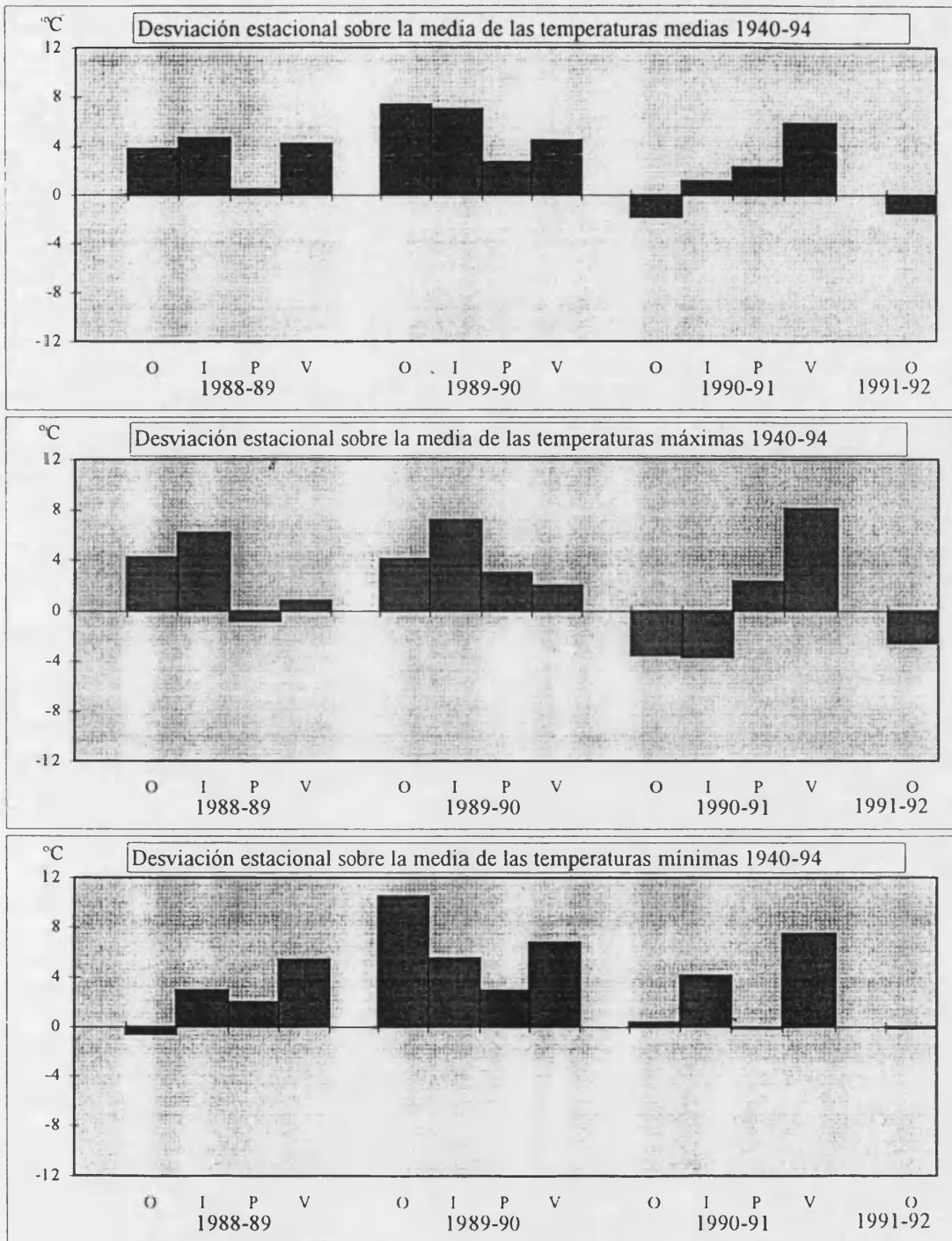


Figura 2.7.- Desviación estacional acumulada de las temperaturas medias, medias de las máximas y medias de las mínimas en el periodo 1988-1991 respecto a los valores medios de los mismos parámetros en el periodo 1940-1994.

Figure 2.7.- Seasonal accumulated deviation of the mean, mean of the maxima, and mean of the minima temperatures in the period 1988-1991, in comparison to those of 1940-1994.

2.3.2.- PLUVIOSIDAD

La pluviosidad anual media del periodo 1940-94 registrada en la estación meteorológica de Cuenca fue de 543,9 l/m². Al estudiar la distribución mensual de las precipitaciones (tabla 2-4) resulta llamativo observar que el reparto de las lluvias a lo largo del año es, por término medio, bastante uniforme, con medias de 40-60 l/m² por mes, a excepción de dos meses estivales, julio y agosto, con medias en torno a los 20 l/m². Sin embargo, la desviación típica muestral desvela una gran variabilidad entre los meses de los distintos años del periodo 1940-94, lo que supone que la irregularidad de las lluvias es comparativamente mucho mayor que la que encontrábamos en las temperaturas.

Tabla 2.4.- Media y desviación típica de las precipitaciones mensuales registradas por el observatorio meteorológico de Cuenca en el periodo 1940-1994.

Table 2.4.- Mean and standard deviation of monthly rainfall registered in the Cuenca Weather Station from 1940 to 1994.

PERIODO 1940-1994	
Mes	Precipitación media
Octubre	57,0±39,1
Noviembre	51,2±37,4
Diciembre	49,9±37,2
Enero	44,4±38,0
Febrero	51,4±41,4
Marzo	47,8±39,6
Abril	54,4±30,3
Mayo	59,9±36,5
Junio	48,6±31,1
Julio	17,8±22,1
Agosto	21,8±26,1
Septiembre	39,7±32,6

No obstante, esta irregularidad no nos impide ver la existencia de meses más o menos secos, como se observa en el diagrama climático (figura 2-8), lo que sin duda también tiene importancia sobre la estratificación de la laguna. En la tabla 2-5 se presentan los valores de precipitación mensual del periodo 1988-91, la desviación respecto a la media 1940-94, y la precipitación máxima en un día de cada mes. En el periodo 1988-89 destaca la baja precipitación de los meses de noviembre a enero, mientras que tan sólo el mes de mayo presenta precipitaciones significativamente superiores a la media. En 1989-90, a un otoño bastante lluvioso le siguieron un invierno y primavera bastante más secos de lo habitual, y un verano algo más lluvioso de la media. En 1990-91 existía una gran variabilidad, alternándose periodos más secos de lo habitual con otros más

húmedos. En los tres periodos, la precipitación ha sido inferior a la media, especialmente en 1989-90 en el que las precipitaciones fueron un 25 % inferiores a la media, mientras que en los periodos anterior y posterior lo fueron en un 10 %.

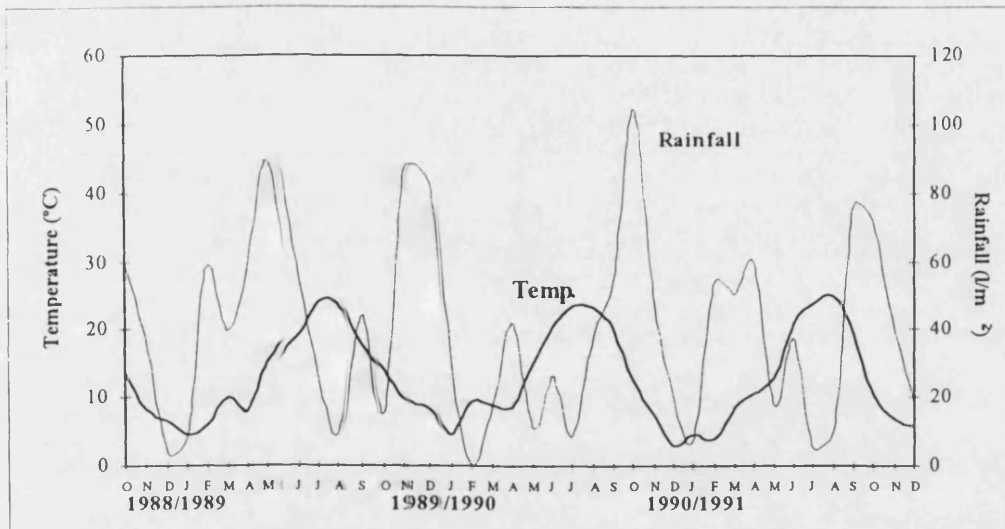


Figura 2.8.- Diagrama climático representando la temperatura media y la precipitación registrada en el observatorio meteorológico de Cuenca, periodo 1988-1991.

Figure 2.8.- Climatic diagram showing mean temperature and rainfall registered in the Cuenca Weather Station. Period 1988-1991.

Como se puede ver (tabla 2-5), las precipitaciones en un sólo día pueden llegar a valores moderadamente altos, pero sin llegar a ser excesivamente llamativos. Esto es debido a que la mayoría de las situaciones de lluvia que se producen vienen asociadas a entradas de frentes del oeste o sudoeste que barren la península hacia el este o noreste, con lo que ya han descargado buena parte de su humedad al llegar a esta zona. Por otra parte, las situaciones de entrada de vientos húmedos de levante, que originan precipitaciones torrenciales en la costa mediterránea, tienen una influencia muy pequeña en la zona.

Las precipitaciones pueden resultar determinantes en algunos momentos del ciclo anual. El periodo de bonanza de las temperaturas que tuvo lugar durante el mes de febrero de 1990 fue acompañado de una ausencia total de precipitaciones, lo que supuso unas condiciones propicias para la estratificación, estableciéndose un pequeño gradiente de temperatura suficiente para permitir la formación de una capa anóxica en las proximidades del fondo de la laguna. Por el contrario, al final del periodo de estratificación del año 1991, la mezcla completa tuvo lugar en una sola noche en la cual se produjeron unas fuertes precipitaciones, pasando la laguna de tener aguas anóxicas en sus tres metros más próximos al fondo a una mezcla completa de sus aguas, con el consiguiente reequilibrio de las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua durante los días siguientes.

Tabla 2.5.- Precipitación mensual, desviación respecto a la precipitación media mensual del periodo 1940-1994 y precipitación máxima diaria registrada en el observatorio de Cuenca durante el periodo 1988-1991.

Table 2.5.- Monthly rainfall, deviation in comparison to the monthly mean rainfall in the period 1940-1994, and maximum daily rainfall registered in the Cuenca weather station in the period 1988-1991.

PERIODO 1988-89				PERIODO 1989-90			
Mes	Precipitación total	Desviación	Pmax en un día	Mes	Precipitación total	Desviación	Pmax en un día
Octubre	60,1	+3,1	36,3	Octubre	15,7	-41,3	14,0
Noviembre	38,0	-13,2	15,7	Noviembre	87,3	+36,1	19,1
Diciembre	3,6	-46,3	3,6	Diciembre	82,5	+32,6	12,8
Enero	8,8	-35,6	8,5	Enero	28,2	-16,2	8,8
Febrero	58,7	+7,3	12,2	Febrero	0,0	-51,4	0,0
Marzo	39,5	-8,3	18,3	Marzo	18,0	-29,8	11,1
Abril	57,9	+3,5	8,5	Abril	41,8	-12,6	12,5
Mayo	89,4	+29,5	21,2	Mayo	10,7	-49,2	3,2
Junio	55,4	+6,8	19,2	Junio	26,3	-22,3	11,0
Julio	25,9	+8,1	9,8	Julio	8,8	-9,0	3,8
Agosto	8,9	-12,9	7,9	Agosto	38,2	+16,4	17,2
Septiembre	44,3	+4,6	13,0	Septiembre	55,2	+15,5	24,2
PERIODO 1990-91				OTOÑO 1991			
Mes	Precipitación total	Desviación	Pmax en un día	Mes	Precipitación total	Desviación	Pmax en un día
Octubre	104,3	+47,3	26,4	Octubre	71,7	+14,7	22,0
Noviembre	47,8	-3,4	16,0	Noviembre	39,7	-11,5	15,7
Diciembre	20,0	-29,9	11,0	Diciembre	17,9	-32,0	7,6
Enero	7,4	-37,0	2,8				
Febrero	54,7	+3,3	17,4				
Marzo	50,7	+2,9	15,1				
Abril	60,0	+5,6	32,0				
Mayo	18,0	-41,9	5,9				
Junio	37,4	-11,2	10,4				
Julio	5,2	-12,6	2,9				
Agosto	10,1	-11,7	5,3				
Septiembre	76,3	+36,6	28,6				

2.4.- LA TOMA DE MUESTRAS EN LA LAGUNA

La adopción de un sistema adecuado de muestreo resulta un factor determinante en el estudio de un sistema altamente estratificado con acusados gradientes, como son los lagos estratificados. En ellos se pueden observar grandes diferencias a lo largo del perfil vertical, tanto en las características físico-químicas del agua como

en la distribución de los organismos. Estas diferencias son especialmente acusadas en el caso de las interfases y en concreto de la interfase óxico-anóxica y la subsiguiente redoxclina, alrededor de las cuales pueden concentrarse las poblaciones más densas de microorganismos y producirse los procesos físico-químicos y metabólicos más notables. Por todo ello, los sistemas tradicionales de muestreo, como las botellas hidrográficas, no son útiles durante los periodos de estratificación y deben ser sustituidos por otros de mayor precisión. No obstante, en los meses en los que la mezcla era total los muestreos se simplificaban y se realizaban por medio de una botella Ruttner.

Un primer requisito para la precisión en el muestreo durante los periodos de estratificación lo constituye la necesidad de realizarlo desde una plataforma flotante suficientemente estable. En nuestro caso, esto se conseguía mediante un sistema de fijación que aseguraba la mínima oscilación. Para ello se cruzaban de parte a parte de la laguna dos cables de nylon, que se tensaban con cuatro estacas de hierro situadas permanente en el borde de la laguna en lugares fijos marcados. Los cables, situados de forma perpendicular, coincidían justo encima del punto de muestreo, localizado, como se puede observar en la batimetría, sobre la vertical de un pequeño pozo que constituye la parte más profunda de la laguna. En el punto de coincidencia de ambos cables estos se ataban, procediéndose a amarrar la barca utilizada para el muestreo a los cables, mediante varios puntos de anclaje, situando el espejo de popa en la parte más próxima al cruce. De esta forma, dado que los cables estaban suficientemente tensados y que la barca tenía varios puntos de anclaje, se conseguía minimizar las oscilaciones y asegurar la estabilidad durante el muestreo.

El método de muestreo en los periodos de estratificación se basaba en la utilización de un muestreador de doble cono con entrada laminar (Miracle *et al*, 1992). Este tipo de muestreador, descrito inicialmente por Jørgensen *et al* (1979a) fue mejorado adaptándolo a las condiciones de muestreo. El muestreador (figura 2-9), fabricado en metacrilato transparente, consistía en un cono inferior cuyo interior contenía el lastre, y uno superior en forma de embudo invertido que desemboca en un orificio al cual se conecta un tubo de plástico mediante un adaptador torneado. Ambos conos están unidos por sus bases, dejando un espacio de separación de 1 cm entre ambos, por el cual se succiona la muestra. El tubo adaptado al cono superior debe ser de una longitud suficiente para permitir alcanzar la máxima profundidad del lago, utilizándose en nuestro caso uno de 20 metros. Este tubo, a cuyo extremo se le agrega una cinta métrica inextensible para determinar con exactitud la profundidad de toma de muestra, se conecta por medio de adaptadores de vidrio a una bomba peristáltica a la que se acopló un motor eléctrico, de manera que al conectarlo a una batería de 12 V el bombeo fuera automático y de un flujo constante (aproximadamente 2 litros por minuto).

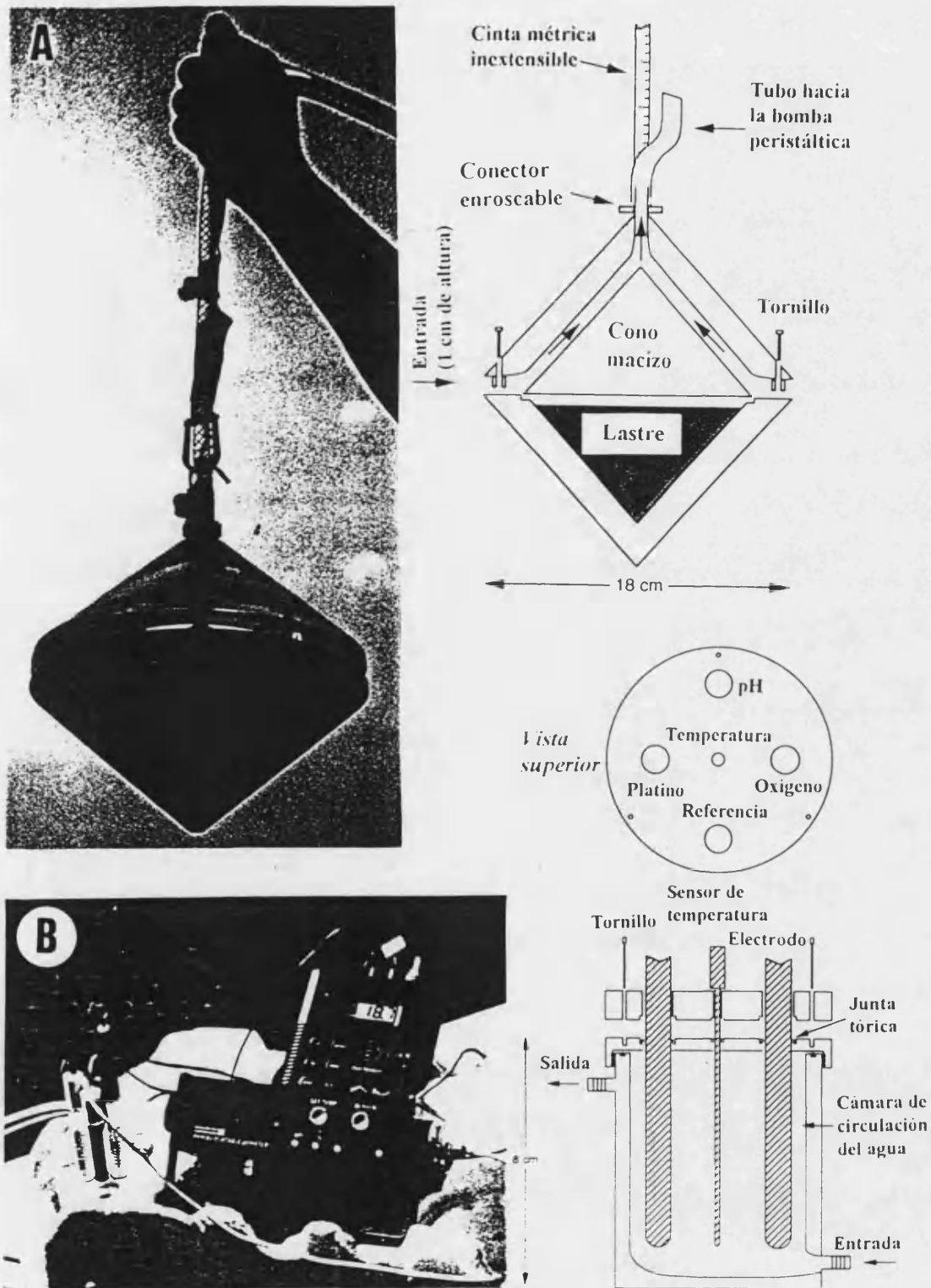


Figura 2.9 - (A) Muestreador biconico utilizado en el muestreo fino de la laguna, y (B) dispositivo para la medida en continuo del pH y el potencial de óxido-reducción. (Tomado de Rodrigo, 1997)

Figure 2.9.- (A) Biconic sampler used for fine-layer sampling in Lake Arcas and, (B) system used for on line measurement of pH and redox potential. (From Rodrigo, 1997).

La salida de la bomba peristáltica se bifurcaba por medio de un dispositivo de "by-pass" de manera que el flujo pudiera orientarse hacia una tubería con salida al exterior para el llenado de los recipientes de toma de muestra o bien hacia un recipiente de metacrilato diseñado para medir en continuo la temperatura, el pH y Eh del agua cuyo flujo pasa por el termistor y los electrodos allí instalados (figura 2-9). De esta manera, el paso de un flujo bajo pero continuo de agua de la muestra permitía determinar con precisión el pH y el potencial de óxido-reducción sin que esta muestra se pusiera en contacto con el aire. Para situar el muestreador en la profundidad deseada, se bajaba lentamente hasta esta profundidad y una vez alcanzada se desplazaba cuidadosamente de forma lateral para minimizar la perturbación, esperándose un par de minutos antes de comenzar la toma de muestra, que se dedicaban a renovar el volumen de agua contenido en el tubo y demás dispositivos de muestreo.

Existe otro método de muestreo fino que se ha utilizado en lagos estratificados. Este método comporta el uso de un muestreador laminar fino como el descrito por Baker *et al* (1985a), que básicamente consiste en una serie de jeringas que se adaptan perpendicularmente a un tubo acoplado a una bomba, de manera que al estar separadas estas jeringas por tan sólo 3 cm se puede realizar un muestreo aún más fino obteniéndose un gran número de muestras, que, como ventaja adicional, son obtenidas de manera simultánea (Gasol *et al.*, 1990) La versión mejorada de este aparato se encuentra descrita en Pedrós-Alió *et al* (1993). La limitada capacidad de las jeringas (normalmente 20 ml) hace que la cantidad de muestra obtenida sea muy pequeña. Esta limitación en el volumen de muestra, que era insuficiente para controlar todos los parámetros estudiados, nos aconsejaba el uso del sistema de doble cono al ser suficientemente preciso para los objetivos de este trabajo. Esta decisión se apoyó también en los resultados de Gasol y colaboradores (1991), que muestreando con ambos sistemas en el Lago Cisó para evaluar las poblaciones de *Cryptomonas*, realizó un estudio estadístico cuyos resultados le permitían aceptar la hipótesis de igualdad entre los dos sistemas. El sistema de doble cono tiene una resolución de hecho de alrededor de 5 cm (Gasol *et al.*, 1990), aunque el estudio más fino hecho por este método se hizo en intervalos de 2,5 cm de profundidad (Børsheim *et al.*, 1985).

Como ya se ha comentado anteriormente, en los periodos de mezcla total el muestreo se podía simplificar, ya que la homogeneidad vertical era muy grande, por lo que se muestreaba usando una botella hidrográfica de Ruttner. No obstante los muestreos en estas circunstancias son una minoría, ya que el estudio se intensificaba en los periodos de estratificación. La toma de muestras para la determinación de los organismos zooplanctónicos, pese a que este trabajo no se incluye en la presente tesis, se hacía utilizando una botella Van Dorn o redes de plancton de diversos tamaños. De forma adicional se tomaban redes verticales para obtener muestras concentradas que permitieran la clasificación de los

organismos del fito- y zooplancton, usando mallas de 20 y 45 μm respectivamente.

La frecuencia del muestreo oscilaba normalmente entre las dos y cuatro semanas, aunque en el periodo invernal, correspondiente a una situación de mezcla, los muestreos se podían distanciar más. Las campañas de muestreo específicas para la elaboración de este trabajo comenzaron en septiembre de 1989, prolongándose hasta diciembre de 1991, con un total de 34 campañas. No obstante, se realizaron una serie de campañas previas a lo largo de los años 1988 y 1989, alguno de cuyos resultados se incluye en esta memoria, efectuadas con el objeto de permitir un conocimiento anticipado del sistema para realizar la planificación del trabajo.

El muestreo se comenzaba midiendo los perfiles de diversos parámetros, empezando por el oxígeno disuelto, siguiendo por la conductividad y temperatura simultáneamente y terminando por la penetración de la luz. Para permitir la comparación de los datos los perfiles empezaban a medirse a las 12 del mediodía en el orden indicado, comenzándose la toma de muestras de agua aproximadamente una hora más tarde en orden de menor a mayor profundidad. Al terminar la toma de muestras se determinaba el perfil vespertino de oxígeno disuelto a fin de determinar las posibles variaciones de este parámetro a lo largo de la duración del muestreo. En la tabla 2-6 se detalla el procesado de las muestras de agua y el recipiente de toma.

Tabla 2.6.- Características de la toma de muestra para cada parámetro.
Table 2.6.- Main features of sampling for each parameter.

DETERMINACIÓN	RECIPIENTE	VOLUMEN (ml.)	TRATAMIENTO PREVIO	ADICIÓN DE REACTIVOS Y/O CONSERVANTES
Nitrato	Polietileno	250	Filtrado GF/F	2 ml ácido bórico
Nitrito	Polietileno	50	Filtrado GF/F	0.5 ml sulfanilamida
Amonio (fotom.)	Polietileno	50	Filtrado GF/F	50 μl nitrato mercúrico
Amonio (electr.)	Vidrio pyrex	125	Filtrado GF/F	1 ml HCl 6 N
Fósforo soluble	Polietileno	50	Filtrado GF/F	2 gotas cloroformo
Silicato	Polietileno	50	Filtrado GF/F	2 gotas cloroformo
Fósforo total	Vidrio pyrex	125	--	2 ml H ₂ SO ₄ 1:2
Sulfato	Polietileno	100	Filtrado GF/F	--
Cloruro	Polietileno	100	Filtrado GF/F	--
Alcalinidad	Vidrio pyrex	50	Aforar volumen	HCl valorado \approx 0.1 N
Sulfhídrico (fotom.)	Vial vidrio	20	1 ml muestra	85 μl reactivo
Sulfhídrico (electr.)	Tubo vidrio	50	Renovar volumen	25 ml SAOB II
Cationes	Polietileno	50	--	0.5 ml HNO ₃ 60 %
Hierro total	Vidrio topacio	250	Renovar volumen	0.5 ml H ₂ SO ₄ 1:2
Hierro soluble	Vidrio topacio	50	Filtrado GF/F	50 μl H ₂ SO ₄ 1:2
Pigmentos	Polietileno	1000	--	--
Recuento bacterias	Tubo vidrio	13	--	formol (conc. final 3 %)
Recuento algas y cianobacterias	Vidrio	250	--	2 ml lugol

La determinación del número de muestras a tomar y de las profundidades a que se debía hacer se realizaba sobre la marcha, una vez realizados los distintos perfiles verticales de parámetros *in situ*, siendo el oxígeno y la intensidad de la luz los más importante de ellos, ya que el muestreo se intensificaba en la zona de la interfase óxica-anóxica y sus proximidades, hasta la profundidad de extinción de la luz. Conociendo la situación de dicha interfase, se tomaban varias muestras alrededor de ella, con diferencias de 10 cm en el perfil vertical entre una muestra y otra, y de 20-30 cm en las contiguas a estas, de manera que en un rango de aproximadamente 1 metro por encima y por debajo de la interfase podían llegar a tomarse de 10 a 15 muestras. Además se tomaban muestras tanto del epilimnion oxigenado como del hipolimnion profundo, fijándonos en el primer caso especialmente en si había máximos de oxígeno ya que habitualmente coinciden con las máximas concentraciones de algas. En el caso del hipolimnion, las muestras se distribuían uniformemente en el perfil vertical a partir de la profundidad en la que la luz se extinguía totalmente y hasta el fondo. Todo ello hacia que en los periodos de estratificación se tomaran alrededor de 25 muestras por campaña, mientras que el muestreo se simplificaba enormemente durante la mezcla invernal.

La recogida de muestras se realizaba en diversos tipos de recipientes, realizándose cuando era necesario un tratamiento previo y/o añadiendo los correspondiente conservantes o reactivos (tabla 2-6). Las muestras se conservaban por regla general en la oscuridad y refrigeradas a 4°C hasta el momento de su procesado, aunque en algunos casos la refrigeración no era necesaria.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN LIMNOLÓGICA DE LA LAGUNA DE ARCAS

3.1.- INTRODUCCIÓN

La caracterización limnológica de la laguna, a pesar de ser un trabajo en parte rutinario, supone una información imprescindible para entender el establecimiento y desarrollo de poblaciones de microorganismos fotosintéticos en sus aguas. Este capítulo, al igual que el anterior, tiene un carácter básicamente descriptivo, centrándose la discusión, que por ello se entremezcla con la exposición de los resultados, en los aspectos relacionados con la estratificación de las aguas y las consecuencias físico-químicas y biológicas de este proceso. La caracterización que aquí se presenta abarca los años 1989, 1990 y 1991 y supone la continuación de trabajos previamente realizados por nuestro grupo en los años 1986 a 1988.

El estudio realizado entre los años 1989 y 1991 no se hizo de una forma totalmente uniforme. En una primera etapa, que abarcaba desde principio del año 1989 hasta la mezcla otoñal durante el mes de octubre, el seguimiento realizado consistía en la elaboración de una serie de muestreos periódicos en los que básicamente se medían los parámetros determinados *in situ* (O_2 , conductividad, temperatura, penetración luminosa, pH y Eh), cuyos resultados se han expresado en las correspondientes gráficas de isoclinas contenidas en este capítulo, aunque ocasionalmente se tomaban muestras para analíticas físico-químicas y biológicas, resultados que no se encuentran en esta memoria al tratarse de datos aislados.

A partir de la mezcla otoñal del año 1989 y hasta el final de 1991 el estudio se intensificó y diversificó en diversos sentidos. La frecuencia de los muestreos se acrecentó, de manera que se pudieran recoger datos más frecuentes sobre la evolución limnológica de la laguna y el desarrollo de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos. Fue a partir de esta fecha cuando se inició el estudio sistemático de la comunidad fotosintética microaerófila y anaerobia de la laguna, realizándose un estudio complementario de la concentración de nutrientes inorgánicos, así como de algunos parámetros relacionados con la actividad microbiana en las aguas, como la sulfato-reducción, con producción de H_2S , entre otros.

En consecuencia, el presente estudio contiene la evolución limnológica básica seguida en tres ciclos anuales, así como el seguimiento de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos en la interfase óxido-anóxica y el hipolimnion y las concentraciones de algunas especies químicas a lo largo de dos ciclos anuales completos.

3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

En esta sección se ha pretendido describir de forma extensa los métodos utilizados en la obtención de los parámetros físico-químicos medidos en la laguna, ya que algunos de ellos han sido ligeramente modificados respecto a los descritos en la bibliografía para adaptarlos a las especiales características físico-químicas de la Laguna de Arcas. Esto resulta también de utilidad ya que los métodos descritos en este trabajo sirven como guía para el trabajo en nuestro laboratorio por parte de otros compañeros.

3.2.1.- PARÁMETROS LIMNOLÓGICOS MEDIDOS *in situ*

3.2.1.1.- Temperatura (electrometría)

En todas las campañas de muestreo se realizaron perfiles verticales de temperatura, usando un sistema dual de termistores (ATC) instalados en la sonda de medida de la conductividad y el oxígeno. Se tomaban medidas de forma ajustada al gradiente, de manera que en las zonas de una mayor variación de temperatura la medida se realizaba cada 10 cm. Las medidas se espaciaban en las zonas donde el gradiente se hacía menos acusado o inexistente, tomándose lectura en estos casos cada 0,5-1 m.

3.2.1.2.- Oxígeno disuelto (polarimetría)

La determinación del oxígeno disuelto se realizó por polarimetría usando un electrodo tipo Clark (WTW modelo EOT-190) con ánodo de plata y cátodo de oro, al que se adosaba un dispositivo para asegurar la medida en agitación (WTW modelo BR-190), unido todo ello, por medio de un cable de 50 m de longitud, a un medidor digital WTW modelo OXI-91. El aparataje presentaba una precisión de 0,1 mg/l O₂ y la corrección de la temperatura era automática. El sistema de medida, alimentado por una pila de 9 V se dejaba conectado durante media hora para su polarización, tras lo cual, considerando la presión atmosférica y la temperatura, se procedía a su calibración en una cámara saturada de vapor de agua. El sistema de medida utilizado mide la saturación de oxígeno disuelto en el agua, no obstante también se obtenían los valores de concentración de oxígeno disuelto que venían dados por el medidor tras la autocorrección de la temperatura y, en su caso, la salinidad.

Las medidas se realizaban a lo largo del perfil vertical, tanto en sentido descendente como ascendente, de manera que se pudiera obviar el problema de la lenta respuesta del electrodo a bajas concentraciones de oxígeno. La lectura de los valores de saturación (%) y concentración (mg·l⁻¹) se efectuaba a intervalos de 10 cm de profundidad en la zona de la oxiclina en periodos de estratificación,

espaciándose estos intervalos entre 25-50 cm tanto en el resto del perfil vertical en situación de estratificación como en todo el perfil en época de mezcla. En cada muestreo se obtenían dos perfiles verticales de oxígeno disuelto, uno al principio del muestreo y otro al finalizar el mismo, de manera que se pudieran determinar las variaciones producidas durante el tiempo empleado en completar la campaña.

3.2.1.3.- Conductividad (electrometría)

La conductividad también se determinó en el perfil vertical, usando un conductímetro WTW LF-191 con electrodo de platino y con sonda de temperatura (ATC). El microprocesador del aparato transforma los valores como sus equivalente a 25°C (K_{25})

3.2.1.4.- pH y Eh (potenciometría)

Para la determinación *in situ* de estos parámetros se diseñó una cámara de flujo continuo consistente en un recipiente cilíndrico fabricado en metacrilato formado por dos cuerpos adaptables que dejan una cavidad en su interior, la cual constituye la cámara de medida (figura 2-9). El recipiente tiene cuatro orificios superiores adaptados a las medidas de los electrodos a utilizar, los cuales se podían introducir de esta manera en la cámara de medida y eran ajustados mediante juntas tóricas. La cámara tiene a su vez un orificio en su parte lateral inferior, por el cual entra el agua correspondiente a la muestra, impulsada por una bomba peristáltica de acuerdo con el sistema descrito en el capítulo 2, y derivada hacia la cámara usando tubos cuyo flujo se controlaba por medio de pinzas de Mohr. Así mismo, existe un orificio en la parte superior, por el que se evacua la muestra, de esta manera se consigue realizar una medida sobre un flujo continuo de agua de la muestra, inmediato a la muestra y en ausencia de oxígeno atmosférico.

La medida del pH se realizaba utilizando un electrodo combinado de vidrio y referencia Ross (ORION modelo 81-02SC), y una sonda de temperatura (ORION, ATC modelo 917001) conectados a un medidor digital portátil (ORION modelo SA-250), calibrándose todo el sistema con soluciones tampón de pH=7 y pH=10. Para la determinación del potencial de óxido-reducción se utilizó un electrodo de platino (ORION modelo 96-78) y un electrodo de referencia Ross (ORION modelo 90-02), conectados a un medidor potenciométrico (RADIOMETER modelo PHM-80); posteriormente los resultados obtenidos eran transformados para ser referidos al potencial estándar del hidrógeno y obtener los valores de Eh, para lo cual se realizaba la medida de una solución patrón cuyo potencial de óxido-reducción era conocido. Estos electrodos se introducían en la cámara de flujo anteriormente descrita, de manera que la medida se realizaba sobre un flujo continuo, teniendo en cuenta el tiempo necesario para la

renovación del agua de todo el sistema de tuberías y para la estabilización de las medidas.

3.2.2.- PARÁMETROS DETERMINADOS EN EL LABORATORIO

En este apartado se describen los métodos de laboratorio utilizados para la determinación de diversos parámetros. Los métodos descritos en esta sección resultan de pequeñas modificaciones de aquellos que vienen descritos por la bibliografía general de análisis de agua (APHA-AWWA-WPCF, 1989; Golterman *et al.*, 1978; Strickland y Parsons, 1972; Rodier, 1984; Wetzel y Likens, 1979), cuando dichas modificaciones contribuyen a mejorar las condiciones experimentales.

En la preparación de reactivos se señalan cantidades indicativas, no obstante la cantidad a preparar de cada reactivo será la adecuada para el número de muestras y patrones que se deben medir, salvo aquellos reactivos que se puedan almacenar sin sufrir alteraciones.

En la descripción del fundamento de cada método se da el rango de concentraciones en que el método es aplicable, cuando la concentración del compuesto es inferior al límite inferior de detección los resultados se consignan como "menor de ese límite", si bien la bibliografía antes señalada describe métodos de concentración de muestra para la determinación de algunos parámetros, los cuales no era necesario aplicar para cumplir los objetivos de este trabajo. Si la concentración del compuesto superaba el límite superior del rango de aplicabilidad del método, la solución era tan sencilla como efectuar la dilución de las muestras que superaban dicho límite, hasta conseguir que la concentración se situase en el rango adecuado de medida

Muchas de las determinaciones se realizaron usando técnicas de espectrofotometría, empleándose en todas ellas un espectrofotómetro UV-Visible Beckman modelo DU-7 controlado con un microprocesador y que opera en el rango 190-900 nm. Dicho aparato se complementaba con un dispositivo de salida de datos que permitía el almacenaje de los mismos por medio de un sistema computerizado.

3.2.2.1.- Nitrito (colorimetría)

Fundamento

Basado en la reacción de Griess. En medio ácido, el nitrito se transforma en ácido nitroso, el cual reacciona con la sulfanilamida formando una sal diazónica, que reacciona de forma cuantitativa con la naftil-etilen-diamida para dar un compuesto que toma una coloración rosada detectable cuantitativamente por

espectrofotometría (Golterman *et al.*, 1978). El límite inferior de detección del método se encuentra en 0,01 μM .

Reactivos

- Sulfanilamida.- 5 g de sulfanilamida se disuelven en una mezcla de HCl concentrado con 300 ml de agua destilada, tras disolverse se completa hasta 500 ml con agua destilada. La solución se conserva en el refrigerador y es estable durante varios meses.
- N-(1-naftil)-etilendiamina dihidrocloruro (NNED).- Se prepara un reactivo de concentración 0,1 % (p/v) disolviendo 0,5 g de NNED en 500 ml de agua destilada. Esta solución debe guardarse en un frasco oscuro y debe ser renovada una vez al mes o antes si toma una coloración marrón.
- Solución patrón de nitrito.- Se deseca NaNO_2 comercialmente anhidro a 110 °C durante una hora. Se pesan 6,90 g y se disuelven en agua destilada hasta 1 litro. Se añade 1 ml de cloroformo y se guarda en una botella opaca. Esta solución de NO_2^- es 0,1 M y a partir de ella se pueden preparar los patrones de las concentraciones deseadas usando material volumétrico.

Procedimiento

Se toman 25 ml de agua filtrada simultáneamente a su recogida, a la cual se le añade inmediatamente 0,5 ml de la solución de sulfanilamida para estabilizar el nitrito, guardándose en botella de plástico. Ya en el laboratorio y en las siguientes 24 horas, se añade 0,5 ml de NNED y, tras esperar unos minutos se mide la absorbencia a 530 nm frente a un blanco preparado con agua destilada y las mismas cantidades de reactivos. Caso de que las muestras tengan coloración, se hace una medida de la muestra añadida de sulfanilamida pero sin NNED y su absorbencia se descuenta a la medida para la muestra adicionada de ambos reactivos.

3.2.2.2.- Nitrato (colorimetría)

Fundamento

El nitrato se puede reducir de forma cuantitativa a nitrito al hacer pasar la muestra en solución alcalina tamponada (pH=8) por una columna reductora de cadmio cuperizado, estimándose el nitrito resultante por espectrofotometría de absorción (Golterman *et al.*, 1978). El límite inferior de detección del método se encuentra en 0,02 μM

Reactivos y material

- Solución concentrada tampón de cloruro amónico.- Se disuelven 100 g de NH_4Cl en agua destilada, añadiendo a continuación 20 g de tetraborato sódico y 1 g de la sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético, y completando hasta 500 ml con agua destilada. Se guarda en botella de plástico a temperatura ambiente y se conserva durante meses.

- Solución tampón diluida de cloruro amónico.- Se diluyen 10 ml de la solución anterior en agua destilada hasta 400 ml.
- Solución de sulfato de cobre.- Se prepara disolviendo 5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de agua destilada.
- Sulfanilamida y NNED.- Se preparan tal como se describió anteriormente en el análisis del nitrito.
- Solución patrón de nitrato.- Se pesan 8,499 g de NaNO_3 seco y se disuelven en agua destilada hasta 1 litro. La solución resultante tiene una concentración 0,1 M de NO_3 y es estable largo tiempo en ausencia de evaporación, pudiéndose preparar a partir de ella los patrones deseados.
- Columna reductora de cadmio cuperizado.- Se emplea un tubo de vidrio de 1 cm de diámetro y 30 cm de longitud, cuya parte superior está ensanchada y puede contener un volumen de 100 ml. La parte inferior comunica con un tubo capilar en forma de cuello de cisne por medio de un tubo de goma siliconizada, con una pinza para regular el flujo. Se toman limaduras de cadmio en cantidad suficiente para llenar al menos 15 cm de la columna. Se colocan las limaduras en un vaso de precipitados y se añade la solución de sulfato de cobre, a razón de 10 ml por cada 5 g de limaduras, agitando hasta que desaparezca el color azul de la solución, decantándose y lavándose con tampón varias veces hasta que no queden partículas finas. La base de la columna se tapa con fibra de vidrio, y se llena ésta con la solución de cloruro amónico diluido, añadiéndose las limaduras de manera que no queden atrapadas burbujas de aire. Se pone otro tapón de fibra de vidrio en la parte superior de la columna y se lava la columna varias veces con tampón diluido a un flujo de 10 ml/min. La columna no debe secarse nunca, sino mantenerse llena de solución diluida de cloruro amónico. Cuando la columna pierde poder reductor o se seca, deben sacarse las limaduras y tratarlas con ácido clorhídrico 5 % (v/v), lavarlas con agua destilada hasta eliminar los restos de ácido, y someterlas de nuevo al tratamiento descrito.

Procedimiento

Se toma 100 ml de muestra (diluida 1/2 en las muestras epilimnéticas) filtrada en el proceso de recogida y se tampona por adición de 2 ml de solución de cloruro amónico concentrada. La muestra así preparada se coloca en el reservorio superior de la columna y se regula el flujo de salida correctamente. Los primeros 70 ml se desechan, y los 25 ml siguientes se recogen en un cilindro graduado, añadiendo 0,5 ml de sulfanilamida para estabilizar el nitrito, y manteniéndolo en la oscuridad para prevenir la reoxidación hasta la finalización del proceso de reducción de todas las muestras, blancos y patrones. A continuación, se añade 0,5 ml de NNED y se determina la absorbencia a 530 nm de la muestra respecto a un blanco de agua destilada tratada de la misma manera que las muestras. Los valores obtenidos suponen la suma de las cantidades de nitrato y nitrito, por lo cual se les sustraía los valores de nitrito para obtener la concentración de nitrato en la muestra. El color del agua, si lo hay, se corrige como en el caso anterior.

3.2.2.3.- Amonio

Para determinación del amonio se emplearon dos metodologías alternativas, la determinación potenciométrica por medio de un electrodo selectivo indicado para concentraciones medias y altas, y una modificación del método del fenol-hipoclorito, que resultaba más sensible para la detección de bajas concentraciones, que se basa en la medida colorimétrica de la formación de azul de indofenol.

A) Método potenciométrico

Fundamento

La determinación se realiza utilizando un electrodo selectivo de amonio (ORION modelo 95-12) conectado a un medidor de diferencia de potencial (ORION modelo EA- 920). El amonio contenido en la muestra pasa a amoniaco gaseoso al pasar a medio fuertemente alcalino, el cual atraviesa la membrana hidrofóbica permeable a gases del electrodo, hasta que la presión parcial de amoniaco se iguala a ambas partes de la membrana. Dicha presión parcial es proporcional a la concentración de amonio en la muestra y se evalúa mediante la diferencia de potencial causada por el cambio de pH en el interior del electrodo (Orion Research, 1982, 1983). La respuesta del electrodo es buena en el rango de 10 μ M hasta 100 mM y debe comprobarse la pendiente de respuesta (-57 ± 3 mV para un incremento de un orden de magnitud).

Reactivos

- NaOH 10 N.- Preparado disolviendo 40 g de lentejas de hidróxido sódico en agua destilada.
- Solución patrón de cloruro amónico.- Se disuelven 0,535 g de NH_4Cl hasta 50 ml de agua destilada a la que se ha añadido previamente 0,5 ml de HCl 6 N. De esta manera el patrón primario (0,1 M) permanece inalterable al no producirse fugas de amoniaco dado el bajo pH. A partir de este patrón primario se preparan los patrones necesarios para cada determinación dependiendo del rango de concentraciones en que se vaya a medir.

Procedimiento

Se toman 100 ml de la muestra, tratada previamente con 0,5 ml de HCl 6 N inmediatamente después de su recogida en botella de vidrio, en un vaso de precipitados, se coloca en un agitador magnético y se sumerge el electrodo en la muestra de forma oblicua para evitar la formación de burbujas en la membrana. Se añade 1,25 ml de NaOH 10 N y se espera hasta que el valor de la lectura se estabiliza. El mismo procedimiento se utiliza para establecer la recta de calibración a partir de los patrones preparados al efecto.

B) Método del azul de indofenol (colorimetría)

Fundamento

La técnica es una modificación del método del fenol-hipoclorito usando nitroprusiato sódico como catalizador (Rodier, 1984). En medio alcalino, el amoníaco reacciona con el fenol y el hipoclorito para formar azul de indofenol. El desarrollo del color es proporcional a la concentración de amonio en el agua en un rango de 0,5-70 μM , debiendo diluirse las muestras con concentraciones superiores.

Reactivos

-Tampón fosfato.- Se disuelven 25 g de Na_3PO_4 en 500 ml de agua. Se conserva en refrigeración a 4 °C.

- Fenol.- Se disuelven 500 g de fenol (previamente calentado en un baño a 70 °C para hacerlo líquido) hasta 800 ml con metanol. Se conserva a 4 °C en botella oscura.

- NaOH 27 %.- Se disuelven 27 g de lentejas de hidróxido sódico hasta 100 ml en agua destilada. Se conserva a temperatura ambiente.

- Patrón de amonio.- Se puede utilizar el mismo patrón primario descrito anteriormente para la preparación de los patrones a utilizar.

- Reactivo A.- Se toman 15 ml de la solución de fenol en metanol, se le añade 0,02 g de $\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (nitroprusiato sódico) y se lleva a 100 ml con agua destilada.

-Reactivo B.- Se mezclan volúmenes iguales (15 ml) de hipoclorito sódico (lejía comercial de 5 % de cloro) y de la solución de NaOH 27 % diluyendo con agua destilada hasta un volumen final de 50 ml.

Tanto el reactivo A como el B se preparan inmediatamente antes del uso.

Procedimiento

Se toman 25 ml de cada muestra, así como de agua destilada (blanco) y de los patrones, colocándolos en cilindros graduados de 50 ml. Se añade 1 ml de tampón fosfato y se agita vigorosamente (aparece un precipitado), a continuación se le añade 2.5 ml del reactivo A, se vuelve a agitar, y por último se añade 1.25 ml del reactivo B. Se mezcla bien, y protegiendo de la luz, se espera durante 1 hora para permitir el total desarrollo del color. Los cilindros deben de estar tapados para evitar la fuga de amoníaco durante la reacción. Finalmente, se mide la absorbencia de las muestras a 630 nm frente al blanco, determinándose la concentración de amonio mediante la recta de calibrado efectuada con los patrones preparados al efecto. Aguas muy duras o con elevada salinidad producen precipitados con el tampón fosfato, los cuales pueden ser eliminados mediante la adición de EDTA.

3.2.2.4.- Fósforo

En la determinación de este elemento, fundamental como nutriente para los organismos fotosintéticos acuáticos, se pueden medir distintas fracciones. En primer lugar se puede distinguir entre la fracción soluble y la particulada (Golterman *et al.*, 1978). Además, dentro de cada uno de estos apartados pueden determinarse diversas fracciones como el fósforo reactivo soluble (que obviamente solo se encuentra en la primera fracción), el fósforo hidrolizable y la evaluación del fósforo total en ambas fracciones. En este trabajo solo se hicieron las dos determinaciones más acordes con los objetivos del trabajo, el fósforo reactivo soluble, que evalúa el ortofosfato disponible para los microorganismos, así como la fracción total, que en nuestro caso evalúa mayoritariamente la fracción orgánica contenida en los propios organismos planctónicos.

A) - Fósforo reactivo soluble (colorimetría)

Fundamento.

En medio fuertemente ácido, el ortofosfato reacciona con el ion molibdato para dar un compuesto de color amarillo, el ácido fosfomolibdico, cuya posterior reducción con ácido ascórbico da lugar a un complejo de color azul cuya formación se ve favorecida por el antimonio. El método es aplicable en el rango 0,03-16 μM .

Si se pretende determinar la concentración de fósforo externo disponible para los microorganismos (ortofosfato) la muestra debe ser filtrada en el momento de su recogida (Blakar y Løvstad, 1990)

Reactivos

- Solución de molibdato amónico.- Se disuelven 15 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada.
- Solución diluida de ácido sulfúrico.- Se prepara disolviendo 140 ml de H_2SO_4 concentrado hasta 900 ml con agua destilada.
- Solución de tartrato antimónico potásico.- Disolver 0,34 g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ en 250 ml de agua destilada.
- Reactivo A. Se prepara a partir de los tres anteriores, mezclando 100 ml de la solución de molibdato, 250 ml de la solución sulfúrica diluida y 50 ml de la de tartrato. Este reactivo se guarda en botella de vidrio en la nevera y es estable durante al menos tres meses.
- Solución de ácido ascórbico.- Preparada disolviendo 3,86 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ hasta 100 ml de agua destilada.
- Reactivo mixto. Se prepara mezclando el reactivo A con la solución de ácido ascórbico en la proporción 4:1 (v/v). Este reactivo sólo es estable durante unas horas, por lo que debe prepararse el mismo día del análisis.
- Solución patrón de fosfato. Se pesan 0,817 g de KH_2PO_4 previamente desecado y se disuelven en agua destilada completando hasta un litro. A la solución patrón

se le añaden unas gotas de cloroformo y se guarda en nevera. Esta solución tiene una concentración 6 mM de fosfato y a partir de ella se pueden preparar los patrones necesarios para cada determinación.

Procedimiento

Se toman 25 ml de agua de la muestra (filtrada en el momento de su recogida a través de un filtro de fibra de vidrio) en un cilindro graduado. Las muestras procedentes del hipolimnion se burbujan con N₂ hasta que desaparece el olor a sulfhídrico, dado que se comprobó que este compuesto interfería en el análisis. Se añaden 5 ml del reactivo mixto, se mezcla bien, y tras 10 minutos y antes de 2 horas se mide la absorbencia a 882 nm frente al blanco de, agua destilada tratado igual que las muestras. Las absorbencias obtenidas se comparan frente a la recta patrón para determinar la concentración de fosfato soluble en la muestra. Todas las muestras hipolimnéticas, que contenían altas concentraciones de sulfhídrico, eran sometidas a burbujeo con N₂ para evitar las posibles interferencias del mismo en la determinación.

B) - Fósforo total (colorimetría)

Fundamento

La digestión ácida de las muestras provoca que los polifosfatos y los compuestos orgánicos fosforados se hidrolicen a ortofosfato, cuya concentración puede ser determinada por el método expuesto anteriormente.

Reactivos

- Ácido sulfúrico 9 M.- Preparado diluyendo H₂SO₄ concentrado (96 %, d=1.84) en agua destilada.
- Persulfato potásico.- Se añade 1 g para 50 ml de muestra.
- Reactivo A.- Se disuelven 4,8 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O hasta 100 ml de agua destilada, y 0,1 g de tartrato antimónico potásico en 50 ml de agua destilada. Ambas soluciones se mezclan y se añade el H₂SO₄ necesario de manera que la concentración de final de ácido en la muestra al hacer la determinación sea 0,2-0,23 M, completándose con agua destilada hasta un volumen de 500 ml.
- Solución de ácido ascórbico.- Preparada disolviendo 2 g de ácido ascórbico en 100 ml de agua destilada.
- Solución patrón de fosfato. Se utiliza la misma solución de patrón primario que en la determinación del fósforo reactivo soluble, preparándose a partir de la misma los patrones diluidos que se someten al mismo tratamiento que las muestras.

Procedimiento

Se toman 50 ml de muestra y se les añade, en el momento de su recolección 0,8 ml de H₂SO₄ 9M para llevar la muestra a una concentración 0,14 M. Ya en el laboratorio se le añade 1 g de K₂S₂O₈ (persulfato potásico), realizando una digestión en el autoclave a 2 atmósferas (135°C) durante dos horas, tratándose de

la misma manera el blanco y los patrones. Una vez digeridas y enfriadas las muestras, se toman 25 ml en un cilindro graduado y se les añade 2.5 ml del reactivo A y 1 ml de la solución de ácido ascórbico, se agita y tras 10 minutos se realiza la lectura de la absorbencia a 882 nm de las muestras y los patrones, calculándose la concentración de las primeras por interpolación en la recta construida con los patrones.

En el periodo final del estudio se modificó la técnica utilizada una vez digeridas las muestras, cuando el fósforo ya se encontraba en disolución. Finalizada dicha digestión las muestras se neutralizaban utilizando NaOH de distintas concentraciones hasta situar el pH entre 7 y 8. Posteriormente las muestras, patrones y blancos, se trataban con los reactivos usados en la determinación del fósforo soluble de la misma manera que las muestras de esa determinación, aunque sin filtrar. Con ello se consiguió mejorar ligeramente la exactitud del método

3.2.2.5.- Silicato reactivo soluble

Fundamento

El silicato reacciona con el molibdato amónico en medio ácido, dando ácido molibdosilícico, de color amarillo, el cual puede ser reducido a óxido molibdosilícico, cuya coloración azulada resulta proporcional al silicato contenido en la muestra (Rodier, 1984). El ácido oxálico usado como reactivo destruye el ácido molibdofosfórico con lo que se evita la interferencia del ortofosfato. La determinación sigue la linealidad en el rango 0,1-140 μM .

Reactivos

- Solución de molibdato amónico. Se prepara disolviendo 4 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ más 12 ml de HCl concentrado en agua destilada hasta 300 ml. Se conserva en botella de plástico en nevera y en la oscuridad, siendo estable durante más de seis meses.
- Solución de metol-sulfito.- Se disuelven 6 g de sulfito sódico anhidro en agua destilada hasta completar 500 ml. Se añaden 10 g de sulfato de p-metilaminofenol, filtrándose si una vez disuelto quedan cristales.
- Solución de ácido sulfúrico.- Diluido al 50 %.
- Solución de ácido oxálico. Se disuelven 10 g de $(\text{COOH})_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada hasta 100 ml.
- Reactivo mixto de uso inmediato.- Se prepara mezclando, en el siguiente orden, 100 ml de la solución de metolsulfito con 60 ml de la solución de ácido oxálico y 60 ml de ácido sulfúrico 50 %, completándose hasta 300 ml con agua destilada.
- Solución patrón de fluorosilicato sódico.- Se toman 9,60 g de Na_2SiF_6 (previamente desecado) y se diluye con agua destilada hasta 1 litro, resultando un patrón primario de 50 mM de sílice. Este patrón, que se conserva en botella de plástico en el refrigerador, sirve para preparar los patrones correspondientes al rango de concentraciones a medir.

Procedimiento

En un cilindro graduado de 50 ml de capacidad, se colocan 10 ml de la solución de molibdato, añadiéndose seguidamente 25 ml de muestra, previamente burbujeada con N₂ para eliminar la interferencia del sulfhídrico. Tras 3 minutos, se añaden 15 ml de reactivo mixto y se mezcla bien. Se espera dos horas y se determina la absorbencia a 810 nm de las muestras y los patrones frente al blanco de agua destilada tratado de igual manera que las muestras. La recta de calibrado obtenida con los patrones sirve para interpolar los valores de absorbencia obtenidos en la muestra y calcular así las respectivas concentraciones. Las muestras de la Laguna de Arcas se diluían normalmente 1/5.

3.2.2.6.- Sulfato (turbidimetría)**Fundamento**

Se utiliza el método turbidimétrico. Los sulfatos son precipitados como cristales de tamaño uniforme de sulfato de bario al tratar la muestra con cloruro de bario en medio ácido. El precipitado obtenido se estabiliza con la ayuda de una solución de polivinil-pirrolidona, determinándose la densidad óptica de las muestras a 650 nm. Este método es aplicable directamente en muestras con concentraciones de sulfato en el rango 10-450 µM.

Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico diluido 1/10.
- Solución de polivinil-pirrolidona.- Preparada a una concentración del 25 % (p/v).
- Solución estabilizada de cloruro de bario.- Se prepara disolviendo 10 g de cloruro de bario y 5 ml de la solución 25 % de polivinil- pirrolidona en agua destilada hasta completar 100 ml.
- Patrón primario de sulfato sódico. Se prepara disolviendo 0,1775 g de sulfato sódico anhidro en agua destilada hasta completar un litro. El patrón así preparado tiene una concentración de 120 mg·l⁻¹ (1,25 mM) y se utilizà para preparar los patrones deseados en el rango a medir.

Procedimiento

Se depositan 39 ml de la muestra (previamente filtrada para eliminar las partículas en suspensión que pueden interferir en la determinación) en un cilindro graduado de 50 ml de capacidad. Se añade 1 ml de ácido clorhídrico 1/10 y 5 ml de la solución estabilizada de cloruro de bario. Se agita enérgicamente, se deja reposar durante 15 minutos y tras agitar de nuevo se realiza la lectura de la absorción a 650 nm de muestras y patrones frente al blanco preparado con agua destilada y tratado de la misma manera que las muestras. La dilución habitual de las muestras utilizada en la Laguna de Arcas fue de 1/50

3.2.2.7.- Alcalinidad (volumetría)

Fundamento

La alcalinidad del agua es una medida de su capacidad de neutralización de ácidos. La alcalinidad del agua se debe principalmente a la presencia de bicarbonato, carbonato e hidróxidos, y en menor medida a boratos, fosfatos y silicatos alcalinos fuertes ligados a ácidos débiles. La reserva alcalina se evalúa desplazando el equilibrio de forma que los carbonatos y bicarbonatos se transformen en CO₂ con un volumen conocido de ácido clorhídrico, cuyo exceso se valora así mismo con NaOH de manera que se puede calcular la alcalinidad total considerando el ácido "consumido" para neutralizar la muestra.

Reactivos

- Solución de ácido clorhídrico $\cong 0,1$ N.- Se disuelven 8 ml de HCl concentrado en agua destilada hasta completar un litro.
- Solución de hidróxido sódico $\cong 0,1$ N.- Para prepararla se disuelven 4 g de NaOH en agua destilada hasta completar un litro.
- Solución de biftalato potásico.- Se usa para valorar exactamente la normalidad de la sosa.
- Indicador mixto.- Utilizado como indicador en la valoración de la sosa sobre el exceso de ácido. Se prepara disolviendo 0,02 g de rojo de metilo y 0,1 g de verde de bromocresol en 100 ml etanol. El viraje se produce a pH = 4,5.

Procedimiento

En primer lugar se valora exactamente la normalidad de la solución de hidróxido sódico valorando un peso conocido de biftalato potásico disuelto en agua, utilizando fenoftaleina como indicador. De esta manera se calcula la normalidad de la sosa y a continuación se valoran 10 ml de la solución de ácido clorhídrico para evaluar su normalidad exacta. A continuación, se toman 50 ml de agua de la muestra en un matraz, se le añade tres gotas de indicador mixto, y se va adicionando ácido clorhídrico de la solución previamente valorada, de 5 en 5 ml hasta que el indicador toma color salmón (aunque inmediatamente a la recogida de la muestra se añadía ya 5 ml y en la mayoría de las ocasiones no era necesario añadir más). Seguidamente, se calienta a ebullición para eliminar el CO₂. Tras enfriarse, se valora el exceso de ácido con la solución de hidróxido sódico hasta que el indicador vira a un color verde-azulado. La alcalinidad total (TA) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$TA(\text{meq} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{(V_{\text{HCl}} \cdot N_{\text{HCl}}) - (V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}})}{V_{\text{muestra}}}$$

Si la cantidad de fosfato, silicato y/o borato fuese grande debería añadirse al de la alcalinidad total, no obstante, en nuestras observaciones no era necesario. A partir de la alcalinidad total y de los valores de pH y conductividad de la muestra

podríamos calcular la alcalinidad debida a carbonatos (CA) y el CO₂ total, usando coeficientes multiplicativos basados en la constante de equilibrio carbónico-carbonato.

3.2.2.8.- Cloruro (volumetría)

Fundamento

En medio neutro, el cromato potásico puede indicar el punto final de la valoración del cloruro con nitrato de plata de normalidad conocida. En la reacción se produce un precipitado de cloruro de plata, que se sigue formando cuantitativamente mientras queda cloruro en solución. Una vez agotado el cloruro, se forma cromato de plata, cuyo característico color rojo sirve como indicador del punto final de la reacción (Strickland y Parsons, 1972).

Reactivos

- Solución de nitrato de plata.- Se disuelven 4,79 g de AgNO₃ en agua destilada hasta completar un litro. Con esto se consigue una concentración aproximadamente 0,0282 N, cuya normalidad exacta se valora frente a una disolución patrón de NaCl 0,1 N. Esta solución se almacena en botella opaca y puede ser preparada en otras concentraciones en función del contenido en cloruros de la muestra a evaluar.
- Indicador de cromato potásico. Se prepara una disolución de K₂CrO₄ al 10 % (p/v) en agua destilada.
- Solución patrón de cloruro sódico. Se prepara un patrón primario de NaCl 0.1 N a partir de la cual se podrían preparar patrones más diluidos si fuese necesario.

Procedimiento

Se toma un volumen conocido de muestra (previamente filtrada), se adiciona unas gotas de indicador y se valora añadiendo la solución de nitrato de plata desde una bureta de vidrio actínico. El punto final de la valoración viene indicado por el viraje de color amarillo a anaranjado-rojizo que debe persistir al menos durante un par de minutos. Conocido el volumen de nitrato de plata y su normalidad, podemos calcular la concentración de cloruro de un volumen conocido de muestra, siendo esta:

$$N_{Cl^-} = \frac{V_{AgNO_3} \cdot N_{AgNO_3}}{V_{muestra}}$$

3.2.2.9.- Sulfuro de hidrógeno

Para esta determinación se utilizaron dos técnicas, una potenciométrica usando un electrodo selectivo y otra colorimétrica. En cualquier caso, la manipulación de las muestras y la preparación de los patrones debe ser extremadamente cuidadosa

para evitar las pérdidas de sulfuro de hidrógeno (gas) o su oxidación por el oxígeno.

A) Método potenciométrico.

Fundamento

La determinación potenciométrica del sulfuro se realizaba utilizando un electrodo selectivo de $\text{Ag}^+/\text{Ag}_2\text{S}$ (Orion modelo 94-16) y un electrodo de referencia de doble cuerpo (Orion modelo 90-02) conectados a un medidor de diferencia de potencial (Orion modelo EA-920).

El electrodo selectivo tiene una placa de plata/sulfuro de plata incluida en un cuerpo de plástico epoxy. Cuando la membrana entra en contacto con una solución que contiene iones sulfuro se crea una diferencia de potencial dependiente de la concentración de sulfuro libre, la cual se determina frente a la referencia constante del electrodo de referencia midiéndose con el medidor de diferencia de potencial (Orion Research, 1980).

Para prevenir la oxidación de los sulfuros de la muestra esta se adiciona de un tampón antioxidante (SAOB II - "sulfide anti-oxidant buffer") que sirve también para ajustar la fuerza iónica. El tampón contiene, entre otros compuestos, ácido ascórbico, que reduce el potencial redox previniendo la oxidación del sulfuro. El electrodo detecta sólo el ion sulfuro en su forma libre, de manera que aquellos compuestos en los que el ion sulfuro forma complejos no son detectados por el método, el tampón antioxidante contiene EDTA cuya acción quelante previene la formación de sulfuros metálicos. La medida a pH muy alcalino (dada la alta concentración en NaOH del tampón antioxidante) hace que el equilibrio $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$ este desplazado hacia la forma más ionizada, que es la detectada por el electrodo. La pendiente de la medida debe ser próxima a -28 mV por orden de magnitud. El manual del electrodo dice que es utilizable en el rango de concentraciones 10^{-7} - 10^0 M, sin embargo nuestra experiencia nos indica que este método no debe utilizarse a concentraciones por debajo de $20 \mu\text{M}$.

Reactivos

- Tampón antioxidante (SAOB II).- Se prepara el día anterior de la toma de muestras, tomando 600 ml de agua destilada desaireada, añadiendo 200 ml de NaOH 10 M, 35 g de ácido ascórbico y 67 g de EDTA disódico, todo ello se ajusta a un litro con agua destilada desaireada. La solución resultante debe tener una coloración amarillo-anaranjada pálida, la cual se torna más oscura o marrón cuando el tampón se ha oxidado. Este tampón se guarda en botellas de vidrio totalmente llenas (sin dejar burbujas de aire) y herméticamente cerradas.

- Solución de perclorato de plomo.- Se prepara una solución 0,1 M de $\text{Pb}(\text{ClO}_4)_2$. Esta solución se utiliza para valorar el patrón primario de sulfuro registrando la variación de la diferencia de potencial en el sistema de medida durante la adición de perclorato.

- Solución patrón de sulfuro sódico.- Se prepara un patrón primario a partir de cristales lavados de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ disueltos en agua destilada desaireada, la concentración exacta de este patrón primario se valora por titulación con perclorato de plomo o por iodometría, este patrón se puede conservar en una botella herméticamente cerrada a $\text{pH}=13$, al cual no se producen pérdidas de sulfuro. Los patrones diluidos se preparan a partir del patrón primario por dilución en una solución 1:1 de SAOB II y agua destilada desaireada.

Procedimiento

La muestra de agua cuya concentración de sulfuro libre queremos determinar se mezcla en el momento de su recogida con SAOB II en proporción 1:1. Ya en el laboratorio, se determina la diferencia de potencial en mV provocada por la muestra en el sistema de medida, comparándose dichos valores con los obtenidos a partir de los patrones del rango de concentración adecuado y calculándose la concentración de sulfuro en la muestra por interpolación en la recta elaborada a partir de los patrones

B) Método colorimétrico

Fundamento

La determinación del sulfuro de hidrógeno mediante el método clásico del azul de metileno, modificado y mejorado por distintos autores, permite la cuantificación de la cantidad de esta sustancia disuelta en el agua. El método es aplicable en el rango de 1-1000 μM , preparándose el reactivo a diferentes concentraciones en función de el rango de concentración de sulfuro de hidrógeno a medir. El método, adaptado en nuestro caso, evalúa todas las formas de sulfuro de hidrógeno disuelto ($\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$), resulta altamente preciso ($\pm 2\%$ al 95 % de confianza) y presenta pocas interferencias (Cline, 1969).

Reactivos

- Preparación del reactivo mixto de diamina. En 500 ml de ácido clorhídrico, diluido al 50 % (v/v) con agua destilada, se disuelven las cantidades necesarias, indicadas en la tabla siguiente, de sulfato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina y de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$). El reactivo se guarda refrigerado en la oscuridad y, en el caso de los dos más concentrados, es estable durante varios meses. En las dos concentraciones inferiores el reactivo excede en mucho la concentración necesaria con el fin de aumentar la estabilidad del mismo.

Concentración de sulfuro de hidrógeno (μM)	Concentración de diamina (g/l)	Concentración de cloruro férrico (g/l)	Factor de dilución (ml:ml)	Paso óptico cubeta(cm)
1 - 3	1	1,5	1 : 1	10
3 - 40	4	6	1 : 1	1
40 - 250	16	24	2 : 25	1
250 - 1.000	40	60	1 : 50	1

- Preparación de los patrones de sulfuro sódico. A partir del patrón primario, preparado de forma similar a la del método potenciométrico, se preparan patrones más diluidos (en agua desaireada) para elaborar una recta de calibrado en el rango deseado, se neutraliza y se procede de igual manera que con las muestras.

Procedimiento

Cuando los rangos de concentraciones a medir son conocidos, como era el caso, se puede adaptar el procedimiento para evitar utilizar diferentes reactivos. En nuestro caso utilizamos el reactivo adaptado para el rango 40-250 μM , diluyéndose las muestras que se suponía más concentradas. Se colocaban 19 ml de agua destilada en un vial de vidrio, añadiéndose 1 ml (o la cantidad correspondiente a la dilución deseada) y 85 μl de reactivo mixto de diamina, agitándose y protegiéndose de la luz. Transcurridos unos 20 minutos se podía determinar la absorbencia a 670 nm, calculándose la concentración de la muestra por interpolación en una recta de calibrado.

3.2.2.10.- Calcio y Magnesio (Espectrofometría de absorción atómica).

Fundamento

La concentración de estos dos cationes se ha determinado utilizando la técnica de espectrometría de absorción atómica (APHA-AWWA-WPCF, 1989), basada en la propiedad de los átomos de absorber un quanta de energía a una determinada longitud de onda.

Reactivos

- Cloruro de lantano.- Se prepara una solución 0,2 M disolviendo 37,13 g de cloruro de lantano seco en agua destilada hasta 500 ml, acidificando con HCl al 1 %.

- Soluciones patrón. Se prepara un patrón de 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de CaCO_3 disolviendo 0,125 g de carbonato cálcico previamente desecado en agua destilada hasta completar 500 ml. Así mismo, el patrón primario de 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de MgCO_3 se prepara disolviendo 0,173 g de carbonato magnésico en agua destilada hasta completar 500 ml. A partir de ambos se elaboraban los patrones diluidos que contenían las siguientes concentraciones:

Patrón 1: 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Ca y 0,4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Mg.

Patrón 2: 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Ca y 1,2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Mg.

Patrón 3: 3 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Ca y 2 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Mg.

Patrón 4: 4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Ca y 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Mg.

Patrón 5: 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Ca y 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Mg.

Procedimiento

Para la determinación de ambos elementos se utilizó un espectrofotometro de absorción atómica VARIAN A. Ambos elementos se cuantificaron por la técnica de absorción a la longitud de onda adecuada para cada uno de ellos. Las muestras, previamente filtradas y acidificadas con HNO_3 (1 % v/v), se diluyeron

hasta la concentración adecuada, de forma que esta resultara incluida en el rango de los patrones con los que se construía la curva de calibrado. Como corrector de interferencias se añadía 2 ml de cloruro de lantano 0,2 M a 25 ml de muestra.

3.2.2.11.- Sodio y Potasio (Espectrofometría de emisión atómica)

Fundamento

El sodio y el potasio fueron cuantificados mediante la técnica de emisión atómica a la longitud de onda adecuada de cada elemento (APHA-AWWA-WPCF, 1989).

Reactivos

- Solución de NaCl $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.- Se prepara disolviendo 25,4 g de NaCl previamente desecados en agua destilada hasta completar un litro. A partir de esta solución, se construyen los siguientes patrones:

Patrón 0: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl.

Patrón 1: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl y $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl.

Patrón 2: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl y $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl.

Patrón 3: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl y $6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl.

Patrón 4: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl y $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl.

Patrón 5: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl y $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl.

- Solución de KCl $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Preparada disolviendo 19,1 g de KCl desecado en agua destilada hasta completar un litro. Tomando como partida esta solución, se construyen los patrones siguientes:

Patrón 0: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl.

Patrón 1: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl y $0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl.

Patrón 2: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl y $0,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl.

Patrón 3: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl y $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl.

Patrón 4: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl y $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl.

Patrón 5: $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaCl y $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de KCl.

Procedimiento

Para la determinación de ambos elementos también se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica VARIAN A. El sodio y el potasio se cuantificaron por la técnica de emisión a la longitud de onda adecuada para cada uno de ellos. Las muestras, previamente filtradas y acidificadas con HNO_3 (1 % v/v), se diluyeron hasta la concentración adecuada, de forma que esta resultara incluida en el rango de los patrones con los que se construía la curva de calibrado. Para evitar las interferencias existentes entre ambos elementos, se añadió a muestras y patrones $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de sodio en la determinación del potasio y $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de potasio a la determinación de sodio.

3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1.- ESTRATIFICACIÓN Y MEZCLA TÉRMICA

El proceso de estratificación vertical que tiene lugar en la Laguna de Arcas durante los meses más cálidos resulta determinante de la evolución físico-química de sus aguas, condicionando a su vez las poblaciones de organismos presentes en ellas. Esta estratificación se produce por el calentamiento diferencial de las capas superficiales, de manera que la existencia de aguas más frías en las capas profundas supone el establecimiento de un gradiente de densidad que da lugar al fenómeno de la estratificación vertical, que se ve ayudado por la morfología de la laguna, ya que esta favorece el establecimiento de esos gradientes y dificulta la mezcla. La extensión del epilimnion en los lagos esta relacionada con su tamaño y morfología (Hanna, 1990; McGuire y Currie, 1993), que también determina la mezcla inducida por el viento, así como por la turbidez del agua, que afecta al rango de profundidad en el que la radiación solar calienta el agua (Kirk, 1985; Mazumber y Taylor, 1994)

El establecimiento de la estratificación térmica estival queda puesto de manifiesto en la figura 3-1, en la que se representan las isoclinas de temperatura en el perfil vertical, medidas en el periodo 1989-1991. La evolución anual muestra que a partir del mes de mayo comienza a establecerse un importante gradiente de temperatura entre la superficie y el fondo, que va haciéndose aún mayor en los meses sucesivos, estableciéndose una marcada termoclina que se sitúa a mayor profundidad conforme avanza el verano.

La estabilidad de la estructura térmica no se alcanza hasta los meses de mayo o junio, ya que aunque anteriormente se establece un gradiente térmico, este es bastante inestable y susceptible a ser alterado por unas condiciones meteorológicas cambiantes, temperatura, viento y lluvia, que a su vez suponen entradas de agua freática en profundidad. La principal variación en la situación de la termoclina se refiere a la profundidad a la que comienza. Así, durante el mes de junio el fuerte gradiente térmico comienza a 2,5-3 metros, en julio el inicio se sitúa en torno a los 4 metros, para bajar a 5-6 m en agosto y 6-7 m en septiembre, situándose entre los 8 y 10 m durante los días del mes de octubre previos a la mezcla vertical. La base de la termoclina sufre menos variaciones, ya que durante los primeros meses de la estratificación se sitúa en torno a 8 metros de profundidad, para bajar progresivamente hacia final del verano hasta los 10,5 metros y hasta 11 m justo antes de la mezcla completa.

Durante el periodo estival, las temperaturas superficiales, aunque han variado según los años, suelen estar entre los 23 y 25 °C, mientras que la temperatura de la mayor parte del hipolimnion está, en el momento de máxima estratificación, entre 10 y 12 °C. Durante el periodo de mezcla la temperatura se hace

homogénea en toda la columna de agua, alcanzando los valores mínimos en torno a 5-6 °C durante los meses invernales. El mayor gradiente total entre la temperatura de las aguas superficiales y las del fondo se suele alcanzar durante el mes de julio y los primeros días de agosto, coincidiendo con las condiciones meteorológicas que más favorecen el calentamiento de las aguas superficiales. Sin embargo, ello no implica necesariamente una termoclina más acusada en estos meses, ya que su extensión puede ser mayor, lo que en cierto modo compensa el mayor gradiente térmico.

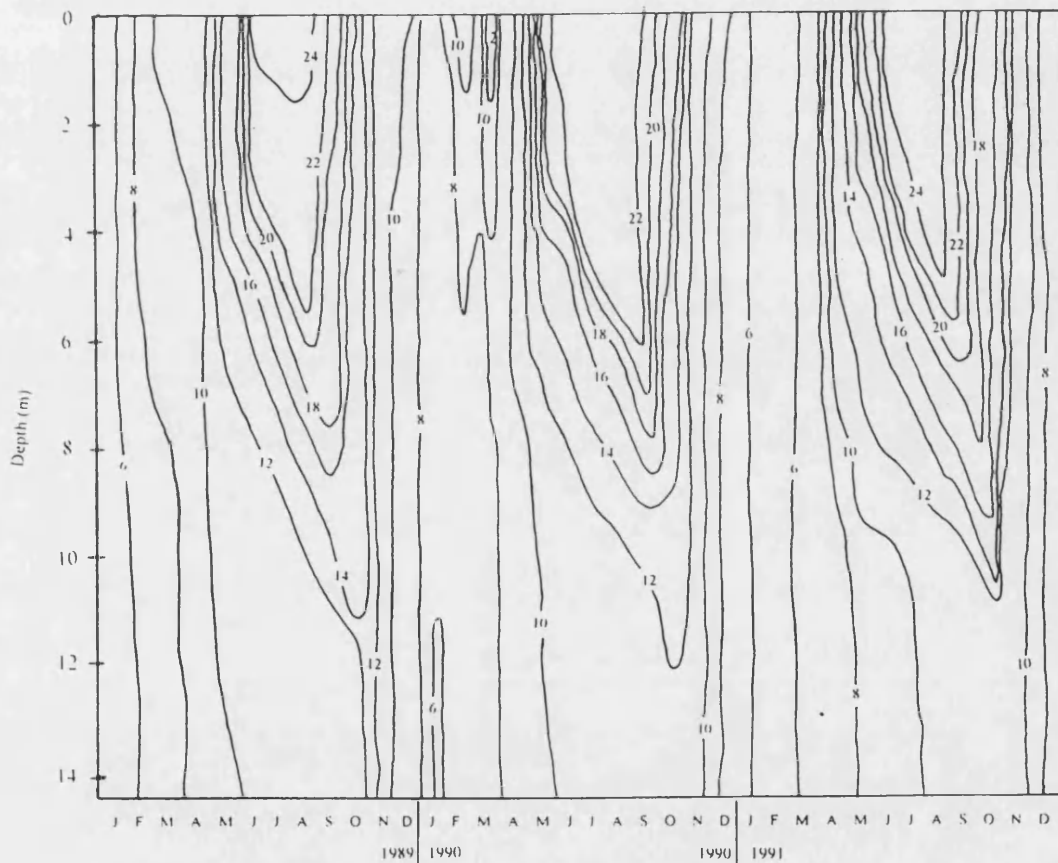


Figura 3.1.- Diagrama espacio-tiempo de la temperatura del agua en la Laguna de Arcas durante el periodo 1989-1991.

Figure 3.1.- Space-time diagram of water temperature in Lake Arcas during the period 1989-1991.

El descenso de la radiación solar y de la temperatura ambiental que tiene lugar al final del verano, unido a las lluvias y al viento, comienzan a enfriar el agua superficial, desestabilizándose la estructura estratificada al romperse el gradiente de densidad generado por la presencia de diferente temperatura en las distintas capas. Esto lleva finalmente a que se produzca la circulación completa de las aguas de la laguna, completándose la mezcla a lo largo del mes de octubre. Aunque la mezcla es progresiva, su culminación puede tener lugar en cuestión de horas. Así por ejemplo, durante el día 11 de octubre de 1991, la termoclina estaba situada entre 10,5 y 11 metros de profundidad, siendo anóxicas las aguas por debajo de 11 m, esa misma noche acaeció una importante tormenta de manera que al volver a la laguna el día siguiente se encontró que la mezcla era total, y se había acabado de completar en cuestión de horas. Aquí debe ser tenido en cuenta que el volumen de agua entre los 11 metros y el fondo es muy pequeño en comparación con el volumen total de la laguna, con lo que no es de extrañar que se complete la mezcla en tan corto periodo si entra en juego una perturbación importante como pueden ser las fuertes lluvias que tuvieron lugar y la consiguiente entrada de agua freática en profundidad. Aunque el viento es considerado como un parámetro importante en la desestratificación de las masas de agua, a la vista de nuestros resultados parece que las corrientes térmicas convectivas consecuencia del enfriamiento de las capas superficiales (Ward *et al.*, 1990) podrían tener tanto o más importancia que aquel, dada la abrupta morfometría de esta laguna.

Entre las alteraciones al patrón general holomíctico de la laguna, cabe reseñar que en 1990 se detectó una mayor temperatura en las capas superiores durante cortos periodos en los meses de febrero y marzo. Ambos meses resultaron ser marcadamente más cálidos y secos que la media, especialmente el mes de febrero, que fue el único mes en todo el periodo estudiado en el que no se registró ninguna precipitación. Además, la temperatura media de este mes fue 4,6°C más elevada que la media de los últimos 45 años, con lo que este también fue el mes con mayor desviación positiva respecto a la temperatura media (ver capítulo 2). La existencia de estos periodos de bonanza meteorológica dentro del periodo de mezcla, ayudada por la favorable morfometría de la laguna, hace que puedan producirse procesos de incipiente estratificación, en los cuales se puede producir el agotamiento del oxígeno en las aguas más profundas. Estos cortos e inmaduros periodos de estratificación se ven truncados al aparecer condiciones meteorológicas desfavorables, por lo que el que no fueran detectados en los otros dos años no supone necesariamente que no se dieran, sino que quizá la frecuencia del muestreo no fue suficiente como para observarlos. No obstante, como se puede comprobar en el apartado 2.3., en el que se describe las características climáticas y la meteorología de la zona, el periodo 1989-90 se caracteriza de manera global por ser mucho más cálido y seco que la media calculada para el periodo 1940-94, mientras que en los ciclos de 1988-89 y 1990-91 la diferencia global no es tan grande y se presentan tendencias estacionales alternas, lo que

hace suponer que estos procesos de incipiente estratificación no hubieran estado tan favorecidos.

3.3.2.- OTROS PARÁMETROS: OXÍGENO, SULFHÍDRICO, pH Y Eh.

Como en la mayoría del resto de parámetros, los aquí citados se ven mediatizados por la estratificación térmica de la laguna. En realidad todos ellos son parámetros relacionados, ya que la presencia de oxígeno y sulfhídrico no puede verse por separado del potencial de óxido-reducción y todos ellos interaccionan además con el pH, por lo que resulta oportuno englobarlos en un mismo apartado. Los principales cambios en estos parámetros tienen lugar en la quimioclina, donde se establece un importante gradiente de óxido-reducción, desapareciendo el oxígeno disuelto en el agua y apareciendo el sulfhídrico.

3.3.2.1.- Oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto en el agua de un lago refleja la interacción de diversos factores relacionados con otras variables físicas como la temperatura o la densidad, y procesos biológicos, especialmente la producción fotosintética, la respiración aeróbica y los procesos fermentativos, que originan a su vez importantes cambios en la composición química del agua. La influencia de estos factores determina grandes variaciones en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, pudiendo encontrarse con facilidad procesos de sobresaturación, coincidentes normalmente con máximos de producción fotosintética oxigénica, formación de un hipolimnion anóxico determinado por la estratificación térmica y la actividad oxidativa de los organismos, e incluso reequilibrio rápido de la concentración de oxígeno como ocurre de forma brusca durante el proceso de mezcla térmica de un lago. El establecimiento durante el periodo estival de una termoclina con una base bastante estable en torno a los 8 metros de profundidad, determina la existencia de dos zonas en la laguna, una superior, por encima de el comienzo de la termoclina, en la que existe una mezcla permanente y que siempre presenta altas concentraciones de oxígeno, y una inferior por debajo de la termoclina en la que el agotamiento del oxígeno por la elevada demanda generada por la acumulación de sustancias reductoras. Inicialmente la respiración aerobia de la materia orgánica hasta el agotamiento del oxígeno, seguida de la sulfato-reducción y liberación de sulfhídrico, determina la formación de un hipolimnion anóxico que se mantiene durante los meses de duración de la estratificación térmica.

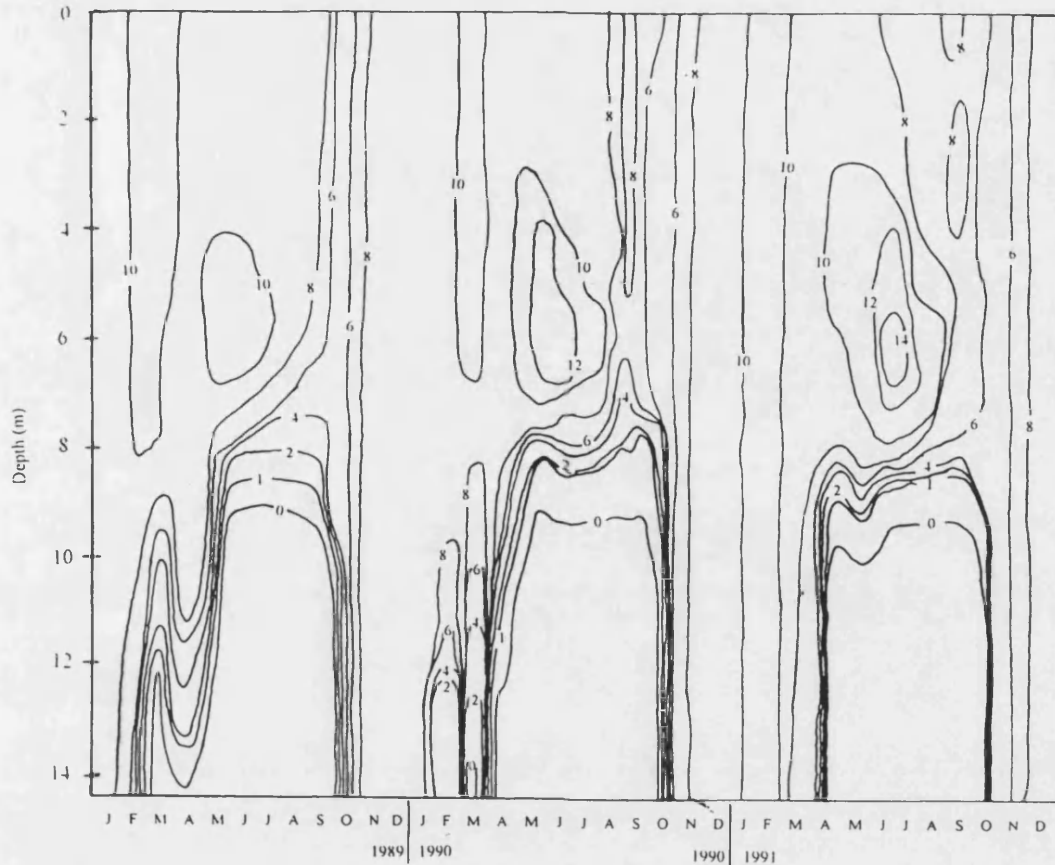


Figura 3.2. - Diagrama espacio-tiempo de la concentración de oxígeno (mg l^{-1}) en la Laguna de Arcas en el periodo 1989-1991.

Figure 3.2.- Space-time diagram of oxygen concentration (mg l^{-1}) in Lake Arcas from 1989 to 1991.

En la figura 3-2 se muestra la evolución de la concentración de oxígeno en los años 1989, 1990 y 1991, ateniéndonos a los perfiles realizados a mediodía (12 horas). En todos los años, durante el periodo de estratificación estival se formaba un hipolimnion anóxico, que cuando la estratificación se estabilizaba abarcaba desde aproximadamente los 8.5-9 metros de profundidad, hasta el fondo de la laguna. El citado hipolimnion anóxico permanece bastante estable desde principio de mayo hasta final de septiembre en los límites citados, formándose normalmente durante el mes de abril y destruyéndose a mediados de octubre como consecuencia de la mezcla térmica. La profundidad a la que se extinguía el oxígeno bajaba rápidamente durante los primeros días de octubre, oxigenándose totalmente las aguas prácticamente de un día para otro. Ello seguía a la culminación de la mezcla vertical, produciéndose un reequilibrio de la concentración de oxígeno, que dada la elevada demanda del mismo para

compensar el exceso de reductores acumulados en el hipolimnion, veía muy reducida su concentración en el agua como consecuencia de la mezcla total. Además de esa demanda para la oxidación química de los compuestos reducidos (sobre todo el sulfhídrico) acumulados en las aguas del hipolimnion, podría incrementarse la demanda debido a un aumento en la población de bacterioplancton heterótrofo al ponerse a su disposición una gran cantidad de nutrientes, aunque esto será tratado con más detalle en el capítulo 4.

En esta laguna, debido a su especial morfometría, con la presencia de un hoyo central de pequeño diámetro y dos metros de profundidad (a partir de los 12 m), se producen episodios pasajeros de anoxia en el citado pozo central que tienen lugar hacia el final del periodo invernal, coincidiendo normalmente con cortos periodos de bonanza meteorológica. Este tipo de episodios se detectaron en marzo de 1989, donde la extinción de oxígeno se situó a los 12 metros (esto es, en el límite del pozo), repitiéndose en la campaña del 23 de febrero de 1990 (con la extinción de oxígeno a 12,8 m). Estos procesos de anoxia producidos durante el periodo de mezcla se ven limitados al pozo central de la laguna, donde la relativa estabilidad que se puede alcanzar durante unos días de buen tiempo minimiza los procesos de mezcla en este reducto, lo que unido a la importante sulfato-reducción a nivel del sedimento y de la interfase agua-sedimento (con la consiguiente producción de H_2S), determina un consumo total del oxígeno disuelto y la consiguiente anoxia. Este tipo de procesos se ve rápidamente interrumpido cuando las condiciones meteorológicas determinan una activación de la mezcla vertical en la laguna.

En todos los años estudiados se detectó un máximo metalimnético de oxígeno que se daba durante la primavera y el principio del verano, situándose normalmente el incremento de la concentración de O_2 entre los 3 y 7 metros de profundidad, desplazándose hacia abajo el máximo puntual conforme avanzaba el periodo de estratificación. Los máximos detectados en cada uno de los años fueron de $11,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de O_2 en mayo de 1989, $13 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de O_2 a principio de julio de 1990 y $15,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de O_2 a final de junio de 1991, todos ellos situados en torno a 6 metros de profundidad. Todos estos picos en el perfil vertical de la concentración de oxígeno suponían una sobresaturación de origen fotosintético y en algunos de los casos estaban marcadamente asociados a incrementos de pH, como consecuencia de la disminución de la cantidad de CO_2 con desplazamiento del equilibrio carbonato-bicarbonato- CO_2 debido a la fotoasimilación de carbono inorgánico (tabla 3-1). Además del pico principal, cuando este se encontraba a mayores profundidades (en torno a los 6 metros), lo que sucedía a final de la primavera y principio del verano, aparecía otro máximo secundario que solía encontrarse 2-3 metros por encima, y que a diferencia del más profundo, no estaba asociado a incrementos de pH. Esto mismo ocurría al principio de la estratificación, donde el máximo de oxígeno se situaba entre 3 y 4 metros, siendo el incremento de la concentración de oxígeno de menor intensidad y no observándose un aumento reseñable del pH. Este tipo de picos metalimnéticos

son bastante frecuentes en los lagos estratificados, formándose como consecuencia de la actividad fotosintética de los organismos y la reducción de los procesos de difusión a nivel de la termoclina.

Tabla 3.1.- Situación de los máximos primaverales de oxígeno y variaciones asociadas del pH durante el periodo estudiado.

Table 3.1.- Spring deep oxygen maxima and associated changes in pH in the study period.

Fecha	Profundidad (m) del máximo de O ₂	O ₂ (mg·l ⁻¹)	Saturación O ₂ (%)	Diferencia O ₂ pico - O ₂ superf. (mg·l ⁻¹)	ΔpH
27/05/89	6,25	11,5	117	2,6	0,41
28/06/89	6,2	11,8	125	4,4	0,29
23/03/90	3	11	108	0,8	0,02
17/05/90	4	11,4	120	2,4	-
08/06/90	6	12,7	133	4,4	0,23
04/07/90	6	13	141	5,0	0,17
30/07/90	5,75	11	126	2,4	-
01/05/91	3,5	10,3	105	0,9	0,04
24/05/91	4,5	11	115	1,9	0,06
29/06/91	6	15,1	161	7,2	0,22
6/8/91	6,75	11,9	132	4,0	-

Durante el periodo de estratificación se producen variaciones en las concentraciones de oxígeno disuelto a lo largo del ciclo diario, que son especialmente relevantes en la zona de la interfase óxica-anóxica. En la tabla 3-2 se detalla la evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el perfil vertical a lo largo de un ciclo diario realizado en septiembre de 1989. Las concentraciones en el epilimnion son algo más altas durante la noche como consecuencia de la mezcla e intercambio con la atmósfera debida al descenso de temperatura superficial, aunque los cambios son porcentualmente pequeños. Las variaciones son especialmente significativas en la zona de la interfase óxica-anóxica, ya que al avanzar el día se observa un pequeño pico de oxígeno que aparece inmediatamente por debajo de la profundidad en la que la concentración se hacía casi cero, de manera que hay una doble extinción. Si bien este pico de oxígeno es más profundo y mucho menos intenso que el metalimnético, su relevancia es grande. Este pequeño incremento en la concentración de oxígeno coincidiendo con la profundidad que por la mañana ocupaba la interfase óxica-anóxica se ha observado repetidamente a lo largo de los sucesivos muestreos durante el periodo de estratificación, especialmente a partir del mes de julio, y coincide con la profundidad en las que se encontraban las máximas densidades poblacionales de microorganismos fotosintéticos oxigénicos. Este pequeño pico no se ha reflejado en la figura 3-2, que representa los resultados correspondientes a las medidas realizadas en el mediodía.

Tabla 3.2.- Perfiles de concentración de oxígeno medidos a lo largo de un ciclo diario en septiembre de 1989.

Table 3.2.- Vertical profiles of oxygen concentration throughout a diel cycle measured on September, 1989.

Profundidad (m)	O ₂ (mg·l ⁻¹) 6:30 p.m.	O ₂ (mg·l ⁻¹) 11:30 p.m.	O ₂ (mg·l ⁻¹) 7:10 a.m.	O ₂ (mg·l ⁻¹) 11:20 a.m.	O ₂ (mg·l ⁻¹) 4:00 p.m.	O ₂ (mg·l ⁻¹) 7:30 p.m.
0,25	7,6	8,2	8,0	7,8	7,3	7,7
1	7,7	8,2	8,1	7,8	7,7	7,6
2	7,7	8,4	8,1	7,7	7,7	7,6
3	7,7	8,2	8,1	7,7	7,7	7,6
4	7,7	8,3	8,2	7,7	7,7	7,6
5	7,5	8,1	8,1	7,6	7,5	7,4
6	7,1	7,5	7,3	7,5	7,2	7,0
7	4,7	5,3	5,2	5,1	4,8	4,7
7,5	3,9	4,3				
7,75	3,1	3,5			3,4	3,1
8	2,7	2,5	3,0	2,9	2,7	2,7
8,2	2,2	2,1		2,3	2,2	2,1
8,3	1,7				1,9	1,9
8,4	1,5	1,8		1,7	1,6	1,5
8,5	1,5	1,5	1,8	1,5	1,4	1,4
8,6	1,1	1,4		0,9	1,1	1,0
8,7	1,0	1,1	0,8	0,7	0,8	0,6
8,8	0,8	0,7	0,3	0,3	0,2	0,2
8,9	0,5	0,6	0,3	0,2	0,2	0,2
9	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2
9,1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1	0,3
9,2	0,5	0,2	0,2	0,1	0,6	0,5
9,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1
9,4	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1
9,5	0	0	0	0	0	0

A lo largo del ciclo anual se observa una pauta en la saturación de oxígeno en la laguna. La mezcla otoñal supone una importante demanda de oxígeno, que hace que tras producirse la citada mezcla la laguna quede con bajos niveles de saturación, en torno al 50 % que se mantiene durante varias semanas. Durante el periodo de mezcla invernal la saturación va aumentando en toda la columna hasta valores próximos al 100 % al principio de la primavera, llegándose de nuevo al periodo de estratificación donde por lo general se mantiene un epilimnion ligeramente sobresaturado en el que se presentan los máximos puntuales anteriormente señalados. Esta situación de ligera sobresaturación en las capas superficiales se mantiene hasta finales de agosto, presentándose a partir de entonces una subsaturación, coincidente con la desaparición del máximo profundo de oxígeno, que se acentúa hasta que llega la mezcla otoñal. Obviamente, la saturación de oxígeno en el agua depende de la temperatura, lo cual explica que las concentraciones superficiales de oxígeno que se alcanzan en invierno sean mayores que en primavera-verano, pero con un porcentaje de saturación menor.

3.3.2.2.- Sulfhídrico

El sulfhídrico, presente en el hipolimnion a lo largo de los periodos de estratificación (Figura 3-3), tiene un origen biogénico (Imhoff, 1992). Las concentraciones que se alcanzan pueden ser relativamente altas como consecuencia de la importante sulfato-reducción, dado el alto contenido en sulfatos de las aguas y el terreno, que en condiciones anóxicas favorece la utilización de los compuestos orgánicos por parte de los sulfato-reductores (Hadas y Pinkas, 1995), aunque es un proceso que puede tener lugar incluso en presencia de oxígeno cuando el Eh se encuentra por debajo de 200 mV (Canfield y Des Marais, 1991; Fründ y Cohen, 1992, Cohen, 1993, Jørgensen, 1994). La presencia de esta sustancia en las aguas hipolimnéticas posibilita la aparición de densas poblaciones de bacterias fotosintéticas, que utilizan este compuesto como dador de electrones para su fotosíntesis anoxigénica ligada al fotosistema I. El sulfhídrico puede hallarse en diferentes formas más o menos dissociadas en función del pH (Millero *et al.*, 1988), lo cual resulta importante en función de la distinta incidencia de las diferentes formas sobre los microorganismos.

Las concentraciones de sulfhídrico que se dan en la zona inmediatamente inferior a la oxiclina, donde se concentran las densidades poblacionales de procariotas fotosintéticos más elevadas, no son superiores a 300-400 μM , pero a mayores profundidades se alcanzan concentraciones más elevadas, mayores aun cuando el verano está más avanzado. Las concentraciones máximas medidas en los dos ciclos anuales, que se alcanzaban en el fondo de la laguna, fueron de 870 μM a final de septiembre de 1990 (aunque probablemente en las siguientes semanas se dieron concentraciones superiores que no fueron medidas) y de 3004 μM el 11 de octubre de 1991, con la laguna a punto de mezclarse totalmente. En cualquier caso durante el periodo de estratificación del año 1991 las concentraciones hipolimnéticas de sulfhídrico fueron bastante superiores a las de 1990. Cuando se dan los procesos extemporáneos y restringidos de anoxia durante la época de mezcla (febrero-marzo), anteriormente comentados, la concentración de sulfhídrico apenas sobrepasa los 100 μM en sus valores máximos. Eso mismo ocurre en los periodos iniciales de la estratificación, aumentando posteriormente de forma gradual en toda la columna hipolimnética.

El avance de las aguas anóxicas ricas en sulfhídrico hacia aguas superficiales es un proceso bastante rápido una vez establecidas las condiciones de estabilidad, siendo las aguas por debajo de los 8,5-9 metros las que contienen sulfhídrico, con concentraciones muy elevadas a partir de aproximadamente 1 metro por debajo de la interfase, que ya no suelen aumentar excesivamente hacia el fondo. La existencia de una termoclina cuya base se encuentra en torno a los 8 metros durante la mayor parte del periodo de estratificación frena el avance de las aguas anóxicas, ya que por encima de esta profundidad todavía imperan los procesos de circulación vertical, lo que supone un aporte de oxígeno adicional al producido por la propia actividad fotosintética.

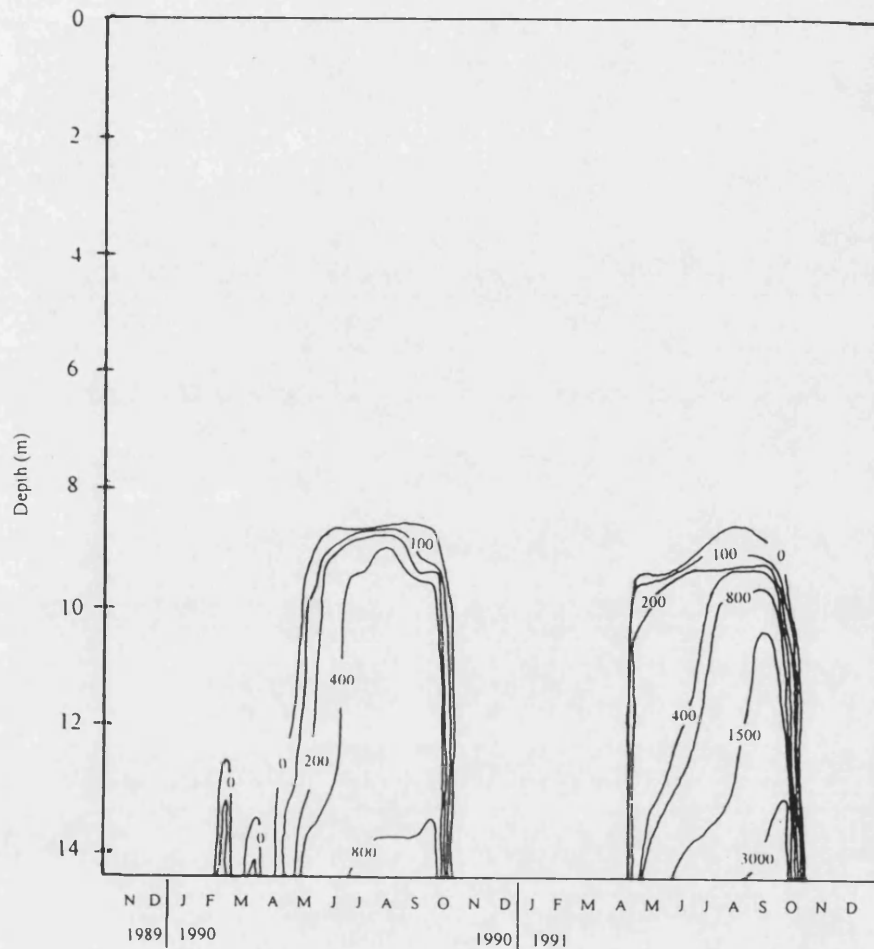


Figura 3.3.- Diagrama espacio-tiempo de las concentraciones de sulfhídrico (μM) medidas en la Laguna de Arcas durante el periodo 1989-1991.

Figure 3.3.- Space-time diagram of sulfide concentrations (μM) measured in Lake Arcas during the period 1989-1991.

Es un hecho generalmente aceptado que la solubilidad del sulfuro de hierro controla la concentración de hierro soluble, y lo que es más importante en nuestro caso, de sulfhídrico (Davison y Heaney, 1978), en aguas anóxicas en las que las concentraciones de hierro son suficientemente altas para bloquear el sulfhídrico producido (Davison, 1980), lo cual afecta a la dinámica de las bacterias fotosintéticas (García-Gil *et al.*, 1990, García-Gil *et al.*, 1991; Borrego y García-Gil, 1995). Sin embargo, este control es especialmente efectivo en sistemas en los cuales la producción de sulfhídrico deriva principalmente de la descomposición anaerobia de los aminoácidos azufrados contenidos en las proteínas, lo que supone una producción de sulfhídrico relativamente modesta (alrededor de 11 g por kg de materia orgánica degradada) que hace que este compuesto pueda llegar

a ser limitante en el crecimiento de las bacterias fotosintéticas del azufre. Davison y Finlay (1986), comparando dos lagos adyacentes de distintas profundidades, llegaron a hablar de dos sumideros importantes para el sulfhídrico, su oxidación fotosintética, en el lago más somero en el que la disponibilidad de luz en las aguas sulfhídricas era mayor, frente a una precipitación química en forma de FeS en el lago más profundo, en cuyas aguas anóxicas la carencia de luz resultaba limitante para el desarrollo de las bacterias fotosintéticas del azufre. En la Laguna de Arcas, la gran mayoría del sulfhídrico presente en las aguas anóxicas es producido, dada la alta disponibilidad de sulfato, por medio de la sulfato-reducción, un proceso que ofrece un rendimiento mucho más alto en cuanto a su producción de sulfhídrico, con más de 700 g por kg de materia orgánica respirada vía sulfato-reducción (Vicente y Miracle, 1988a). Por ejemplo, Zaiss (1984) en estudios realizados en el sedimento de ríos y lagos comprobó que en presencia de suficientes concentraciones de sulfato, las bacterias sulfato-reductoras oxidan hasta el 34 % de la materia orgánica que llega a este sedimento. La alta concentración de sulfhídrico de las aguas anóxicas de la Laguna de Arcas, unida a la relativamente baja concentración de hierro hace que el sulfhídrico no sea un factor limitante del desarrollo de bacterias fotosintéticas del azufre en las aguas anóxicas, siendo la sulfato-reducción el proceso determinante (Pfennig y Widdel, 1982). La demanda de materia orgánica para cumplimentar las necesidades de la sulfato-reducción puede estar satisfecha en parte por la misma asimilación a nivel de la quimioclina, lo que supone un cierto acoplamiento de los procesos de oxidación fotosintética del sulfhídrico con producción de materia orgánica y de producción de este compuesto vía sulfato-reducción (Cohen, 1986). Este acoplamiento puede ser tan solo parcial, ya que como se vio en el Lago Mahoney, que presenta la población más densa de bacterias fotosintéticas (*Amoebobacter purpureus*) descrita hasta la fecha, la fotoasimilación de carbono de estas bacterias no llega a cubrir durante el verano las necesidades de los sulfato-reductores (Overman *et al.*, 1991), aunque si la excede si se considera todo el ciclo anual.

3.3.2.3.- pH

El pH del medio resulta un parámetro determinante para los microorganismos, especialmente en las células procariotas, que están expuestas a las variaciones de la concentración externa de protones (Padan, 1983), si bien esto es especialmente importante en los medios en los que existen importantes gradientes de este parámetro, que en el caso de la Laguna de Arcas no lo son tanto. El pH de las aguas de la laguna resulta ligeramente alcalino, a excepción de las capas más profundas del hipolimnion donde las elevadas concentraciones de sulfhídrico y CO₂ hacen que el pH pueda ser algo menor que 7. La evolución del pH a lo largo de los años 1989, 1990 y 1991 se detalla en la figura 3-4.

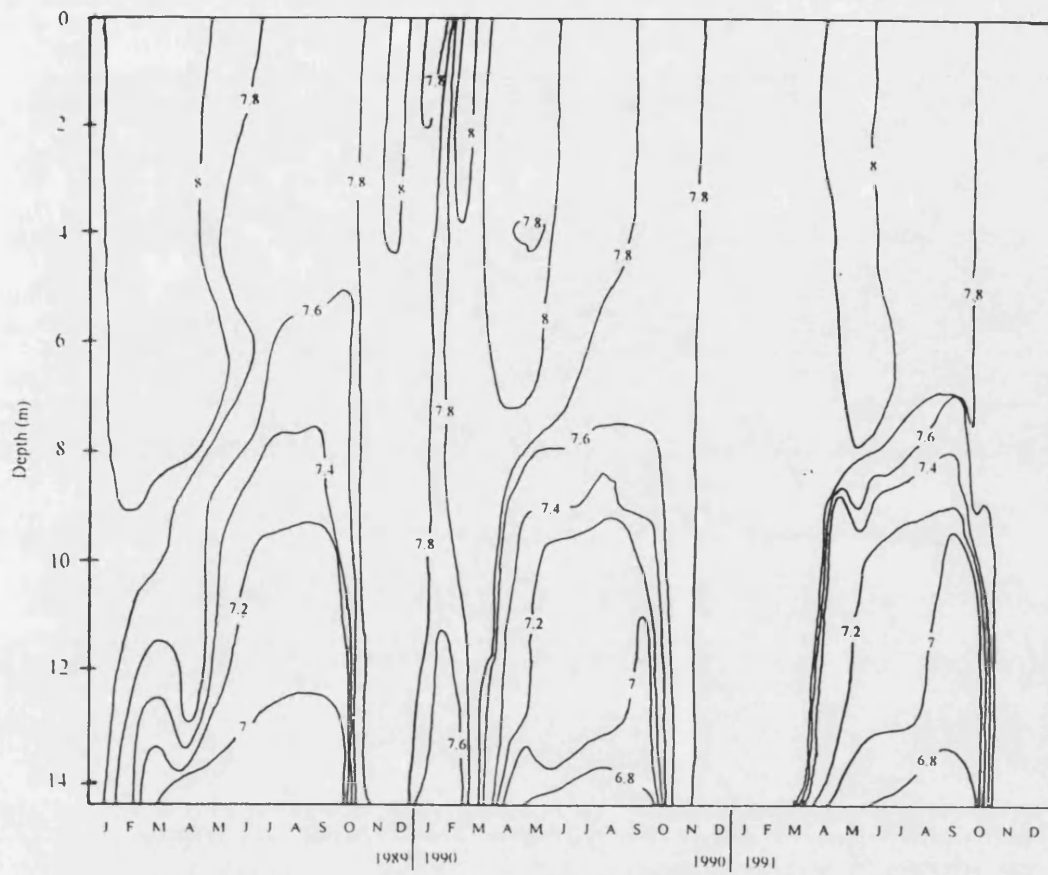


Figura 3.4. Diagrama espacio-tiempo del valor del pH medido en la Laguna de Arcas en el periodo 1989-1991.

Figure 3.4. Space-time diagram of pH values measured in Lake Arcas during the period 1989-1991.

A lo largo del periodo estudiado, los valores normales en el epilimnion (y en toda la columna durante la mezcla invernal) se encuentran comprendidos entre 7,8 y 8,2, en los alrededores de la interfase óxico-anóxica entre 7,2 y 7,7 y en el hipolimnion se encuentran los valores más bajos, comprendidos entre 6,7 y 7,2, debido a la acumulación de sulfhídrico, de CO₂, y ácidos orgánicos, consecuencia del metabolismo fermentativo y de la respiración anaeróbica. Las diferencias de pH entre las aguas de la superficie y el fondo nunca sobrepasaron el valor de 1,2 unidades, siendo en los alrededores de la interfase oxi-anóxica donde el gradiente es más notable. La mezcla otoñal homogeneiza el pH de toda la columna, que tras dicho proceso se sitúa alrededor de 7,8.

Como ya se comentó en el apartado referente al oxígeno, durante el periodo de estratificación suelen aparecer máximos de pH asociados a máximos de oxígeno, pero solo en aquellos casos en los que el citado máximo era más profundo, en los

meses del final de la primavera y principio del verano. Estos incrementos de pH, resumidos en la tabla 3-1 son esperables coincidiendo con los máximos de producción fotosintética, debido a la fotoasimilación del carbono inorgánico que altera el equilibrio de los carbonatos, lo cual conduce a la alcalinización del pH.

3.3.2.4.- Eh

El potencial de óxido-reducción estandar referido al hidrógeno (Eh) presenta marcadas diferencias en función de la estratificación (figura 3-5). Durante el periodo de mezcla los valores medidos están comprendidos aproximadamente entre los 300-400 mV, mientras que durante la estratificación los valores epilimnéticos presentan un margen ligeramente mayor (250-420 mV según los años). En el periodo de estratificación, el agotamiento del oxígeno y la acumulación de sulfhídrico provoca la formación de un acusado gradiente, pudiendo pasarse desde los 300 mV a -100 mV en un margen de apenas un metro de profundidad (aproximadamente entre 8,5 y 9,5 m). Por debajo de esta redoxclina las variaciones de Eh ya son pequeñas, manteniéndose el hipolimnion profundo en valores que oscilan entre -100 y -200 mV.

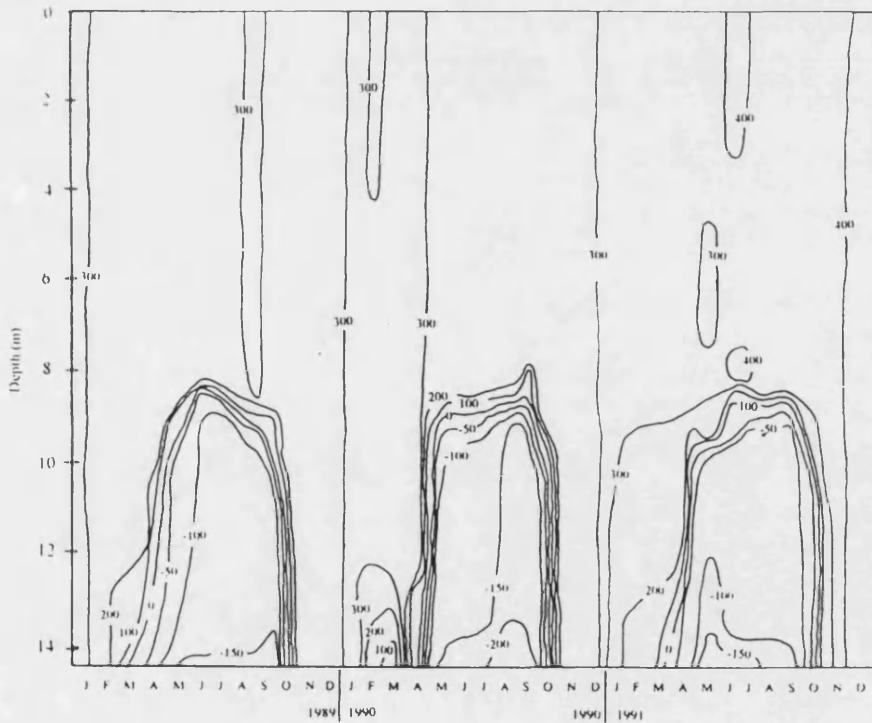


Figura 3.5. Diagrama espacio-tiempo del valor de Eh (mV) medido en la Laguna de Arcas en el periodo 1989-1991.

Figure 3.5. Space-time diagram of Eh (mV) values measured in Lake Arcas during the period 1989-1991.

Los bajos valores de potencial de óxido-reducción que se registran en las aguas hipolimnéticas vienen determinados por la acumulación de sustancias reducidas, especialmente el sulfhídrico, potente reductor que modifica a la baja el redox del agua. En las aguas epilimnéticas, coincidiendo con máximos de oxígeno pueden encontrarse ligeros descensos en el redox, lo cual es explicable en función de la excreción de sustancias orgánicas por las algas cuya actividad fotosintética produce ese oxígeno.

3.3.3.- MINERALIZACIÓN

De los parámetros señalados en este apartado, tan sólo la conductividad se determinó en todos los muestreos, mientras que las concentraciones de los principales iones se determinaron esporádicamente, ya que anteriores estudios revelaron que sus variaciones a lo largo del ciclo anual no eran excesivamente grandes ni presentan discordancias con la conductividad. No obstante, la alcalinidad se determinó en más ocasiones que el resto, dado que en las experiencias de producción primaria resulta imprescindible conocerla para poder estimar el carbono asimilado.

3.3.3.1.- Conductividad

Las aguas de la laguna presentan una elevada mineralización, debido principalmente a la disolución del sustrato yesoso rico en sulfato de calcio. Los valores medidos son bastante semejantes a los de las otras lagunas de la zona (tabla 2-1), aunque existen algunas lagunas cuya conductividad es, por regla general, más elevada. La conductividad medida a lo largo de los tres ciclos anuales supera en todos los casos los $2000 \mu\text{S cm}^{-1}$. Los valores más bajos se encuentran en las aguas permanentemente mezcladas, ya sea en el epilimnion durante el periodo de estratificación o en toda la columna durante el periodo de mezcla invernal, con valores de entre 2120 y $2750 \mu\text{S cm}^{-1}$. Durante el invierno de 1990 la conductividad del agua fue reduciéndose progresivamente, para aumentar de forma brusca durante la primavera.

En el hipolimnion, las condiciones reductoras y ligeramente más ácidas favorecen la resolubilización de diversos compuestos, ya sean precipitados desde el epilimnion como provenientes de los sedimentos, lo que provoca un incremento de la conductividad. Así, los valores de conductividad medidos a lo largo de los tres ciclos anuales oscilan, en las aguas hipolimnéticas, entre $2700 \mu\text{S cm}^{-1}$ y algo más de $3300 \mu\text{S cm}^{-1}$ según los años (figura 3-6). No obstante, los valores más altos se dan en el pozo central, que es prácticamente el único lugar de la laguna donde se superan los $2800 \mu\text{S cm}^{-1}$, estableciéndose en el interior de dicho pozo un importante gradiente de conductividad.

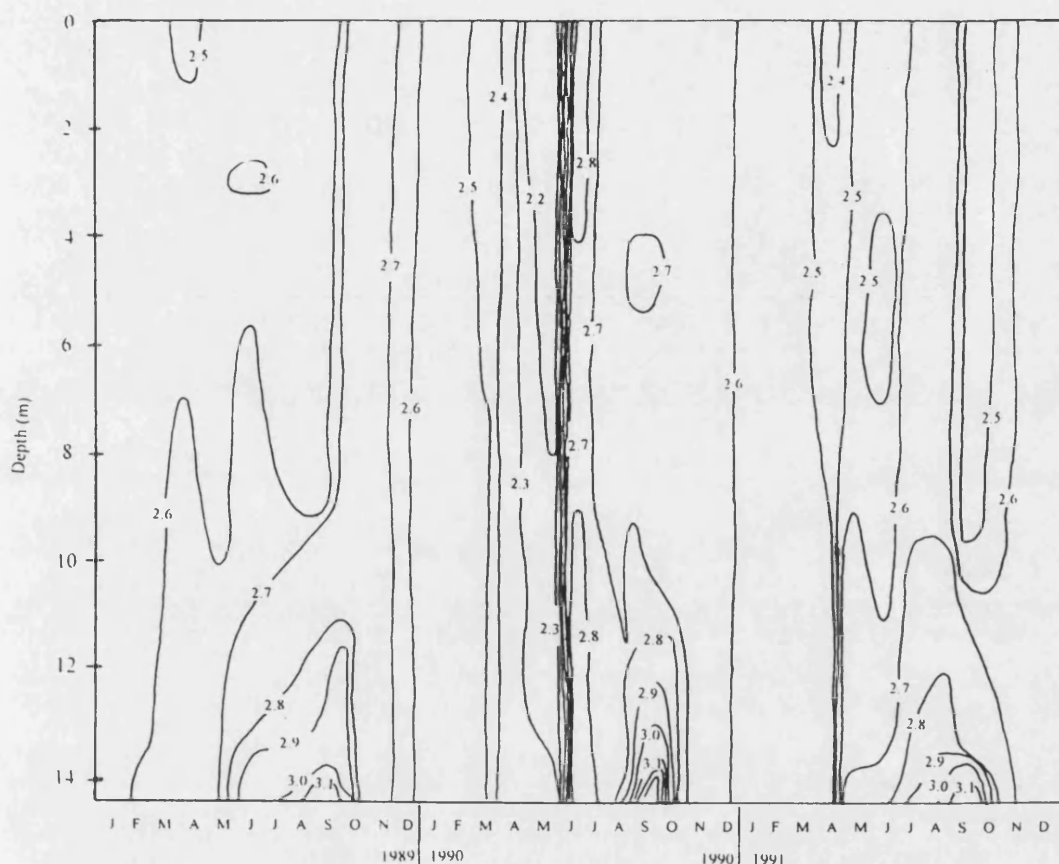


Figura 3.6.- Diagrama espacio-tiempo de la conductividad del agua (ms cm^{-1}) de la Laguna de Arcas en el periodo 1989-1991.

Figure 3.6.- Space-time diagram of conductivity (ms cm^{-1}) of Lake Arcas waters, measured during the period 1989-1991.

3.3.3.2.- Aniones

La composición aniónica denota una gran abundancia de sulfatos, cuyas concentraciones son bastante uniformes tanto en el perfil vertical como a lo largo del ciclo anual. Estas altas concentraciones de sulfatos resultan lógicas si tenemos en cuenta el origen de la laguna como dolina de disolución en un sustrato dominado por el sulfato cálcico. Las concentraciones medias de sulfato en el periodo de estratificación presentan valores en torno a $37 \text{ meq}\cdot\text{l}^{-1}$ en el epilimnion que puede disminuir en $2-3 \text{ meq}\cdot\text{l}^{-1}$ en el hipolimnion conforme avanza la estratificación. Durante el periodo de mezcla se detectaba un descenso en la concentración de sulfatos en toda la columna de agua hasta valores en torno a $33 \text{ meq}\cdot\text{l}^{-1}$, probable consecuencia de la dilución provocada por el aumento de las precipitaciones. Estas elevadas concentraciones de sulfato determinan en gran medida los procesos físico-químicos y biológicos que tienen lugar en el lago, ya

que hacen posible el establecimiento de fenómenos de sulfato-reducción con producción de sulfhídrico. Dentro de los lagos cársticos sulfatados encontramos algunos que han sido estudiados limnológicamente (Miracle *et al.*, 1992) como los lagos Cisó y Nou, en la zona de Banyoles, y el Lago de Estanya, en la provincia de Huesca.

Los valores de alcalinidad obtenidos para el epilimnion en periodo de estratificación, similares a los de toda la columna durante la mezcla, oscilan normalmente entre 3 y 4 meq·l⁻¹, debiéndose esta alcalinidad total al ion bicarbonato, que constituye con mucho la forma dominante del sistema de los carbonatos a los pH epilimnéticos (tabla 3-3). En el hipolimnion estos valores están comprendidos entre 4 y 8 meq·l⁻¹, aunque en este caso la alcalinidad total no se debe exclusivamente al bicarbonato, sino que entran en juego otras sustancias, principalmente el sulfhídrico y el CO₂, y en menor medida el silicato.

Las variaciones de la alcalinidad como consecuencia de la fotosíntesis en las aguas epilimnéticas son pequeñas, dada las bajas tasas fotosintéticas que se alcanzan en las mismas, y que debido al efecto tampón de la reserva alcalina impide las variaciones del pH, pudiendo producirse una precipitación de carbonato de calcio para mantener tamponado el pH. Sin embargo, a nivel de la quimioclina se observa con frecuencia un pequeño descenso coincidiendo con las máximas densidades de organismos fotosintéticos, descenso asociado con toda seguridad a la actividad fotosintética de los organismos, ya que de no intervenir este factor la alcalinidad total aumentaría debido a la contribución a la misma de sustancias como el sulfhídrico, silicato, etc., más abundantes en las aguas anóxicas de la quimioclina.

Ya por debajo de la capa fotosintéticamente activa la alcalinidad total aumenta considerablemente, tanto por la menor utilización del carbono inorgánico para ser asimilado por los organismos como por la acumulación de otras sustancias que contribuyen a la alcalinidad total, y la bajada del pH con el consiguiente enriquecimiento de CO₂.

Las aguas de los sistemas lagunares cársticos tiene por regla general una elevada alcalinidad debido a su alto contenido en compuestos inorgánicos de carbono. Esto resulta especialmente importante en el control de la concentración de fósforo, ya que a pH alcalinos no solo se produce la precipitación del fósforo con el calcio en forma de apatito, sino que el carbonato coprecipita con el fósforo, disminuyendo la disponibilidad de este nutriente esencial para los microorganismos fotosintéticos. Esta precipitación puede deberse a la adsorción del fósforo al carbonato de calcio precipitado como a la formación de hidroxiapatito

Tabla 3.3.- Rango de valores de la alcalinidad (meq l^{-1}) para las muestras de la zona de mezcla y del hipolimnion en distintas fechas de muestreo.

Table 3.3.- Alkalinity values (meq l^{-1}) in samples from mixing zone and hypolimnion at several sampling dates.

FECHA	Alcalinidad (meq l^{-1})	
	ZONA DE MEZCLA	HIPOLIMNION
13/10/89	3,3 - 3,6	7,6 - 7,8
17/01/90	2,8 - 3,7	--
25/08/90	3,2 - 3,9	3,7 - 6,2
9/02/91	3,6 - 3,7	--
27/06/91	2,8 - 3,0	3,5 - 6
3/09/91	3,8 - 4,5	4,0 - 7,3
12/09/91	3,8 - 4,2	4,1 - 7,9
1/10/91	3,6 - 3,7	4,0 - 7,5

El cloruro resulta mucho más escaso en las aguas de la laguna, con valores poco variables tanto en la columna vertical como durante el ciclo anual, que oscilan durante el periodo de mezcla alrededor de $0,25 \text{ meq l}^{-1}$, si bien el transcurso de la estratificación supone un aumento de dichas concentraciones hasta valores que oscilan entre $0,33\text{-}0,37 \text{ meq l}^{-1}$.

Con estos datos se puede calcular una relación sulfato:alcalinidad:cloruro que estaría alrededor de 130:14:1, lo que deja bien claro que el sulfato es el anión determinante de la química de las aguas.

3.3.3.3.- Cationes

El calcio es con gran diferencia el catión mayoritario en las aguas de la laguna. La concentración en el agua de este elemento está en torno a 38 meq l^{-1} , con ligeras variaciones a lo largo del ciclo anual. Su alta concentración es importante, ya que a los pH propios de las aguas epilimnéticas el calcio puede formar hidroxiapatito junto con el fósforo, además de la precipitación de carbonato de calcio, que cobra importancia a pH mayores, que también puede adsorber fosfato (Murphy *et al.*, 1983), ambos procesos significan la retirada de fósforo de las aguas epilimnéticas y son menos relevantes en el hipolimnion debido al menor pH de estas aguas. El magnesio resulta mucho menos abundante, con concentraciones en torno a $6,4 \text{ meq l}^{-1}$. Ambos cationes divalentes resultan mayoritarios en la laguna, ya que las concentraciones de los cationes monovalentes son aun mucho más reducidas, con valores de en torno a $0,18 \text{ meq l}^{-1}$ la de sodio y $0,05 \text{ meq l}^{-1}$ la de potasio. Con estos datos se establecen una relación catiónica $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ de 760:128:4:1, con absoluta dominancia de los cationes bivalentes. En otros estudios en esta misma laguna (Rodrigo, 1997) se obtuvieron relaciones molares medias de 0,012 entre los

cationes monovalentes y los bivalentes, con máximos de 0,014 y mínimos de 0,010.

3.3.4.- NUTRIENTES INORGÁNICOS

El consumo por parte de los microorganismos es el mayor sumidero de los nutrientes en las aguas naturales (Sommer, 1988a). En sistemas limitados por los nutrientes, la dinámica del plancton depende mayoritariamente de los mecanismos internos que reciclan repetidas veces esos nutrientes. La relación entre la disponibilidad de un nutriente limitante, sus tasas de suministro y la dinámica del plancton debe ser vista desde el punto de vista de los procesos que operan en toda la cadena trófica en diferentes escalas de tiempo (Capblanc, 1990). No se ha pretendido aquí profundizar en ese estudio trófico, sino simplemente ofrecer una visión general de la disponibilidad de los nutrientes inorgánicos, importantes para las poblaciones de microorganismos fotosintéticos planctónicos cuyo estudio detallado se refleja en capítulos posteriores.

Dentro de este apartado se consideran las distintas formas de nitrógeno inorgánico (nitrato, nitrito y amonio), el fósforo reactivo soluble y el fósforo total, y, por su necesidad para las diatomeas, el silicato reactivo soluble. En este caso, a diferencia de la mineralización, las concentraciones de estas sustancias en el agua de la laguna se midieron mucho más frecuentemente, dado que son componentes minoritarios (Margalef, 1983) y sufren importantes variaciones tanto a lo largo del ciclo anual como en el perfil vertical. La laguna está rodeada de campos de cultivo, lo que le garantiza un elevado aporte de nitrógeno, debido principalmente a la lixiviación de los nitratos (Downing y McCauley, 1992), por lo que este elemento se encuentra en el agua de la Laguna de Arcas en concentraciones en que normalmente exceden las necesidades de los microorganismos fotosintéticos. No es el caso del fósforo, que, como veremos, está presente en muy bajas concentraciones en las aguas epilimnéticas de la laguna. Esta limitación resulta muy importante para el desarrollo de las poblaciones fotosintéticas de la quimioclina, en cuyo estudio se ha centrado nuestro trabajo, ya que evita en gran parte el efecto de sombra de los organismos planctónicos del epilimnion (Christensen *et al.*, 1995) cuyas densidades poblacionales son bajas como consecuencia de esa limitación.

También aquí se observa la formación de un importante gradiente en la zona de la quimioclina, a partir de la cual y hacia el fondo aumentan las formas solubles de fósforo y sílice, pero donde se observa la práctica desaparición de las especies oxidadas de nitrógeno inorgánico y la gran acumulación de amonio.

3.3.4.1.- Amonio

De entre las distintas formas de nitrógeno, el amonio es el que alcanza concentraciones más elevadas (figura 3-7). Estas concentraciones son especialmente elevadas en la parte más profunda de la laguna durante los periodos de estratificación, ya que las condiciones reductoras reinantes permiten su acumulación.

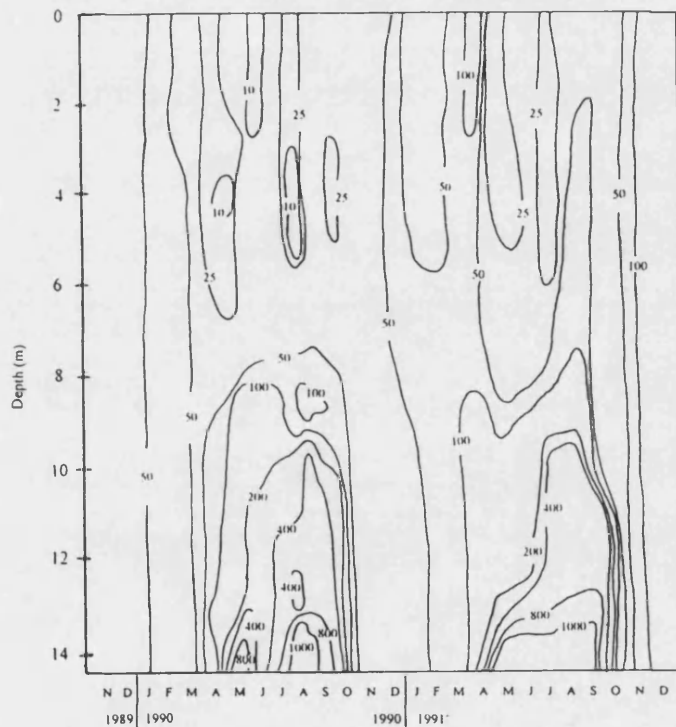


Figura 3.7.- Diagrama espacio-tiempo de las concentraciones de amonio (μM) medidas en la Laguna de Arcas durante el periodo 1989-1991.

Figure 3.7.- Space-time diagram of ammonia concentrations (μM) measured in Lake Arcas during the period 1989-1991.

Durante la mezcla, las concentraciones de amonio se sitúan en torno a $50 \mu\text{M}$, con máximos puntuales de más de $150 \mu\text{M}$, que se detectaron en el último muestreo correspondiente a diciembre de 1991. En el periodo de estratificación las concentraciones epilimnéticas oscilan entre $10\text{-}100 \mu\text{M}$, mientras que en el hipolimnion la concentración media va en aumento con el tiempo, alcanzándose valores que aumentan con la profundidad desde unos $200 \mu\text{M}$ hasta alcanzar en algunos periodos concentraciones superiores a 1mM en las cercanías del fondo de la laguna, si bien las concentraciones superiores a $500 \mu\text{M}$ sólo suelen darse en el interior del pozo central de la laguna. Como se ve en la figura 3-7, durante el

periodo de estratificación se crea un importante gradiente vertical, alcanzándose elevadas concentraciones de amonio al ir este acumulándose en el hipolimnion.

Las altas concentraciones de amonio encontradas en las aguas de la laguna son importantes a la hora de determinar la disponibilidad de nitrógeno para los organismos, ya que la bacterias fotosintéticas, que forman densas poblaciones a nivel de la quimioclina, utilizan esta forma como fuente de nitrógeno (Mortecinos y Van Gernerden, 1986). Esto es aun más reseñable si tenemos en cuenta que la fijación de nitrógeno por estos microorganismos, que podía ser importante en la quimioclina, es un proceso que en las bacterias fotosintéticas resulta inhibido por el amonio. También las cianobacterias presentan preferencia por esta fuente de nitrógeno, si bien también pueden utilizar nitrato. En general, la preferencia por las diferentes formas de nitrógeno inorgánico resulta bastante distinta en los diferentes grupos de microorganismos fotosintéticos (Stolte y Riegman, 1996)

3.3.4.2.- Nitrato

La existencia de campos de cultivo en toda la zona del humedal, y en concreto rodeando a la laguna, posibilita que existan aportes de nitratos como consecuencia de la lixiviación desde estos campos, apareciendo altas concentraciones en la aguas óxicas de la laguna.

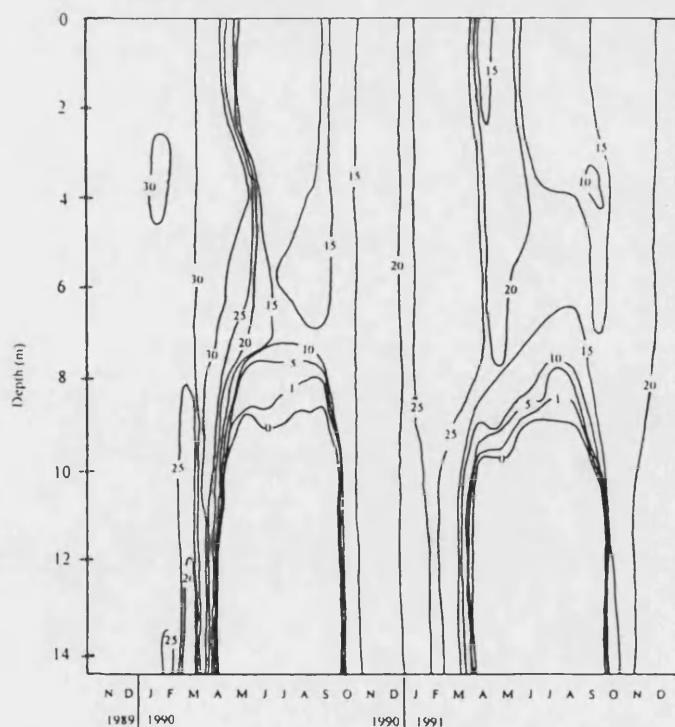


Figura 3.8.- Diagrama espacio-tiempo de las concentraciones de nitrato (μM) medidas en la Laguna de Arcas durante el periodo 1989-1991.

Figure 3.8.- Space-time diagram of nitrate concentrations (μM) measured in Lake Arcas during the period 1989-1991.

Durante la estratificación, el nitrato sólo se encuentra en las aguas óxicas del epilimnion en concentraciones de entre 10 y 20 μM , que se reducen rápidamente en la zona de la oxiclina hasta hacerse cero en el hipolimnion (figura 3-8), donde las condiciones reductoras son incompatibles con su presencia. Ello implica que posiblemente exista una actividad desnitrificante muy importante a nivel de la quimioclina, donde el nitrato puede ser utilizado como aceptor de electrones pasando a nitrógeno molecular (reducción desasimilatoria de nitrato). Durante la mezcla las concentraciones medidas son algo superiores; oscilando entre 15 y 30 μM entre los diversos muestreos y podrían ser resultado no solo de los aportes externos sino también de los procesos de nitrificación a partir del amonio.

3.3.4.3.- Nitrito

El proceso de formación de nitrito debe tener lugar principalmente en la zona de la interfase óxica-anóxica, donde la acción de las bacterias nitrificantes encuentra sus mejores condiciones, pudiendo darse tanto la oxidación del amonio como la del nitrito (Downes, 1988). Así mismo, el proceso de desnitrificación en la redoxclina también libera nitrito, que posteriormente es reducido a nitrógeno molecular.

El nitrito es el menos abundante de los tres compuestos de nitrógeno, con concentraciones mucho más bajas que los anteriores. Los valores más altos obtenidos, correspondientes al invierno de 1990 apenas llegaban a 0,7 μM , mientras que en muchas de las muestras de los distintos muestreos la concentración de este compuesto llegaba a estar por debajo del límite de detección del método (0,01 μM). La distribución de este compuesto en la columna de agua no seguía una tendencia clara, con concentraciones bastante variables entre muestras contiguas, aunque en todos los casos muy bajas, por lo que la información obtenible de estos datos es muy limitada. A pesar de que pudiera ser previsible, no encontramos concentraciones significativamente más altas en la oxiclina, lo cual podría explicarse por un rápido acoplamiento de los procesos de nitrificación nitrosos y nítricos que evitara una acumulación de nitrito. No obstante, en los sistemas sulfatados ricos en sulfhídrico la actividad de los microorganismos implicados en el ciclo del nitrógeno no es muy importante, lo que puede explicar en parte nuestros resultados.

Por tanto, este parámetro no resulta revelador de los procesos de nitrificación que pueden tener lugar en las aguas con oxígeno, ya que no se observa ninguna tendencia clara en su comportamiento. Esta actividad de nitrificación podría quedar puesta de manifiesto en los experimentos de fijación oscura de carbono usando un inhibidor de este proceso (Hall, 1984, capítulo 5), aunque los resultados obtenidos supondrían una actividad nitrificadora en las aguas anóxicas, lo que nos hace pensar que este compuesto podría inhibir otros procesos que también tienen lugar en aguas microaerobias y anóxicas.

Tabla 3.4- Concentraciones medias de nitrito (μM) en la zona de mezcla e hipolimnion de la Laguna de Arcas en algunos de los muestreos realizados.Table 3.4- Mean nitrite concentration (μM) in the mixing zone and hypolimnetic waters from Lake Arcas in some of the samplings

CONCENTRACION DE NITRITO (μM)					
FECHA	ZONA DE MEZCLA	HIPOLIMNION	FECHA	ZONA DE MEZCLA	HIPOLIMNION
13/10/89	0,0678 \pm 0,0543	0,054 \pm 0,0432	25/08/90	0,01 \pm 0,001	0,01 \pm 0,001
4/11/89	0,1232 \pm 0,0886	--	7/09/90	0,0155 \pm 0,0077	0,0302 \pm 0,0222
24/11/89	0,2112 \pm 0,1232	--	24/09/90	0,0238 \pm 0,0098	0,0220 \pm 0,0123
20/12/89	0,2453 \pm 0,1234	--	13/10/90	0,0269 \pm 0,0155	0,0134 \pm 0,0108
17/01/90	0,4416 \pm 0,06	--	9/02/91	0,01 \pm 0,001	--
14/02/90	0,688 \pm 0,08	--	1/05/91	0,0825 \pm 0,0387	0,0474 \pm 0,0417
23/02/90	0,6213 \pm 0,123	0,6762 \pm 0,231	24/05/91	0,0777 \pm 0,0453	0,0499 \pm 0,0355
10/03/90	0,4567 \pm 0,121	0,3654 \pm 0,092	27/06/91	0,0682 \pm 0,0443	0,0344 \pm 0,0241
23/03/90	0,2948 \pm 0,04	0,3039 \pm 0,18	6/08/91	0,0678 \pm 0,0445	0,0512 \pm 0,0413
10/04/90	0,0464 \pm 0,03	0,0344 \pm 0,018	3/09/91	0,0578 \pm 0,0456	0,0789 \pm 0,0544
28/04/90	0,0129 \pm 0,004	0,0223 \pm 0,115	12/09/91	0,0557 \pm 0,0561	0,0922 \pm 0,0828
17/05/90	0,0144 \pm 0,0084	0,0195 \pm 0,141	1/10/91	0,0701 \pm 0,0612	0,0897 \pm 0,0444
8/06/90	0,024 \pm 0,0265	0,0117 \pm 0,0036	8/10/91	0,0712 \pm 0,0545	0,0501 \pm 0,0402
4/07/90	0,01 \pm 0,001	0,01 \pm 0,001	11/10/91	0,0704 \pm 0,0594	0,0347 \pm 0,0343
30/07/90	0,0137 \pm 0,0087	0,0668 \pm 0,0864	13/12/91	0,0555 \pm 0,0375	--

3.3.4.4.- Fósforo soluble y fósforo total.

Ya hemos visto que el nitrógeno es un nutriente excedentario en el sistema, pudiendo encontrarse abundantemente en unas u otras formas a lo largo de todo el ciclo anual y en toda la columna de agua. No es este el caso del fósforo soluble, cuya forma más importante, el ortofosfato, tiene una disponibilidad mucho más limitada en la laguna.

La limitación del fósforo como nutriente esencial es mucho más marcada durante el periodo de mezcla, durante el cual las concentraciones están prácticamente a nivel del límite de detección del método (0,03 μM) o en el mejor de los casos no llegan a 0,1 μM (tabla 3-5). Esta situación es similar a la del epilimnion durante el periodo de estratificación, donde los niveles de fósforo soluble normalmente también son indetectables, aunque puntualmente se han llegado a medir valores máximos de 0,4 μM en junio de 1990, momento en que las concentraciones de fósforo en toda la laguna eran más elevadas de lo normal. En la interfase, donde se acumulan los organismos, la concentración de fósforo soluble es normalmente algo mayor (0,1-0,2 μM). Ya en el hipolimnion, la tendencia es a aumentar su concentración con la profundidad, con valores que podían oscilar de 0,1 a 1 μM según muestreos, siendo en la zona más profunda (entre 13 metros y el fondo) donde el ortofosfato es mucho más abundante, con valores normales entre 1,5 y 3

μM , consecuencia de la liberación de fósforo desde el sedimento a pH ligeramente ácido y en condiciones anóxicas (Nürnberg, 1987). Los intervalos de valores aquí reflejados no deben tomarse como absolutos, ya que existen muestras y muestreos discrepantes, si bien la norma general está reflejada en ellos.

Tabla 3.5- Concentración media de fósforo soluble en las aguas de la Laguna de Arcas en algunos de los muestreos realizados.

Table 3.5- Mean concentration of dissolved phosphorus in Lake Arcas waters in some of the samplings.

CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO SOLUBLE (μM)					
FECHA	ZONA DE MEZCLA	HIPOLIMNION	FECHA	ZONA DE MEZCLA	HIPOLIMNION
13/10/89	0,0702 \pm 0,06	0,134 \pm 0,123	25/08/90	0,0989 \pm 0,0453	0,1123 \pm 0,0899
4/11/89	0,1082 \pm 0,08	--	7/09/90	0,1458 \pm 0,1513	0,107 \pm 0,0514
24/11/89	0,0813 \pm 0,045	--	24/09/90	0,0452 \pm 0,0291	0,0704 \pm 0,0308
20/12/89	0,0736 \pm 0,0321	--	13/10/90	0,04 \pm 0,0129	0,1327 \pm 0,0439
17/01/90	0,0747 \pm 0,04	--	9/02/91	0,03 \pm 0,005	--
14/02/90	0,1063 \pm 0,09	--	1/05/91	0,0419 \pm 0,0276	0,153 \pm 0,1525
23/02/90	0,0657 \pm 0,032	0,0987 \pm 0,0234	24/05/91	0,03 \pm 0,005	0,03 \pm 0,005
10/03/90	0,0675 \pm 0,04	--	27/06/91	0,0336 \pm 0,0114	0,0919 \pm 0,0669
23/03/90	0,0595 \pm 0,01	0,0398 \pm 0,03	6/08/91	0,0628 \pm 0,0522	0,4152 \pm 0,4744
10/04/90	0,0302 \pm 0,005	--	3/09/91	0,0656 \pm 0,0538	0,5671 \pm 0,4325
28/04/90	0,0419 \pm 0,0266	0,03 \pm 0,005	12/09/91	0,0701 \pm 0,0484	0,7984 \pm 0,6078
17/05/90	0,0641 \pm 0,0266	0,4475 \pm 0,9208	1/10/91	0,0676 \pm 0,0523	1,323 \pm 1,12
8/06/90	0,3286 \pm 0,0428	0,8742 \pm 0,9207	8/10/91	0,0578 \pm 0,0456	1,67 \pm 1,56
4/07/90	0,0324 \pm 0,0033	0,4384 \pm 0,4813	11/10/91	0,0576 \pm 0,0378	6,866 \pm 1,963
30/07/90	0,03 \pm 0,005	0,1006 \pm 0,0524	13/12/91	0,032 \pm 0,004	--

Mención aparte merecen los resultados obtenidos en el muestreo del 11 de octubre de 1991, en el que las concentraciones epilimnéticas de fósforo seguían siendo indetectables, mientras que en la zona anóxica las concentraciones medidas oscilaban entre 4 y 8 μM . En este muestreo la laguna estaba mezclándose y de hecho al día siguiente la mezcla era ya total, con lo que el proceso de mezcla supone un aumento pasajero de la concentración de fósforo hipolimnética mientras el hipolimnion se mantiene justo antes de la mezcla total. En este sentido es importante el hecho de que la desestabilización de la laguna supone una aceleración de los procesos de sedimentación de los microorganismos planctónicos, con aporte masivo de fósforo orgánico hacia el fondo, cuyo rápida degradación puede contribuir en parte a esas altas concentraciones.

La limitación por fósforo es un factor generalmente reconocido como importante en el desarrollo del fitoplancton epilimnético (Schindler, 1977; Smith, 1979; Nürnberg y Peters, 1984; Heyman y Lundgren, 1988; Capblanc, 1990; Currie,

1990), donde la disponibilidad de luz es mayor que en las capas profundas de los lagos (Konopka, 1989). La limitación en la disponibilidad de fósforo accesible para los organismos planctónicos incrementa la importancia del fósforo acumulado en los propios organismos como principal reservorio de fósforo en la columna de agua (Berman, 1988; Cotner y Wetzel, 1992; Guy *et al.*, 1994), que al igual que los compuestos orgánicos de fósforo puede ser degradado a ortofosfato por la acción de las fosfatasa liberadas por los microorganismos planctónicos (Jansson *et al.*, 1988a; Berman *et al.*, 1990; Vrba, 1995; Bañeras, 1996), produciéndose un intercambio muy activo entre la fracción disuelta y la particulada (Chrost, 1986; Jansson, 1988). Las migraciones de algunos microorganismos a través de la quimioclina (Salonen *et al.*, 1984) son un mecanismo que también se ha sugerido como importante en la transferencia de fósforo desde las capas hipolimnéticas más ricas en este elemento hacia las aguas epilimnéticas. Como se observa en la figura 3-9, los máximos valores de fósforo total en el perfil vertical se encuentran en la zona de la interfase óxica-anóxica, coincidiendo con la mayor acumulación de organismos planctónicos, con concentraciones bastante más altas que en el epilimnion y que doblan sobradamente las del resto del hipolimnion anóxico, a excepción de los últimos metros de profundidad en los que se pone de manifiesto la resolubilización de fósforo y el intercambio agua-sedimento, aumentando la concentración de fósforo soluble y en consecuencia también el fósforo total, además de la acumulación de detritus particulados que también contribuye a aumentar dicha concentración. En un estudio en 20 lagos estratificados de los Estados Unidos, Cole y colaboradores (1993) encontraron una estrecha relación entre la abundancia de bacterias y el fósforo total, lo que demuestra la importancia de este elemento no solo en el mantenimiento de las poblaciones fotosintéticas, sino también de los heterótrofos, los cuales dependen, en mayor o menor medida, de la producción de los anteriores.

La disponibilidad de fósforo está controlada por las concentraciones de calcio y de hierro (Koschel *et al.*, 1983; Murphy *et al.*, 1983; Nürnberg, 1985; Golterman, 1988; Hongve, 1994; Golterman, 1995a, 1995b), ya que ambos elementos forman compuestos insolubles con el ortofosfato y/o lo adsorben, con lo que secuestran el fósforo y lo acumulan en los sedimentos. En la Laguna de Arcas, las concentraciones de hierro son bajas y las de calcio altas, por lo que es este último elemento el que controla principalmente la concentración de fósforo epilimnético. Es en los periodos de anoxia en los que se producen los procesos químicos que permiten una resolubilización parcial de esos compuestos, liberándose parte del fósforo a las aguas anóxicas (Jansson *et al.*, 1988b; Holtan *et al.*, 1988; Forsberg, 1989). La quimioclina, como zona de transición, es una parte del lago en la que se producen transferencias de ese fósforo hipolimnético hacia la zona óxica (Nürnberg *et al.*, 1986; Stauffer, 1987), bien en su forma soluble o incorporado en forma de polifosfatos y fósforo orgánico por los microorganismos que viven en la quimioclina (James *et al.*, 1990). En este sentido, Bañeras (1996), observó que las poblaciones de bacterias fotosintéticas de la quimioclina tenían una alta

tasa de incorporación de fósforo, lo cual reducía las tasas de difusión de fósforo soluble hacia el epilimnion, con un efecto de filtro biológico que impediría la fertilización de las aguas epilimnéticas, lo que podría explicar las bajas concentraciones de fósforo epilimnético (no solo soluble sino también particulado por la baja concentración de fitoplancton) encontradas en la Laguna de Arcas durante el periodo de estratificación estival.

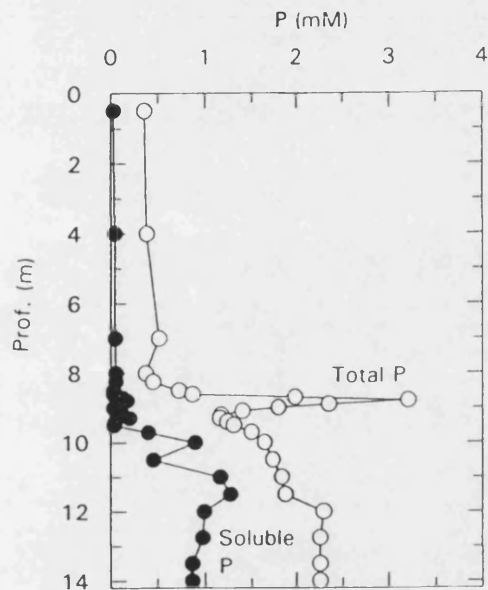


Figura 3.9.- Concentraciones de fósforo soluble y fósforo total medidas en el perfil vertical de la Laguna de Arcas el 12 de septiembre de 1991.

Figure 3.9.- Soluble and total phosphorus concentrations measured in the vertical profile of Lake Arcas on September 12, 1991.

3.3.4.5.- Silicato

La concentración de silicato en las aguas de la laguna resulta bastante elevada a lo largo de todo el periodo estudiado, presentándose marcadas diferencias entre los periodos de estratificación y mezcla (figura 3-10). Durante la mezcla invernal la concentración de silicato en la columna de agua se mantiene en concentraciones comprendidas entre 200 y 250 μM . En el periodo de estratificación la concentración epilimnética es más baja, comprendida entre 100 y 200 μM , coincidiendo con las máximas densidades poblacionales de diatomeas, que lo utilizan en la formación de sus frústulos. En el hipolimnion el efecto es el contrario, ya que la concentración de silicato aumenta con la profundidad, desde valores de 250 μM hasta llegar a concentraciones máximas de 600 μM en el

fondo al final de la estratificación, en un proceso similar al descrito en otros lagos (Conley *et al.*, 1988).

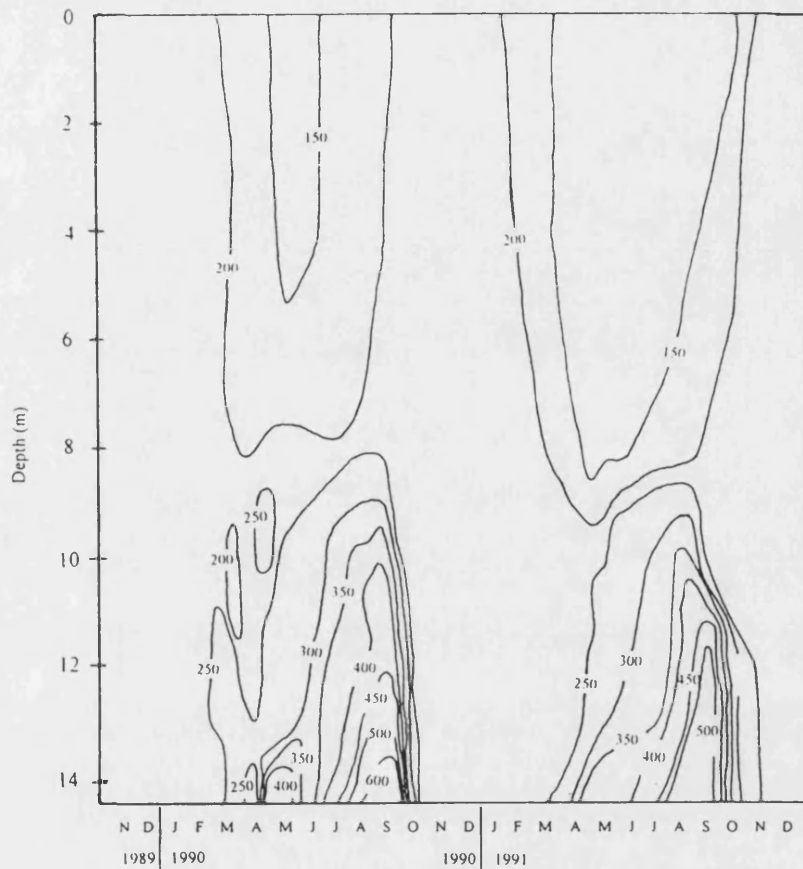


Figura 3.10.- Diagrama espacio-tiempo de la concentración de silicato (μM) medidas en la Laguna de Arcas durante el periodo 1989-1991.

Figure 3.10.- Space-time diagram of silica concentrations (μM) measured in Lake Arcas during the period 1989-1991.

En cualquier caso, la concentración de silicato es siempre suficientemente elevada para que este no sea un factor limitante en el desarrollo de las poblaciones de diatomeas. Esto resulta especialmente importante dado que, como veremos en un posterior capítulo, la población de fitoplancton en el epilimnion está dominada por diatomeas, y la disponibilidad de silicato no solo facilita el crecimiento de estas algas, sino que también impide fenómenos que, como el aumento de la velocidad de sedimentación en poblaciones limitadas por la disponibilidad de silicato (Davey y Heaney, 1989), contribuían a la desaparición estas poblaciones de diatomeas. En consecuencia, y al igual que en otros lagos estratificados (Hongve, 1994), el fósforo parece ser el nutriente que controla el crecimiento de las diatomeas en el epilimnion de la Laguna de Arcas, ya que, si bien ambos elementos resultan esenciales para estas algas, es la relación relativa entre los nutrientes la que determina la naturaleza de la limitación (Tilman, 1988; Brzezinski, 1992; Smith, 1993, Clymo, 1995), sin olvidar que ésta incluso puede

estar influida por otros factores como, por ejemplo, la temperatura (Tilman *et al.*, 1986).

3.3.5.- RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS DE LA LAGUNA

La Laguna de Arcas presenta un régimen holomíctico, con estratificación vertical de las aguas que tiene lugar entre mayo y octubre. En este periodo se establece una termoclina que se va situando cada vez a mayor profundidad a medida que avanza la estratificación. Además de ese periodo de estabilidad continuada, a final de invierno o principio de la primavera pueden tener lugar breves episodios de estabilidad produciéndose una incipiente estratificación de las aguas profundas, incluyendo la aparición de anóxia en estas aguas. Durante el resto del año la laguna sufre un proceso continuo de circulación vertical de sus aguas.

Durante el periodo de estratificación se establece un hipolimnion anóxico rico en sulfhídrico, comprendido entre los 8-9 metros y el fondo de la laguna, en el cual se alcanzan altas concentraciones de sulfhídrico, dada la elevada actividad de reducción de sulfato. El paso de un ambiente oxidante a uno reductor tiene lugar en una escala de centímetros a nivel de la interfase óxica-anóxica. En esta zona de la laguna se establece un fuerte gradiente de óxido-reducción, pasándose de potenciales mayores de 300 mV a potenciales negativos. Ello supone la sustitución, total o parcial, de los estados oxidados de las diferentes especies químicas por sus estados reducidos.

La mineralización de las aguas de la Laguna de Arcas es relativamente elevada, con valores de conductividad superiores a los 2000 $\mu\text{s}/\text{cm}$ en las aguas epilimnéticas y que en las aguas del hipolimnion profundo alcanzan ocasionalmente los 3300 $\mu\text{s}/\text{cm}$. Esta alta mineralización se debe principalmente a la presencia de sulfato y calcio, derivados de la disolución del sustrato de yesos, contribuyendo en menor medida los carbonatos y el magnesio, mientras que las concentraciones de cloruro, sodio y potasio son muy bajas.

El fósforo es el nutriente inorgánico limitante para el crecimiento de los microorganismos, encontrándose en las aguas epilimnéticas a niveles prácticamente indetectables. En cambio, el nitrógeno inorgánico es muy abundante, siendo su forma mayoritaria el amonio, que no solo se acumula en las aguas hipolimnéticas en concentraciones muy elevadas sino que también aparece en el epilimnion, donde coexiste con el nitrato, que se encuentra en concentraciones de 10-30 μM , mientras que la forma intermedia, el nitrito, presenta concentraciones bajas. El silicato, importante dada la presencia de poblaciones epilimnéticas de diatomeas, es muy abundante en toda la laguna, aumentando su concentración en el hipolimnion.

CAPÍTULO 4

DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

4.1.- INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se describen las características de los principales microorganismos fotosintéticos que se desarrollan en las aguas microaerobias y anóxicas de la Laguna de Arcas. Se presenta también una breve descripción de las comunidades fitoplanctónicas epilimnéticas, así como de las poblaciones del zooplancton que se encuentra en la laguna.

Con mayor detalle se describe la dinámica poblacional de las diferentes especies de microorganismos fotosintéticos que habitan las aguas de la quimioclina de la laguna durante los periodos de estratificación, estudio que ha dado lugar a los capítulos siguientes que profundizan en algunos aspectos de la biología de algunos de estos organismos. En cuanto a la población de *Cryptomonas*, no tratada específicamente en capítulos posteriores, los resultados obtenidos en nuestro trabajo son bastante limitados, ya que se ciñen al seguimiento de su dinámica poblacional, a la observación de sus posibles predadores, y a algún pequeño experimento de supervivencia en aguas sulfurosas. Lamentablemente, a pesar de los intentos hechos, no pudimos encontrar las condiciones idóneas para su aislamiento y cultivo y, en lo que respecta al trabajo de campo, tampoco se había diseñado específicamente para estudiar la población de esta criptoficea. Dado que la información obtenida de los resultados no es excesivamente abundante, la discusión al respecto se basa en la comparación de los mismos con la vasta literatura existente al respecto, lo que permite aventurarnos a hacer algunas conjeturas sobre el funcionamiento de esta población algal.

En muchos estudios sobre lagos estratificados no se ha podido llegar a determinar la estructura fina de la estratificación de los microorganismos en la zona de la quimioclina, ya que los métodos de muestreo no eran los adecuados. Cuando se usaban técnicas precisas, como es nuestro caso, se revelaba la aparición de poblaciones finamente estratificadas que incluían microorganismos pertenecientes a distintos grupos taxonómicos (Croome y Tyler, 1984a, 1988; Gasol *et al.*, 1990). En este sentido son interesantes los trabajos realizados en los lagos españoles en la descripción de las poblaciones de bacterias fotosintéticas, algunos de los cuales se encuentran recopilados por Guerrero y colaboradores (1987a).

4.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se describen las técnicas utilizadas en el estudio de las poblaciones de los microorganismos fotosintéticos presentes en las aguas microaerobias y anóxicas de la Laguna de Arcas, tanto en lo que se refiere a su caracterización como respecto a la dinámica de las poblaciones.

4.2.1.- AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE LOS PROCARIOTAS FOTOSINTÉTICOS

4.2.1.1.- Aislamiento, cultivo e identificación de cianobacterias

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento y cultivo de las distintas cepas de cianobacterias filamentosas fue el denominado BG-11 (Rippka *et al.*, 1979), cuya composición se detalla en las tablas 4-1 y 4-2. Es obligatorio reseñar que toda el agua utilizada en la preparación del medio de cultivo era agua milli-Q (calidad analítica), dado el efecto inhibitorio que pueden tener trazas de diversos elementos en el crecimiento de la cianobacterias.

Tabla 4.1.- Composición del medio de cultivo para cianobacterias.

Table 4.1.- Composition of culture medium for cyanobacteria.

Compuesto	Cantidad en el medio (g·l ⁻¹)
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036
Citrato trisódico	0,006
Citrato férrico amónico (17 % Fe)	0,006
EDTA sal disódica	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Solución de oligoelementos A ₅ + Co	1 ml

Tabla 4.2.- Solución de elementos traza (A₅ +Co) usada para el cultivo de cianobacterias

Table 4.2.- Trace element solution (A₅ +Co) used for cyanobacterial cultures.

Compuesto	Cantidad en la solución(g·l ⁻¹)
H ₃ B ₃	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,390
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,0494

Para la elaboración del medio se preparaban soluciones más concentradas de los distintos compuestos, tomándose una cantidad determinada de ellas para preparar el medio de cultivo final. En una botella de pyrex de 1 litro se añadían las cantidades necesarias de las soluciones de cada compuesto (excepto el fosfato, el citrato férrico amónico y la solución de oligoelementos), aforándose hasta 900 ml y esterilizándose por autoclavado a 121°C durante 20 minutos. La solución de fosfato se preparaba y esterilizaba por separado, disolviendo 0,04 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ en 100 ml de agua milli-Q, añadiéndose al resto de medio tras el autoclavado para evitar la precipitación del fosfato con otros componentes del medio. El citrato férrico amónico también se preparaba y esterilizaba por separado, añadiéndose al medio posteriormente 1 ml por litro de una solución a la concentración de $6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de este compuesto. La solución de oligoelementos se esterilizaba por filtración y se añadía al resto del medio después de autoclavado, a razón de 1 ml por litro. Esta solución contenía los siguientes compuestos:

Cuando se preparaba medio sólido, la dilución de los componentes se hacía en 500 ml en lugar de en 900 ml, mientras que se disolvían 12 gramos de agar bacteriológico (Difco) en 400 ml agua, esterilizándose por separado (Thiel *et al.*, 1989) y mezclándose con los otros componentes una vez autoclavados.

Aislamiento y cultivo

El aislamiento de las distintas cepas de cianobacterias filamentosas se realizó mediante siembra en medio sólido (Castenholz, 1988, Rippka, 1988). Para ello se preparaban placas de medio BG-11 con agar al 1,2 %, inoculándose por estría con la muestra de agua del lago. Las placas se incubaban a 22°C en condiciones de baja iluminación ($10 \mu\text{mol fotonos} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ suministrados por lamparas fluorescentes de luz blanca). Al tratarse de filamentos móviles se producía un crecimiento radial, que, trabajando bajo una lupa binocular, permitía tomar filamentos más o menos aislados. Estos filamentos se recogían cortando una pequeña porción de agar a su alrededor y se transferían a una nueva placa o a medio líquido. Tras diversas transferencias se consiguió obtener los cultivos de las tres principales especies de cianobacterias filamentosas presentes en el lago. Los cultivos eran unialgales, esto es, la cepa respectiva era el único organismo fotoautótrofo presente, y, aunque no se trataba de cultivos axénicos, la contaminación por bacterias heterótrofas era muy baja. Estas condiciones eran suficientes para poder realizar los experimentos proyectados, a pesar de lo cual se intentó seguir purificando para obtener cultivos axénicos, con nulo éxito. Mucho se ha escrito respecto a la imposibilidad de obtener cultivos axénicos de diversas especies de cianobacterias, con el argumento general de que los heterótrofos acompañantes producen ciertas sustancias necesarias para el crecimiento de las cianobacterias. No utilizaré aquí esta excusa, sino más bien la idea de que no se ha conseguido llegar a las condiciones de cultivo idóneas para la purificación. En

cualquier caso, al ser suficiente con los cultivos unialgales obtenidos se pudo continuar con el plan de trabajo previsto.

Los cultivos líquidos obtenidos se mantenían (y se siguen manteniendo) en una cámara climática a 22°C, a 40 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ suministrados por una combinación de tubos fluorescentes de luz blanca (Sylvania). Las condiciones de mantenimiento una vez aisladas no requieren una luz tan baja como la utilizada en el aislamiento, por lo que el uso de una iluminación mayor compensa en parte el efecto de autosombra que se produce en los cultivos líquidos. Estos cultivos se transfieren mensualmente a medio BG-11 recién preparado.

Identificación

Las tres cepas de cianobacterias unicelulares obtenidas en cultivo unialgal se asignaron a sus respectivas especies y/o géneros usando criterios principalmente morfológicos. La taxonomía de las cianobacterias ha sido un motivo de polémica entre los botánicos y los microbiólogos, sin embargo en los últimos años se ha llegado a un acuerdo dentro del cual la clasificación de Geitler sirve como un buen punto de partida (Whiton, 1992). Para ello se siguió la clasificación de Geitler (1932) y las cepas fueron identificadas como *Oscillatoria ornata* (la que forma densas poblaciones meta- e hipolimnéticas en la Laguna de Arcas), *Oscillatoria tenuis* y *Pseudanabaena* sp. La clasificación de las cianobacterias, como la de las algas microscópicas, sigue basándose en criterios morfológicos, aunque ya se comienzan a dar los primeros pasos encaminados a sistemas de identificación basados en capacidades metabólicas y en su biología molecular. La clasificación en base a la morfología supone probablemente un alto grado de inexactitud, y debo confesar que en este caso no me otorga una gran confianza, pero no es menos cierto que la importancia del nombre asignado es muy relativa, siendo lo realmente importante el conocer la ecofisiología del organismo para intentar explicar lo que sucede en la naturaleza.

4.2.1.2.- Aislamiento, cultivo e identificación de bacterias fotosintéticas del azufre.

Medio de Cultivo

El medio utilizado para el aislamiento y cultivo de estos microorganismos fue el medio de Pfennig (1965) modificado por Van Gernerden y Beeftink (1981). Este medio se utiliza normalmente en su forma líquida, aunque en ciertas etapas del aislamiento se adiciona de agar. El medio se utilizó para el cultivo de todas las especies de bacterias fotosintéticas del azufre aisladas de la laguna, con la única variación del pH final, que variaba entre 6.7 y 7.2. Al tratarse de microorganismos anaerobios la preparación y envasado del medio exige mantener estas condiciones, usando como recipiente para su preparación un matraz erlenmeyer invertido de doble boca, que permite trabajar en condiciones de

presión positiva de N₂, que es insuflado continuamente durante el proceso de mezcla de las diversas soluciones estériles y el envasado del medio en botellas o tubos adecuados para el cultivo anaerobio, en un procedimiento similar al descrito por Siefert y Pfennig (1984).. La solución de sales (tabla 4-3) se prepara directamente en este matraz, esterilizándose todo el sistema posteriormente. Una vez esterilizado se acopla a un rudimentario sistema de refrigeración y cuando la solución salina se enfría se añaden las cantidades correspondientes del resto de soluciones previamente esterilizadas.

Tabla 4.3.- Soluciones preparadas por separado necesarias para preparar el medio de cultivo de bacterias fotosintéticas del azufre (Imhoff, 1988).

Table 4.3.- Solutions prepared separately, which are necessary for the preparation of culture medium for phototrophic sulfur bacteria (Imhoff, 1988).

Solución salina (SL 0)	
Compuesto	Cantidad en la solución(g·l ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	0,34
NH ₄ Cl	0,40
KCl	0,34
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,42
CaCl ₂	0,22

Solución de oligoelementos I (SL I)	
Compuesto	Cantidad en la solución(g·l ⁻¹)
FeCl ₂ ·4H ₂ O	1,49
H ₃ BO ₃	0,062
ZnCl ₂	0,068
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,090
CuCl ₂ ·H ₂ O	0,017
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,240
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,024
HCl 35 %	4,3 ml

Solución de oligoelementos II (SL II)	
Compuesto	Cantidad en la solución(g·l ⁻¹)
NaOH	4,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,048

Solución de vitamina B ₁₂ (SL III)	
Compuesto	Cantidad en la solución(μg·l ⁻¹)
Cianocobalamina	12

Solución de bicarbonato (SL IV)	
Compuesto	Cantidad en la solución(g·l ⁻¹)
NaHCO ₃	85,71

Solución de realimentación (SL V)	
Compuesto	Cantidad en la solución(g·l ⁻¹)
Na ₂ S·9H ₂ O	24,6
Na ₂ CO ₃	9,3

Las distintas soluciones se esterilizan por separado mediante autoclavado a 121°C durante 20 minutos, excepto la de vitamina B₁₂ que por su carácter termolábil se esteriliza por filtración. La solución de realimentación se prepara y envasa ya inicialmente en condiciones anaerobias y con agua destilada desaireada, para evitar la oxidación del sulfuro, utilizándose no sólo en la preparación inicial del medio sino también para realimentar periódicamente los cultivos. La preparación definitiva del medio se realiza en el recipiente antes citado, insuflando N₂ y añadiendo a la solución salina (SL0) las siguientes cantidades de los otros componentes del medio y aforando a un litro con agua milli-Q:

Tabla 4.4.- Volúmenes de las distintas soluciones añadidos para preparar el medio de cultivo de bacterias fotosintéticas del azufre.

Table 4.4.- Volumes of the different solutions used for preparation of culture medium for cultivation of phototrophic sulfur bacteria.

Solución	Cantidad en el medio (ml·l ⁻¹)
SL I	1
SL III	1
SL III	1
SL IV	18
SL V	10

El medio así preparado se envasa finalmente en botellas o tubos adecuados para el cultivo anaeróbico llenándolos a rebosar y almacenándose refrigerados en oscuridad hasta el momento de su utilización.

Aislamiento y cultivo

En nuestro laboratorio se obtuvieron cultivos de las principales especies de bacterias fotosintéticas del azufre presentes en la laguna. Las técnicas de aislamiento utilizadas estaban condicionadas por la necesidad de mantenimiento de condiciones anaerobias. El aislamiento podía efectuarse directamente desde muestras de agua o a partir de enriquecimientos, selectivo o no, de la misma. El medio utilizado era el descrito anteriormente, adicionado de agar para obtener un medio sólido. El agar se lavaba repetidamente con agua destilada para eliminar posibles impurezas, preparándose una solución al 3 % y se esterilizaba separadamente del resto del medio. Este agar se repartía a razón de 3 ml por tubo, los cuales se mantenían en un baño a 60°C. A cada tubo se añadían 6 ml de medio líquido completo, que se precalentaba en un baño a 43°C, depositándose posteriormente los tubos con la mezcla en el mismo baño. En estos tubos se realizaban diluciones seriadas de la muestra o enriquecimiento correspondiente, agitándose cuidadosamente entre cada dilución, colocándose en un recipiente con agua fría una vez inoculados. Una vez solidificado el agar, se añadían dos ml de

parafina estéril fundida que rápidamente solidificaba, se insuflaba N₂ estéril dentro del tubo y este se cerraba con un tapón de butilo. Los tubos inoculados se mantenían en la oscuridad durante 12 horas para evitar la fotólisis celular, tras lo cual se procedía a su incubación en una cámara iluminada a 25°C, a distintas intensidades luminosas suministradas por lámparas fluorescentes. Cuando se observaba crecimiento de colonias pigmentadas en un tubo, se retiraba la parafina mediante calor y, usando un tubo capilar preparado a partir de una pipeta pasteur, y trabajando bajo una lupa binocular, se succionaba una colonia y se transfería a un tubo de ensayo, con tapón de rosca, repleto de medio líquido. Estos cultivos líquidos se incubaban en las mismas condiciones de luz y temperatura que los anteriores, añadiéndose periódicamente una solución neutralizada de sulfuro sódico. A partir de estos cultivos se realizaban nuevos procesos de purificación en medio sólido siguiendo la metodología anterior, hasta obtener cultivos axénicos que se mantenían en frascos de cultivo anaerobio a 25°C en una cámara iluminada. Estos cultivos se realimentaban periódicamente con la solución neutralizada de sulfuro sódico y se transferían trimestralmente en medio líquido.

Identificación

Para la identificación de las distintas especies se utilizaron los criterios descritos en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989), basados en características morfológicas, composición pigmentaria, movilidad, metabolismo, ultraestructura, etc.

4.2.2.- RECuentOS DE MICROORGANISMOS.

En el proceso de recuento de los microorganismos presentes en las muestras era necesario el uso de fijadores, que se añadían en las cantidades apropiadas en cada caso, si bien los volúmenes de fijador añadidos debían ser considerados, ya que si bien el volumen de fijador es mucho menor que el de muestra si que se produce un efecto de dilución sobre la misma. En general los métodos utilizados se basan en la utilización de la microscopía óptica, aunque la microscopía electrónica de barrido resulta de utilidad en determinados aspectos. La amplitud de la muestra contada (campos o microorganismos) debe ser suficientemente grande para obtener unos resultados estadísticamente fiables (Kirchman, 1993)

4.2.2.1.- Recuentos de las cianobacterias filamentosas y de *Cryptomonas*.

Los recuentos de estos organismos se realizaban utilizando técnicas clásicas de sedimentación y recuento con microscopio invertido de muestras previamente fijadas con lugol (Utermöhl, 1958; Lund *et al.*, 1958; Hasle, 1978; Rott, 1981)

Se recogían 250 ml de muestra de la profundidad correspondiente directamente en botellas de vidrio, añadiéndose al finalizar el muestreo 2 ml de lugol por

botella. Las muestras así tratadas se conservan bien durante muchos meses (e incluso años) y pueden ser almacenadas para su posterior recuento. Para ello se situaba en una cámara de sedimentación un volumen de muestra concreto (de 10 a 100 ml), añadiéndose agua destilada si era necesario para completar el volumen de la torreta de la cámara de sedimentación. Las muestras se dejaban sedimentando durante 48 horas, tras lo cual se retiraba cuidadosamente la torreta superior y se situaba un cubreobjetos que cerraba la cámara inferior que contenía todos los organismos ya sedimentados, previniendo la formación de burbujas. La cámara se llevaba a un microscopio invertido Olympus IM donde se contaban entre 100 y 200 campos a 1000 aumentos, determinándose el número de filamentos de cada una de las tres especies de cianobacterias filamentosas, de células de *Cryptomonas* spp., y los tamaños de los 100 primeros filamentos o células de todos estos organismos (o del total contado si el número fuera inferior, como era el caso de *Oscillatoria tenuis* y *Pseudanabaena* sp.). El cálculo del número de individuos de cada especie presentes en cada muestra se realizaba mediante la siguiente expresión:

$$n = X \cdot \frac{S}{a} \cdot \frac{\delta}{v}$$

siendo:

n el número de individuos de cada especie por ml de muestra,
 X el número medio de microorganismos de la especie por campo,
 S el área de la superficie de la cámara de sedimentación (μm^2),
 a el área del campo (μm^2),
 δ el factor de dilución, y,
 v el volumen de muestra sedimentado (ml).

4.2.2.2.- Recuentos de las bacterias fotosintéticas del azufre.

La cuantificación del número de organismos de este tipo presentes en las muestras se realizaba utilizando una técnica de tinción de las células previamente recogidas sobre una membrana (figura 4-1) y su posterior recuento microscópico (Jones, 1979).

La muestra se recogía en tubos de ensayo con tapón de rosca (Corning) de 13 ml de capacidad que se llenaban totalmente y se adicionaban 250 μl de formol 35-40 % para fijarla. Los volúmenes de muestra utilizados para el recuento eran variables en función de la concentración celular esperada, y oscilaban entre 1 y 10 ml. Estos volúmenes de muestra, previa agitación del tubo que los contenía, se filtraban a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.2 μm de paso de poro (Sartorius), colocado sobre un soporte de filtración de 25 mm de diámetro. Previamente a la adición de la muestra, se colocaban en el embudo 10 ml de agua destilada (previamente filtrada para evitar el aporte de partículas), de manera que la distribución de la muestra sobre el filtro fuera homogénea. Para evitar errores

de cálculo, se utilizaba la superficie de filtración efectiva en el cálculo del número de células (Lebaron *et al.*, 1994)

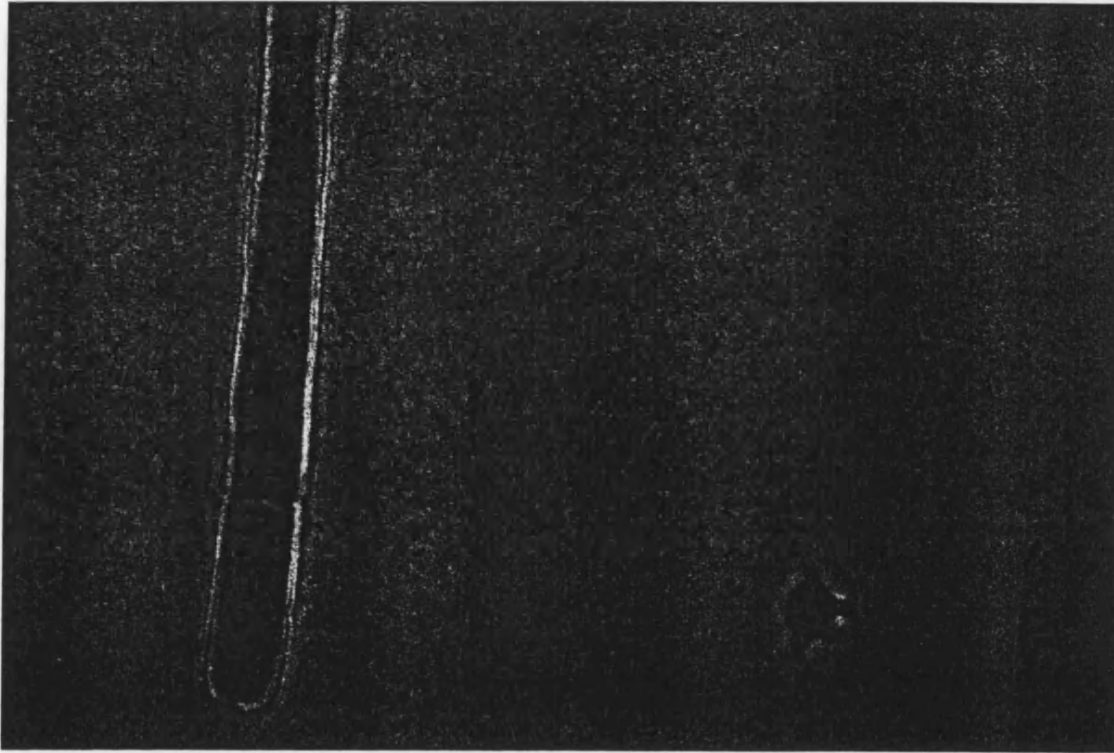


Figura 4.1.- Imagen de una muestra de la quimioclina de la Laguna de Arcas correspondiente al 12 de septiembre de 1991, tratada según el procedimiento descrito para el recuento de bacterias fotosintéticas del azufre.

Figure 4.1.- Micrograph of a sample from Lake Arcas chemocline sampled on September 12, 1991, treated according to the procedure described for enumeration of photosynthetic sulfur bacteria.

Una vez filtrada la muestra se realizaba un lavado con agua destilada filtrada para recoger lo que pudiera quedar adherido a las paredes del filtrador. Toda la filtración se realizaba con una presión de succión máxima de 200 mm de Hg, suministrada por una bomba de vacío manual (Nalgene) conectada al kitasatos. Una vez terminado el proceso de filtración, el filtro se depositaba en el interior de una placa Petri sobre un papel de filtro, que previamente se había impregnado con una solución de eritrosina al 3 % (preparada en una solución acuosa de fenol al 5 %). En cada placa se podían situar varios filtros, convenientemente identificados, manteniéndose las placas tapadas y en la oscuridad durante unas 12 horas, tiempo en el que se completaba el proceso de teñido. A continuación los filtros se transferían a nuevas placas Petri, depositándolos sobre papel de filtro empapado con agua destilada, realizándose cuatro transferencias más en estas condiciones, con lo que se conseguía el desteñido de los filtros, conservando las células bacterianas el colorante. Finalmente se realizaba una última transferencia, pero esta vez sobre papel de filtro seco, y una vez secados

los filtros estos se guardaban, convenientemente identificados, en pequeñas placas Petri de 30 mm de diámetro, manteniéndose en un lugar seco y oscuro hasta que se procedía a su observación microscópica.

Para proceder al recuento, se colocaba una gota de aceite de inmersión sobre un portaobjetos, depositándose sobre ella una porción del filtro (con la superficie de filtración hacia arriba) y sobre este un cubreobjetos. El aceite de inmersión hace que el filtro de acetato de celulosa se vuelva transparente, lo que permite que sea observado microscópicamente con iluminación transmitida. La observación y recuento de las células, teñidas de un color rosado, se realizó en contraste de fases a 1250 aumentos utilizando un microscopio Zeiss III dotado de un objetivo de inmersión Neofluor 100 y de una cuadrícula ocular, cuya área se determinó usando un micrómetro objetivo. Se contaron entre 50 y 150 campos, con un número de individuos que en ocasiones excedía los 2000 en la especie más abundante. *Amoebobacter* sp es una bacteria que formaba agregados (Pedrós-Alió y Sala, 1990), lo cual derivaba en unas desviaciones típicas mucho mayores para los recuentos de esta bacteria en comparación con el resto. Para el cálculo del número de microorganismos de cada especie por volumen de muestra (n) se utilizó la siguiente relación:

$$n = X \cdot \frac{S}{a} \cdot \frac{\delta}{v}$$

siendo:

n el número de microorganismos por ml.

X el número medio de microorganismos de la especie por campo,

S el área de la superficie de filtración (μm^2),

a el área de la cuadrícula (μm^2),

δ el factor de dilución, y,

v el volumen de muestra filtrado (ml).

Las primeras 100 células de *Chromatium weissei* que no presentaban inicio de división se medían con el fin de determinar el tamaño celular medio de esta especie en cada muestra. También se anotaban las células contadas que estaban en división.

4.2.3.- ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA DINÁMICA POBLACIONAL

La estimación de estos parámetros se realizaba en base a resultados obtenidos mediante las técnicas de recuento antes descritas, por lo que la primera fase, esto es, la obtención de los datos de densidades poblacionales, observación de células, etc., se basa en los métodos anteriormente descritos.

4.2.3.1.- Cálculos del biovolumen total de cada especie

Para el cálculo de los biovolúmenes se medían al menos 100 individuos de cada una de las especies que aparecían en cada una de las muestras, utilizando los mismos filtros preparados para los recuentos celulares. La forma de cada organismo se asimilaba a la de una figura geométrica más o menos compleja (Rott, 1981), lo que permitía aplicar las fórmulas de cálculo del volumen de dichas figuras para calcular el biovolumen de los microorganismos (tabla 4-5). La medida de los microorganismos en cada muestra es aconsejable, ya que el uso de unos biovolúmenes normalizados de manera global para cada microorganismo puede llevar a errores de consideración, ya que este puede cambiar tanto con la profundidad como con el estado de desarrollo de la población (Gaju *et al.*, 1989).

Tabla 4.5.- Fórmulas utilizadas para el cálculo de los biovolúmenes de los principales microorganismos fotosintéticos. W = anchura, L = longitud.

Table 4.5.- Formula used for calculation of biovolumes of the main phototrophic microorganisms. W = width, L = Length

ORGANISMO	FIGURA GEOMÉTRICA	FORMULA CALCULO
<i>Chromatium weissei</i>	cilindro y dos medias esferas	$\pi \cdot W^3 \cdot (L/4 - W/12)$
<i>Amoebobacter sp.</i>	esfera	$(\pi/6) \cdot W^3$
<i>Thiocapsa sp.</i>	esfera	$(\pi/6) \cdot W^3$
<i>Pelodictyon clathratiforme</i>	cilindro	$(\pi/4) \cdot W^2 \cdot L$
<i>Cryptomonas spp.</i>	cono y media esfera	$(\pi/12) \cdot W^2 \cdot (L+W/2)$
<i>Oscillatoria ornata</i>	cilindro	$(\pi/4) \cdot W^2 \cdot L$

A partir de los biovolúmenes medios por individuo calculados para cada muestra correspondiente a una profundidad o muestreo distinto, se multiplicaba dicho valor por el número de individuos por ml contados en esa muestra, con lo que se obtenía el biovolumen total con el que cada uno de los microorganismos contribuía a la comunidad fotosintética, considerando sólo los principales microorganismos fotosintéticos presentes en las capas microaerobias y anaeróbicas.

Aunque cabía la posibilidad de realizar un cálculo de biomasa a partir del biovolumen en función de trabajos de distintos autores (Bakken y Olsen, 1983, Bratbak y Dundas, 1984; Bratbak, 1985, Nagata y Watanabe, 1990, Fry, 1990), consideramos que la utilización de coeficientes de aplicación directa no sería muy apropiada en nuestro caso, ya que los microorganismos aquí estudiados sufren importantes cambios de densidad celular como consecuencia de su metabolismo en el medio natural, además de que los trabajos de distintos autores alertan sobre la no existencia de una relación directa entre tamaño celular y biomasa (Lee y Fuhrman, 1987; Kroer, 1994)

4.2.3.2.- Tasas netas de crecimiento de las poblaciones

Las tasa de crecimiento de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos se calcularon haciendo una integración del total de microorganismos de cada especie presentes en la laguna, asumiendo un modelo exponencial. Para ello se realizó una cubicación de la laguna y de los volúmenes de agua para los que cada muestra resultaba significativa, sumándose la contribución de cada una de esas capas para obtener una evaluación de la población total de cada una de las especies. Las tasas únicamente se calcularon en los periodos en los que la estratificación estaba bien establecida, ya que en los periodos breves de estratificación las poblaciones aparecían y desaparecían en pocos días, lo que hacía inviable cualquier cálculo.

Puesto que no se realizó una evaluación de los factores de pérdida en las poblaciones, las tasas aquí calculadas representan un balance entre la reproducción celular y dichos procesos de pérdida (tasas netas), ofreciendo una idea de los periodos en los cuales se produce crecimiento o disminución en las poblaciones de los microorganismos estudiados.

4.2.3.3.- Frecuencia de células en división en *Chromatium weissei*

La presencia en las poblaciones bacterianas de células en proceso de división, esto es, aquellas que presentan una clara invaginación en la envoltura celular, puede ser utilizada para deducir las tasas de crecimiento poblacional en sistemas naturales (Hagström *et al.*, 1979), así como para detectar las poblaciones que presentan un crecimiento más activo. Este método ha sido utilizado también para evaluar no solo el crecimiento sino también la productividad de poblaciones de microorganismos planctónicos, incluyendo organismos fotosintéticos (Pick y Bérubé, 1992; Affronti y Marshall, 1994). La frecuencia de células en división (FDC) se calcula refiriendo el número de bacterias observadas en proceso de división durante los recuentos celulares respecto al número total de células, expresándose como porcentaje (Newell y Christian, 1981).

Muchos estudios han evitado el uso de la frecuencia de células en división para el cálculo de la tasa de crecimiento, limitándose a utilizarlo solo como un indicador de la división (Fry, 1990). En nuestro caso, esta técnica fue utilizada únicamente para el caso de la especie dominante dentro de las poblaciones de bacterias fotosintéticas del azufre, *Chromatium weissei*, ya que ésta aportaba la mayor parte de la biomasa fotosintética debida a bacterias, siendo además muy fácil de distinguir las células que se encontraban en proceso de división debido al gran tamaño de las bacterias de esta especie. Además, no se pretendía con ello el cálculo de una tasa intrínseca de crecimiento, sino únicamente distinguir en que estratos se producía prioritariamente el crecimiento de la población de esta bacteria.

En el tratamiento de los datos se hizo un cálculo global de la frecuencia de células en división dividiendo la población de *Chromatium weissei* en dos subpoblaciones, separando la zona en la que todavía llegaba la luz de aquella parte del hipolimnion que se encontraba permanentemente en la oscuridad. Este criterio se basa en el hecho de que la actividad fotosintética de estas bacterias, que proporciona la fijación de carbono imprescindible para el aumento de biomasa, se ve limitada a la parte superior de la población, ya que el resto de la misma se encuentra en profundidades a las que la luz, o no llega, o no es utilizable para la fotosíntesis, por lo que el crecimiento de un organismo fotosintético se ve limitado.

4.2.3.4.- Supervivencia de *Cryptomonas* spp. en la oscuridad

Para estimar la supervivencia de *Cryptomonas* en la oscuridad se tomaron muestras durante el período de estratificación de distintas profundidades en las que este microorganismo era abundante, introduciéndolas en tubos herméticos (Vacutainer) y manteniéndolas en la oscuridad a una temperatura similar a la de la profundidad de que provenían, procediéndose a su observación microscópica en periodos de 12 horas durante dos semanas.

4.2.4.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

4.2.4.1.- Microscopía electrónica de barrido

Las muestras, recogidas por centrifugación, se fijaron con glutaraldehído-tampón cacodilato pH 7.2 durante dos horas, efectuándose lavados sucesivos con el tampón y realizando una postfijación con una solución de tetróxido de ósmio al 1 %. Tras eliminar el exceso de ósmio mediante varios lavados, se realizó la deshidratación por pases sucesivos a través de etanol de concentraciones crecientes (30, 60, 90 y 100 %) durante periodos de 15 minutos, tras los cuales se centrifugaba la muestra. Una vez finalizada la deshidratación las muestras se sometieron a un proceso de desecación en el punto crítico, tras el cual se realizó un recubrimiento con oro, quedando así listas para la observación

4.2.4.2.- Microscopía electrónica de transmisión

La preparación de las muestras para microscopía de transmisión comenzaba con una fijación con glutaraldehído al 6 % en tampón fosfato 0.1 M pH 7,2, durante 2 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo se realizaron varios lavados con tampón fosfato, seguido de una postfijación con tetróxido de ósmio al 1 % en tampón fosfato 0.1M pH 7,2 durante 1-2 horas, realizándose posteriormente nuevos lavados con el tampón. El proceso de deshidratación consistió en un pase a través de etanol 30, 60 y 90 %, (durante 15 minutos cada uno) terminando por tres pases

de 10 minutos cada uno en etanol 100 %. El proceso de inclusión fue progresivo, realizándose mezclas de etanol:resina en las proporciones 3:1, 1:1 y 1:3, en las que la muestra se mantuvo sucesivamente durante una hora en cada una de ellas. Seguidamente las muestras se transfirieron a resina Spurr pura, dejándose durante una noche, transfiriéndose a una nueva resina y polimerizándose dos horas después a 70°C durante 8 horas usando un horno de polimerización TAAB MN-11. Con un ultramicrotomo, se obtuvieron cortes de 90 nm que fueron teñidos durante 10 minutos con acetato de uranilo (preparado al 5 % en etanol), lavados varias veces con agua bidestilada y transferidos a una solución alcalina de Reynolds de citrato de plomo durante 5 minutos. Por último los cortes se lavaron dos veces con NaOH 0.1 M y se realizaron varios lavados con agua bidestilada, quedando montados sobre rejillas y listos para la observación.

4.2.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para realizar el análisis de componentes principales se procedió a seleccionar previamente una serie de transformaciones tendentes a la normalización de las variables físico-químicas y biológicas introducidas en el análisis, consistentes mayoritariamente en una transformación logarítmica, excepto para los parámetros que, como el pH ya venían afectados por dicha relación. El análisis se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 6.0 para Macintosh, determinándose los principales factores explicativos de la variación de los diferentes parámetros en las muestras.

4.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1.- DESCRIPCIÓN DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

En este apartado se describen las principales especies de organismos fotosintéticos que se encuentran en la redoxclina y el hipolimnion anóxico de la Laguna de Arcas. En esta comunidad, los organismos dominantes son una bacteria fotosintética del azufre, *Chromatium weissii*, y una cianobacteria, *Oscillatoria cf. ornata*, apareciendo con mucha menor abundancia otras especies de bacterias fotosintéticas purpúreas de los géneros *Amoebobacter* y *Thiocapsa*, y bacterias verdes de la especie *Pelodictyon clathratiforme*. También muy abundantes en la zona microaerobia aparecen criptofitas del género *Cryptomonas*. De todos estos organismos, únicamente *Cryptomonas* aparece en la laguna durante todo el año, si bien su mayor densidad poblacional se alcanzaba durante la época de estratificación estival, única en la cual aparecían el resto de los microorganismos citados. En la figura 4-2 se puede observar el color del agua

de las muestras de la Laguna de Arcas durante el periodo de estratificación, mientras que en la figura 4-3 se observa el color del filtrado de muestras de agua correspondientes a distintas profundidades. En las figuras 4-4 y 4-5 se muestra la observación microscópica de agua de la redoxclina de la Laguna de Arcas.



Figura 4.2.- Muestras extraídas de la quimioclina de la Laguna de Arcas el 24 de septiembre de 1990.

Figure 4.2.- Water samples from Lake Arcas chemocline, September 24, 1990.

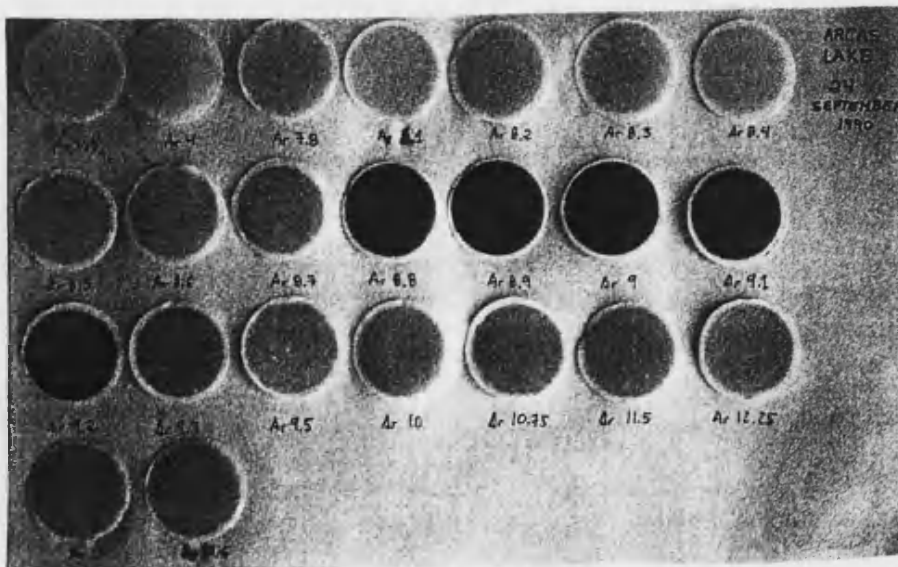


Figura 4.3.- Filtrado de muestras extraídas de la quimioclina de la Laguna de Arcas correspondientes al 24 de septiembre de 1990.

Figure 4.3.- Filters resulting on filtering of water samples from Lake Arcas chemocline, from September, 24, 1990.

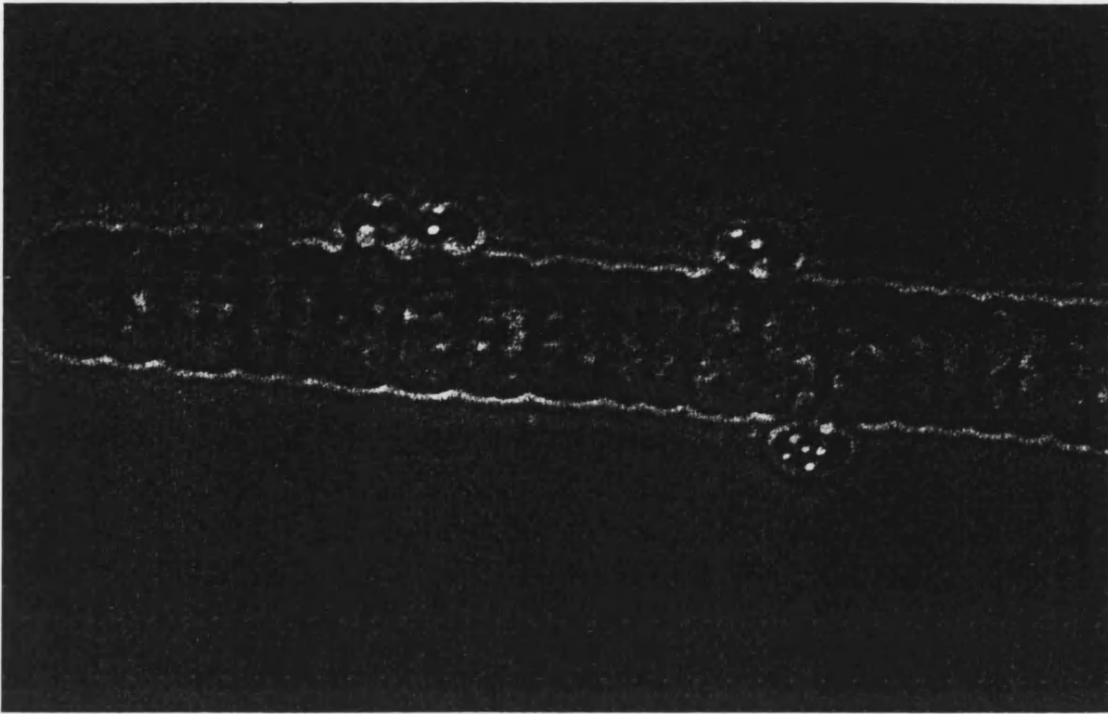


Figura 4 4.- Microfotografía de contraste de fases de una muestra extraída de la quimioclina de la Laguna de Arcas correspondiente al 12 de septiembre de 1991 (x2000).

Figure 4 4.- Phase contrast micrograph of a sample from Lake Arcas chemocline from September 12, 1991 (2000x).

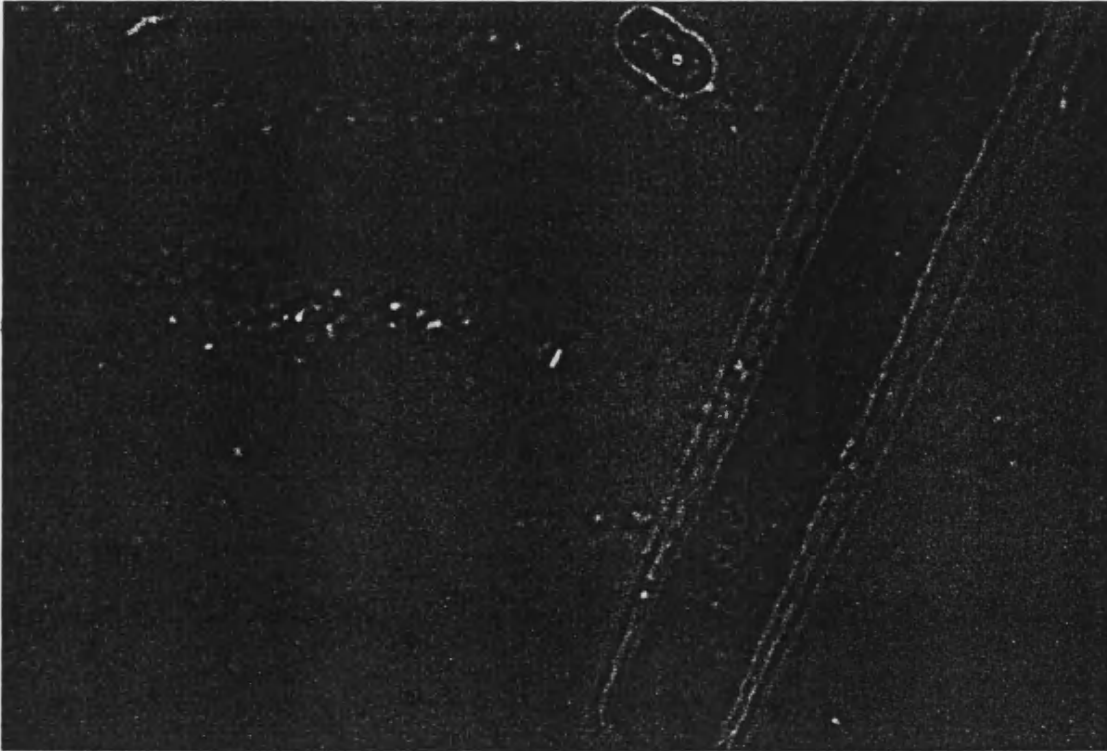


Figura 4 5.- Microfotografía de contraste de fases de una muestra extraída de la quimioclina de la Laguna de Arcas correspondiente al 12 de septiembre de 1991 (x1250).

Figure 4 5.- Phase contrast micrograph of a sample from Lake Arcas chemocline, from September 12, 1991 (1250x).

De forma adicional, se describen dos cepas de cianobacterias filamentosas, *Oscillatoria* cf. *tenuis* y *Pseudanabaena* sp., cuya aparición en las muestras de agua de la laguna era muy esporádica, sin alcanzar nunca densidades poblacionales que las hagan dignas de mayor mención. Así mismo, a partir de muestras de sedimento y aguas profundas de la laguna se pudieron obtener cultivos de otras dos especies de bacterias fotosintéticas, *Chlorobium phaeobacteroides* y *Chlorobium limicola*, la presencia de las cuales en el agua de la laguna sólo era detectada ocasionalmente en bajísimas densidades poblacionales, lo cual fue confirmado tanto de la observación microscópica como en la determinación de los pigmentos fotosintéticos.

Chromatium weissei

Dentro de las especies de bacterias fotosintéticas del azufre, que utilizan el sulfhídrico como dador de electrones, esta especie presentaba, con mucho, las poblaciones más densas que se encontraban en la laguna. Sus células son de forma bacilar (figura 4-6), de 7 a 9 μm de largo y entre 3 y 4 μm de ancho, se reproduce por división binaria y tiene movilidad al presentar un flagelo polar.

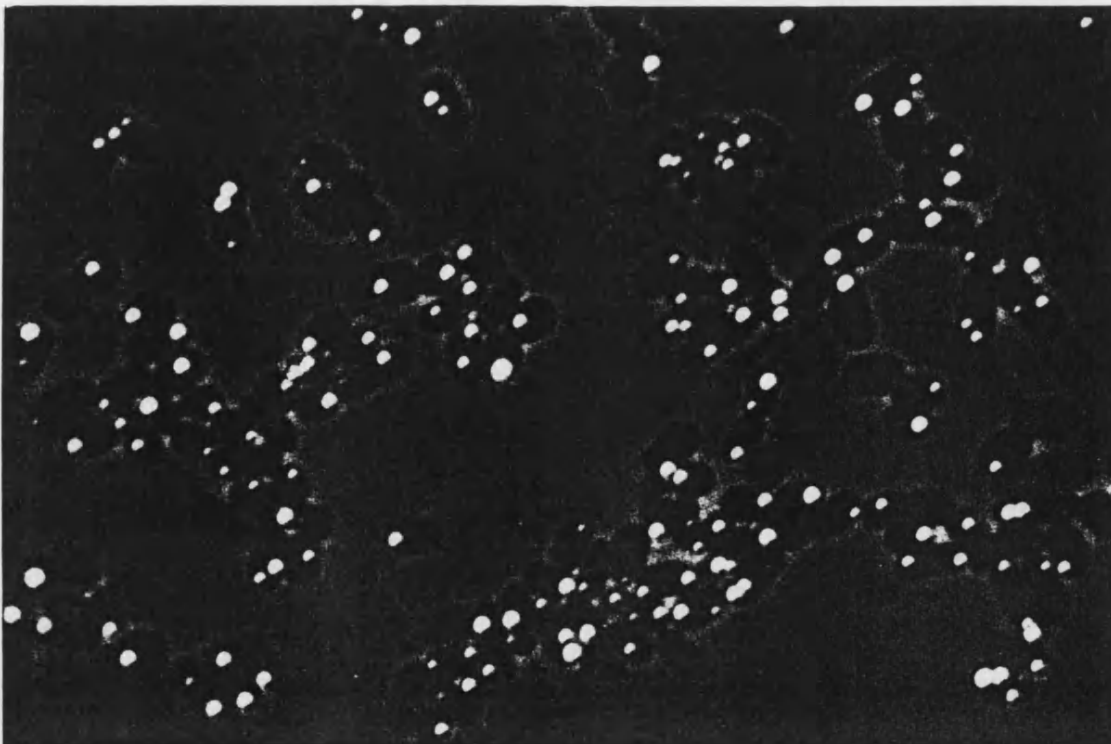


Figura 4.6.- Microfotografía de contraste de fases de una muestra extraída de la quimioclina de la Laguna de Arcas el 12 de septiembre de 1991, mostrando las células de *Chromatium weissei* (x1250).

Figure 4.6.- Phase contrast micrograph of a sample from Lake Arcas chemocline from September 12, 1991, showing *Chromatium weissei* cells (1250x).

Esta bacteria presenta un sistema fotosintético vesicular de membranas, bacterioclorofila *a* y el caroteno okenona como pigmentos fotosintéticos, acumulando azufre intracelular como producto intermedio de la oxidación fotosintética del sulfhídrico a S⁰ y finalmente a SO₄²⁻.

Thiocapsa sp.

Se trata de un microorganismo esférico, de unos 2 µm de diámetro, inmóvil al carecer tanto de flagelos como de vacuolas de gas, que puede formar agrupaciones celulares, siendo las más frecuentes las tétradas. Posee un sistema vesicular de membranas y presenta bacterioclorofila *a* y okenona. La mayoría de las características estudiadas en este microorganismo lo asimilarían a la especie *Thiocapsa roseopersicina*, sin embargo ésta presenta espiriloxantina como carotenoide principal, mientras que en la encontrada en la Laguna de Arcas la okenona es el principal caroteno. Caumette *et al* (1985) describieron una cepa de *Thiocapsa* aislada de una laguna costera del Languedoc francés (Etang de Prévost), que presentando las mismas características que la aquí descrita, posee okenona como carotenoide principal, en una proporción que oscila entre el 50 y el 80 %, si bien de forma adicional presenta espiriloxantina y ceto-carotenoides, lo que no ha sido detectado en nuestro caso. Además, ésta cepa descrita por Caumette y colaboradores procede de una laguna costera cuyas aguas presentan una composición salina similar a la marina, siendo mucho más mineralizadas que las de la Laguna de Arcas.

Amoebobacter sp

Al igual que los dos anteriores, este microorganismo pertenece a la familia Chromatiaceae. La forma de sus células es esférica o ligeramente ovoide, de 2,5-3 µm de diámetro, y habitualmente presenta vacuolas gaseosas que le permiten situarse en las profundidades de la laguna en las que las condiciones le puedan resultar mejores para su desarrollo (figura 4-7).

De manera habitual, esta bacteria suele presentarse formando grupos, al segregar una envoltura mucilaginosa que permite su agregación. Al igual que las dos especies anteriormente citadas, presenta bacterioclorofila *a* y okenona como pigmentos fotosintéticos. Esta bacteria resulta semejante a la descrita por Eichler y Pfennig (1988) como una especie nueva, denominada *Amoebobacter purpureus*, aunque su asignación definitiva a esa especie precisaría un mayor estudio.

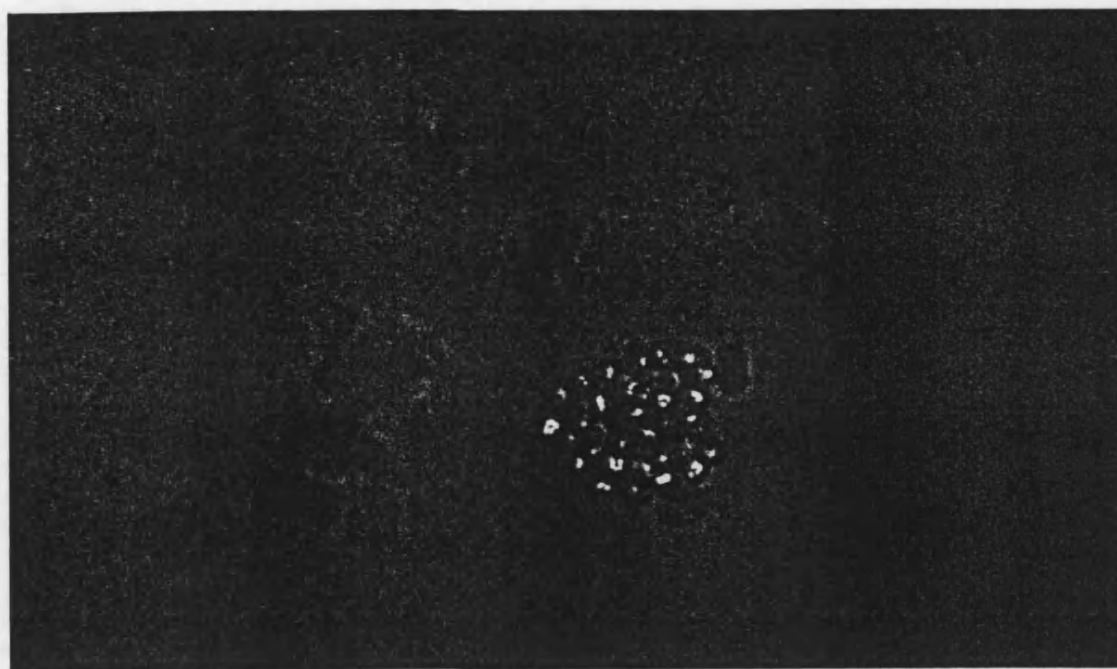


Figura 4.7.- Microfotografía de contraste de fases de una muestra extraída de la quimioclina de la Laguna de Arcas el 12 de septiembre de 1991, filtrada y teñida con eritrosina, mostrando un acúmulo de células de *Amoebobacter* sp. (x1250).

Figure 4.7.- Phase contrast micrograph of a sample from Lake Arcas chemocline from September 12, 1991, filtered and stained with erythrosine, showing *Amoebobacter* sp cells (1250x).

Pelodictyon clathratiforme

A pesar de que se han conseguido aislar otras especies de clorobiaceas a partir de muestras de agua o sedimentos de la laguna, esta especie es la única presente a densidades poblacionales suficientes para que su presencia pueda ser fácilmente detectable en la columna de agua. Su morfología es bacilar, de 0,7-1,2 μm de ancho y 1,5-2,5 μm de largo. Habitualmente tiene división binaria, pero ocasionalmente presenta división ternaria, lo que unido al hecho de que las células no se separan inmediatamente de su división, sino que pueden permanecer unidas por el septo, hace que pueda desarrollar redes tridimensionales (clathros), de ahí su nombre específico, si bien este tipo de estructuras no eran muy comunes en las muestras tomadas de la laguna. Al igual que otros de los microorganismos descritos en este apartado presenta vacuolas de gas, lo que le permite determinar su posición en la columna de agua. Se trata, dentro del grupo de las clorobiaceas, de una bacteria verde, siendo la bacterioclorofila *d* el pigmento clorofílico y el clorobacteno el carotenoide principal.

Oscillatoria ornata

Junto con *C. weissii*, constituyen las poblaciones de procariotas fotosintéticos dominantes en la redoxclina e hipolimnion anóxico de la laguna. Se trata de una cianobacteria filamentosa, cuyas células tienen unos 8 μm de ancho y 4 μm de

largo. Forman filamentos de longitud muy variable, con medias que mayoritariamente están entre 200 y 350 μm , aunque frecuentemente, sobre todo en las zonas aerobias (donde están presentes en densidades poblacionales muy bajas), pueden presentar longitudes medias inferiores. Estas longitudes medias de los filamentos dan una idea de cual es la longitud media de un filamento antes de dividirse por la formación de propágulos intrafilamentosos, si bien obviamente la longitud de los filamentos que se están desarrollando a partir de esos propágulos es sensiblemente inferior. Así mismo, es frecuente encontrar filamentos considerablemente más largos que esa media, siendo la longitud máxima absoluta encontrada de 1131 μm , que apareció en la muestra de 8,6 metros de profundidad correspondiente al 24/9/90. Como característica común al resto de cianobacterias presenta clorofila *a* y ficocianina, además, como se detalla en un capítulo 5, posee la capacidad de sintetizar ficoeritrina, lo que potencia su capacidad para adaptarse cromáticamente a distintas calidades e intensidades de luz. También presenta la capacidad de formar vesículas de gas (figura 4-8), lo que le permite, al igual que en otros microorganismos vacuolados, regular su posición en la columna de agua.



Figura 4.8.- Imagen al microscopio electrónico de transmisión de una sección ultrafina de *Oscillatoria ornata* muy vacuolada, correspondiente a una muestra de 10 metros de la Laguna de Arcas del 12 de septiembre de 1991 (x 20000)

Figure 4.8.- TEM image of a highly vacuolated *Oscillatoria ornata* filament from 10 meters depth of Lake Arcas, sample was taken on September 12, 1991 (20000 x)

Oscillatoria cf. tenuis

Se trata de una cianobacteria filamentosa que se presenta esporádicamente y en muy bajas densidades poblacionales (normalmente menos de 10 filamentos /100 ml) en las aguas bien oxigenadas de la laguna. Sus células son de unos 6 μm de ancho y alrededor de 4 μm de largo, formando filamentos que rara vez sobrepasan los 150 μm de longitud. La clorofila *a* y la ficocianina son sus principales pigmentos.

Pseudanabaena sp.

Al igual que la anterior, esta cianobacteria filamentosa (figura 4-9) también está presente de forma esporádica y con densidades poblacionales igualmente bajas en las aguas de la Laguna de Arcas, pero no se limita únicamente a las aguas bien oxigenadas sino que también pueden aparecer en el hipolimnion anóxico filamentos viables de esta especie.

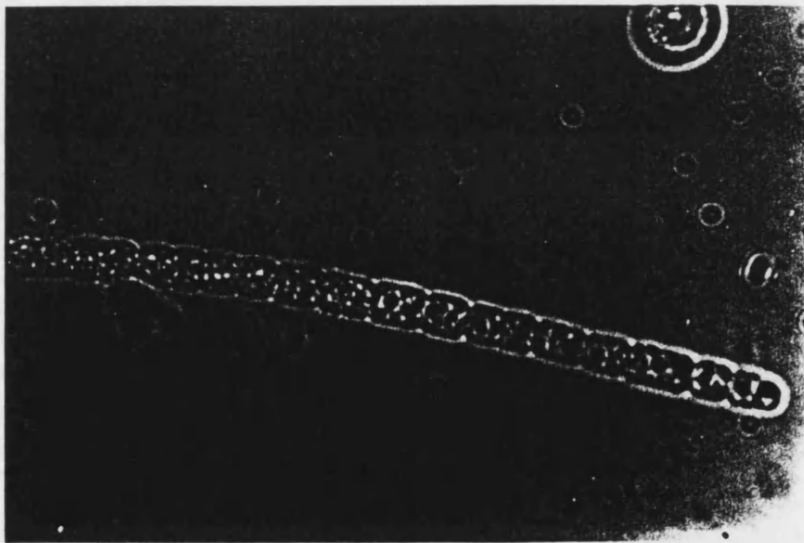


Figura 4.9.- Microfotografía de *Pseudanabaena sp* en una muestra epilimnética de la Laguna de Arcas, correspondiente al 12 de septiembre de 1991, observada en un microscopio invertido.

Figure 4.9.- Inverted microscope micrograph of an epilimnetic sample from Lake Arcas obtained on September 12, 1991, showing *Pseudanabaena sp.*,

Cryptomonas spp.

Dos son las especies de *Cryptomonas* que alcanzan densidades poblacionales importantes en la laguna, identificadas de acuerdo con Anton y Duthie (1981). *Cryptomonas phaseolus* y *Cryptomonas erosa* se encuentran presentes en la laguna a lo largo de todo el año, si bien sus máximas densidades poblacionales se alcanzan en la zona de la oxiclina durante los meses de estratificación. C.

phaseolus es una especie de pequeño tamaño (12-14 μm de largo y alrededor de 8 μm de ancho), con forma elipsoidal aplanada en la zona ventral, que presenta dos flagelos de distinta longitud pero ambos más cortos que la célula. *C. erosa* es más grande (18 x 12 μm) de forma ovoide con la parte superior truncada, presentando también dos cloroplastos que ocupan gran parte de la célula, así como dos flagelos. En la figura 4-10 se muestra una célula de *Cryptomonas* observada al microscopio electrónico de transmisión.

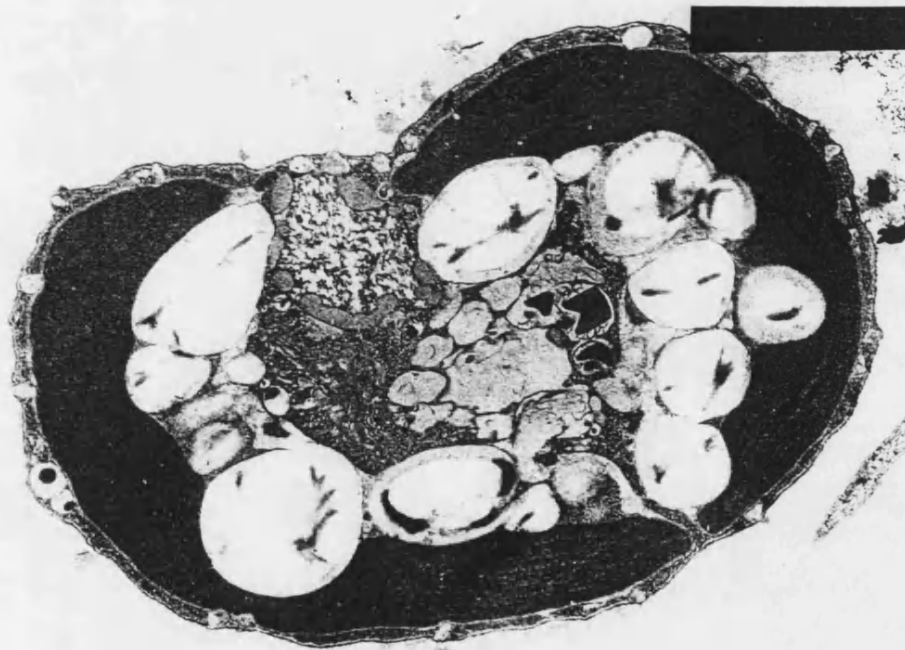


Figura 4.10.- Imagen al microscopio electrónico de transmisión de una célula de *Cryptomonas* sp. de la quimioclina de la Laguna de Arcas tomada el 12 de septiembre de 1991 (x 10000)
Figure 4.10.- TEM image of a *Cryptomonas* sp cell from Lake Arcas chemocline, from September 12, 1991 (10000 x)

4.3.2.- DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS DE LAS CAPAS MICROAEROBIAS Y ANÓXICAS

4.3.2.1.- Evolución de las poblaciones de los organismos fotosintéticos en las aguas microaerobias y anóxicas de la Laguna de Arcas.

La interfase óxico-anóxica, en cuyos alrededores se establece una quimioclina con acusados gradientes físico-químicos, es la zona de la laguna en la que durante el periodo estival se alcanzan elevadas densidades poblacionales de microorganismos fotosintéticos (tabla 4-6). Estas poblaciones se estratifican verticalmente de manera abrupta en la quimioclina, de manera que sus densidades

poblacionales varían mucho en rangos de profundidad que se miden en centímetros.

Tabla 4.6.- Profundidades en las que se alcanza la máxima densidad poblacional de los tres principales microorganismos fotosintéticos en la Laguna de Arcas en distintas fechas de muestreo.

Table 4.6.- Depths of maximal population densities of the three main phototrophic microorganisms in Lake Arcas

Fecha	Profundidad extinción O ₂ (m)	Máximo absoluto		
		<i>Chromatium weissei</i> (m) - (cel ml ⁻¹)	<i>Oscillatoria ornata</i> (m) - (fil ml ⁻¹)	<i>Cryptomonas</i> spp. (m) - (cel ml ⁻¹)
13/10/89	11,1	11,2 4,36E+05	11,5 973	10,9 1912
23/02/90	12,8	14 4,17E+04	14 55	14 476
23/03/90	13,2	14 2,69E+04	14 30	13 280
28/04/90	12	13,5 1,48E+05	13,5 174	11,9 330
17/05/90	9,3	9,6 6,02E+04	14 139	9,4 492
8/06/90	8,7	8,9 1,93E+05	11,5 194	8,7 2080
4/07/90	8,7	8,9 6,73E+05	9,1 223	8,9 6993
30/07/90	8,6	8,8 5,42E+05	8,9 402	8,9 7841
25/8/90	8,4	8,7 1,35E+06	8,4 679	8,6 15905
7/09/90	8,5	8,7 1,42E+06	8,7 704	8,7 22666
18/09/90	8,9	9 1,84E+06	9 790	8,9 10158
24/09/90	8,8	8,9 1,70E+06	8,9 605	8,8 14274
12/10/90	10	10,5 1,43E+05	13 1436	9,6 1093
1/05/91	9,5	9,7 2,47E+05	13 104	9,4 6665
24/05/91	9,7	9,9 4,58E+05	11,1 198	9,6 16937
27/06/91	9	9,1 6,44E+05	9,4 232	9 30217
6/08/91	8,8	8,9 1,16E+06	8,8 492	8,7 38679
3/09/91	8,7	8,9 7,41E+05	8,7 504	8,7 19552
12/09/91	8,7	8,9 1,05E+06	8,8 537	8,8 38122
1/10/91	9,2	9,3 8,79E+05	9,4 717	9,2 22480
11/10/91	10,5	10,7 3,26E+05	11,3 978	10,6 4258

En la parte superior de la quimioclina, en aguas microaerobias o anóxicas con baja concentración de oxígeno, *Cryptomonas* spp alcanzan sus máximas densidades poblacionales (hasta 38000 ind ml⁻¹). Ligeramente por debajo suelen encontrarse los máximos de *Oscillatoria ornata* (que llegan casi hasta 1000 filamentos ml⁻¹), una cianobacteria filamentosa que presenta especiales adaptaciones al sulfhídrico. Este máximo coincide aproximadamente con el de *Chromatium weissei*, bacteria fotosintética del azufre que alcanza densidades poblacionales próximas a los 2 millones de células por mililitro en el momento de mayor desarrollo de la población. Tanto *Oscillatoria ornata* como *Chromatium weissei* siguen alcanzando números elevados en el resto del hipolimnion, debido probablemente en parte a la sedimentación de las poblaciones de la quimioclina, aunque también podría contribuir la división *in situ*, ya que hemos observado que las células de *Chromatium weissei*, aunque mucho más lentamente, siguen dividiéndose en el hipolimnion. En este sentido son importantes los resultados obtenidos por Pedrós-Alió y colaboradores (1989), que observaron que las bacterias planctónicas de vida libre pasan por periodos en los que sedimentan en las condiciones dadas por la ley de Stokes para una partícula inerte, mientras que existen otros periodos en los que, a pesar de tener mayor densidad que el agua que las soporta, esa sedimentación es prácticamente nula

Además de estos tres microorganismos, otras bacterias fotosintéticas como *Amoebobacter* sp., *Thiocapsa* sp. y *Pelodictyon clathratiforme* están presentes en las aguas hipolimnéticas ricas en sulfhídrico, pero sus densidades poblacionales, comparadas en términos de biovolumen, son bastante menores. Se ve claramente que existe una dominancia de las Cromatiaceas sobre las Clorobiaceas, lo que por ejemplo, en el Lago Cisó se vio que se daba cuando las concentraciones de sulfhídrico estaban por debajo de 1,5 mM (Gasol *et al.*, 1990), condiciones que generalmente se dan en la Laguna de Arcas. Las Clorobiaceas presentan por regla general una mejor adaptación a las condiciones de baja intensidad luminosa (Overmann *et al.*, 1992), una mayor eficiencia fotosintética y menores requerimientos para su mantenimiento (Montesinos y Van Gernerden, 1986). En la Laguna de Arcas la práctica extinción de la luz por debajo de la quimioclina hacia que, si bien las mayores concentraciones de sulfhídrico en las capas profundas pudieran favorecer a las Clorobiaceas, su presencia se vería limitada por la ausencia de luz. No obstante, la capacidad de asimilación de acetato, descrita en algunas Clorobiaceas (Bergstein *et al.*, 1979; Hofman *et al.*, 1985, Veldhuis y Van Gernerden, 1986) podría ser un factor importante para el mantenimiento de estas poblaciones en oscuridad en la Laguna de Arcas. Por otro lado, la presencia de *Pelodictyon clathratiforme*, una clorobiacea verde, por debajo de el "plate" de Cromatiaceas en la Laguna de Arcas, está de acuerdo con los trabajos de Montesinos y colaboradores (1983), según los cuales las clorobiaceas verdes aparecerían en aguas superficiales o por debajo de las poblaciones de Cromatiaceas, en una estrategia basada en la captación de luz

mediante la bacterioclorofila (Vila y Abellà, 1996) mientras que las marrones dominarían en las aguas profundas de los lagos meromíticos.

Otras cianobacterias filamentosas, de las que se aislaron *Oscillatoria tenuis* y *Pseudanabaena* sp., aparecen ocasionalmente en las aguas de la laguna, en muy bajas densidades poblacionales.

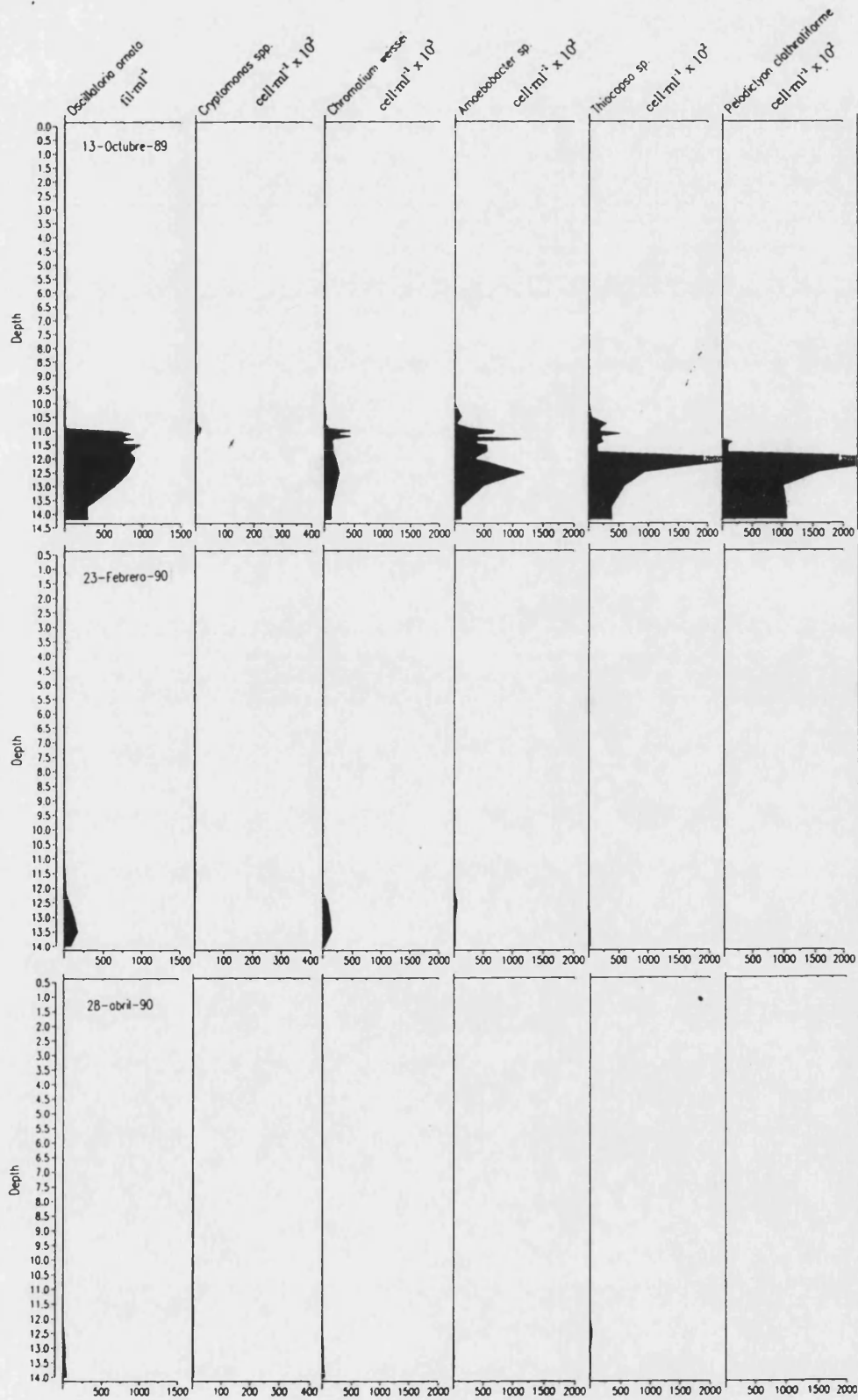
El desarrollo de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos en la quimioclina se produce durante el periodo de estratificación estival (tabla 4-7, figura 4-11), e incluso esporádicamente durante cortos periodos de estratificación a final de invierno o principio de la primavera aparecen incipientes poblaciones en las capas anóxicas.

Tabla 4.7.- Densidad poblacional integrada en una columna de agua de 1 m² (desde la superficie al fondo) de los tres principales microorganismos fotosintéticos en la Laguna de Arcas.

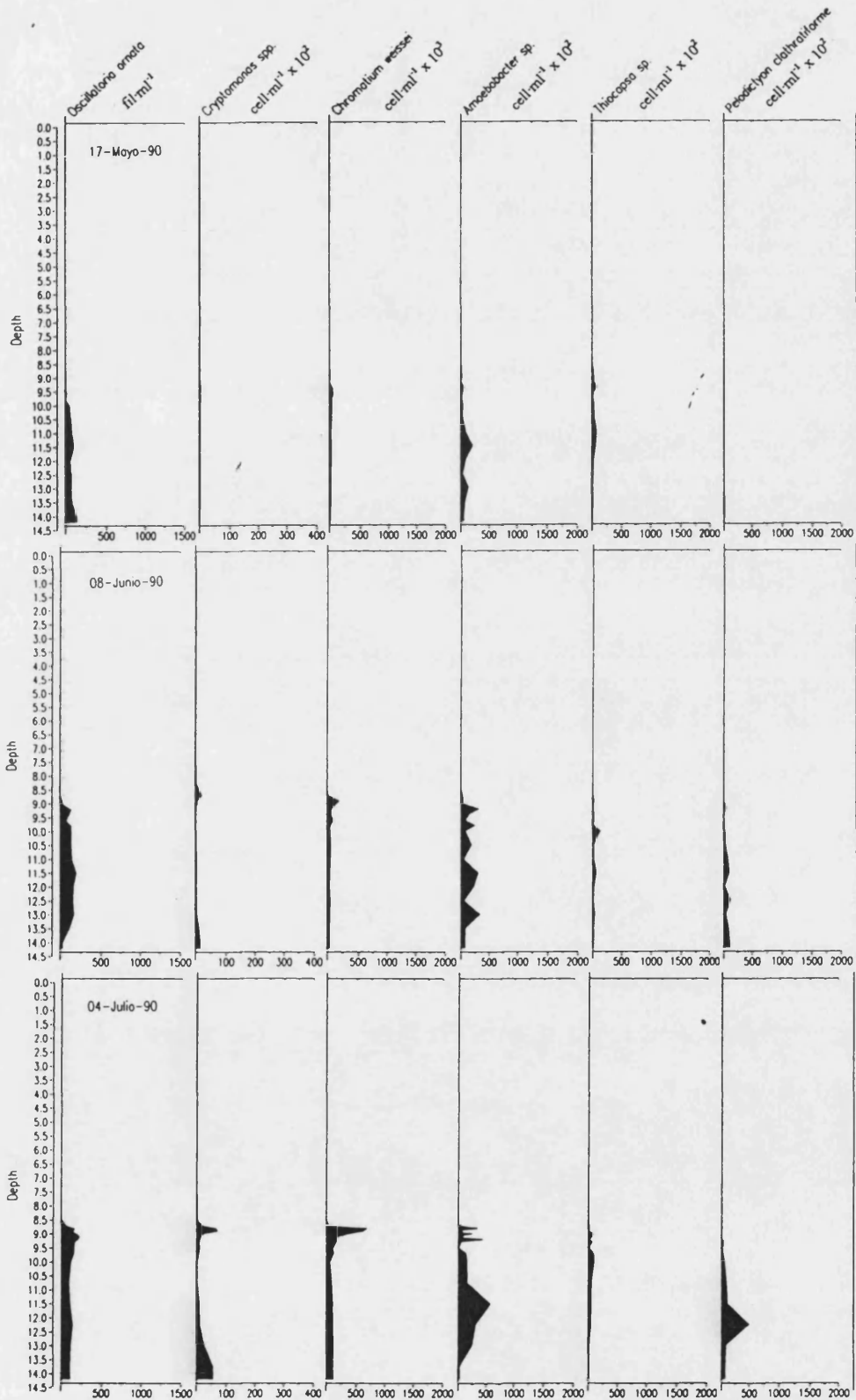
Table 4.7.- Integrated population densities per square meter (from surface to the lake bottom) of the three main phototrophic microorganisms in Lake Arcas

Fecha	Profundidad extinción O ₂ (m)	n° integrado de		
		<i>Chromatium weissei</i> (cel m ⁻²)	<i>Oscillatoria ornata</i> (fil m ⁻²)	<i>Cryptomonas</i> spp. (cel m ⁻²)
13/10/89	11,1	6,49 x 10 ¹¹	2,32 x 10 ⁹	1,27 x 10 ⁹
04/11/89	--	0	1,04 x 10 ⁷	8,60 x 10 ⁸
24/11/89	--	0	3,30 x 10 ⁶	1,09 x 10 ⁹
20/12/89	--	0	7,00 x 10 ⁶	7,34 x 10 ⁸
17/01/90	--	0	2,02 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁹
14/02/90	--	0	3,98 x 10 ⁶	1,38 x 10 ⁹
23/02/90	12,8	4,12 x 10 ¹⁰	6,80 x 10 ⁷	2,06 x 10 ⁹
10/03/90	--	0	1,50 x 10 ⁷	1,61 x 10 ⁹
23/03/90	13,2	1,63 x 10 ¹⁰	4,91 x 10 ⁷	1,45 x 10 ⁹
10/04/90	--	0	1,20 x 10 ⁷	1,64 x 10 ⁹
28/04/90	12	1,85 x 10 ¹¹	2,44 x 10 ⁸	1,74 x 10 ⁹
17/05/90	9,3	1,40 x 10 ¹¹	3,58 x 10 ⁸	2,08 x 10 ⁹
08/06/90	8,7	2,96 x 10 ¹¹	7,09 x 10 ⁸	4,07 x 10 ⁹
04/07/90	8,7	7,73 x 10 ¹¹	7,28 x 10 ⁸	1,25 x 10 ⁹
30/07/90	8,6	1,02 x 10 ¹²	6,84 x 10 ⁸	9,40 x 10 ⁹
25/08/90	8,4	1,46 x 10 ¹²	1,22 x 10 ⁹	9,17 x 10 ⁹
07/09/90	8,5	1,35 x 10 ¹²	1,03 x 10 ⁹	6,25 x 10 ⁹
24/09/90	8,8	1,09 x 10 ¹²	9,26 x 10 ⁸	1,39 x 10 ¹⁰
12/10/90	10	2,81 x 10 ¹¹	4,25 x 10 ⁹	3,41 x 10 ⁹
09/02/91	--	0	2,00 x 10 ⁶	1,07 x 10 ⁹
01/05/91	9,5	4,27 x 10 ¹¹	3,37 x 10 ⁸	1,37 x 10 ⁹
24/05/91	9,7	4,99 x 10 ¹¹	6,40 x 10 ⁸	1,93 x 10 ⁹
27/06/91	9	6,69 x 10 ¹¹	5,66 x 10 ⁸	1,60 x 10 ¹⁰
06/08/91	8,8	1,30 x 10 ¹²	8,14 x 10 ⁸	2,79 x 10 ¹⁰
12/09/91	8,7	8,79 x 10 ¹¹	9,34 x 10 ⁸	2,39 x 10 ¹⁰
11/10/91	10,5	4,22 x 10 ¹¹	2,74 x 10 ⁹	9,52 x 10 ⁹

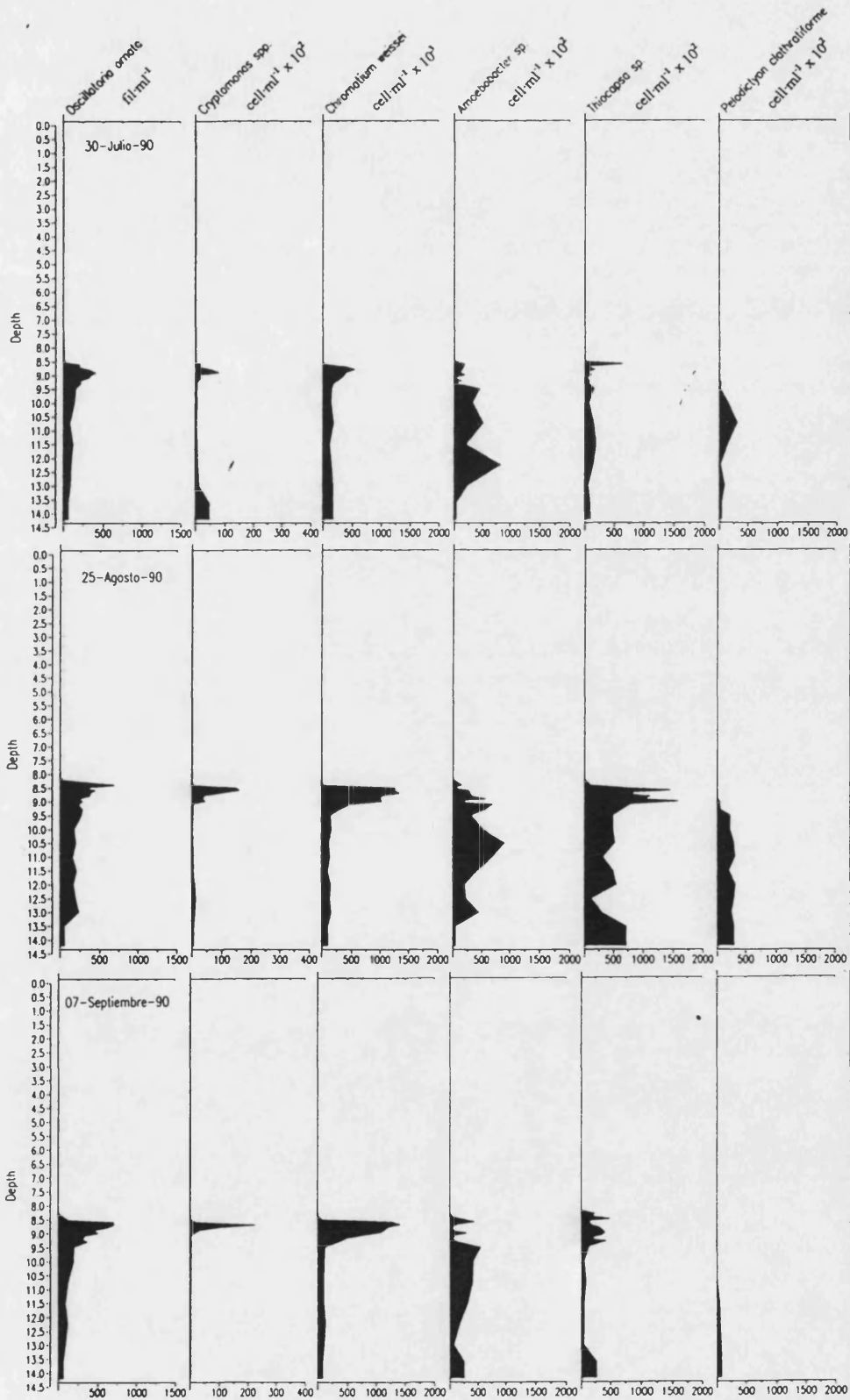
CAPÍTULO 4.- DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

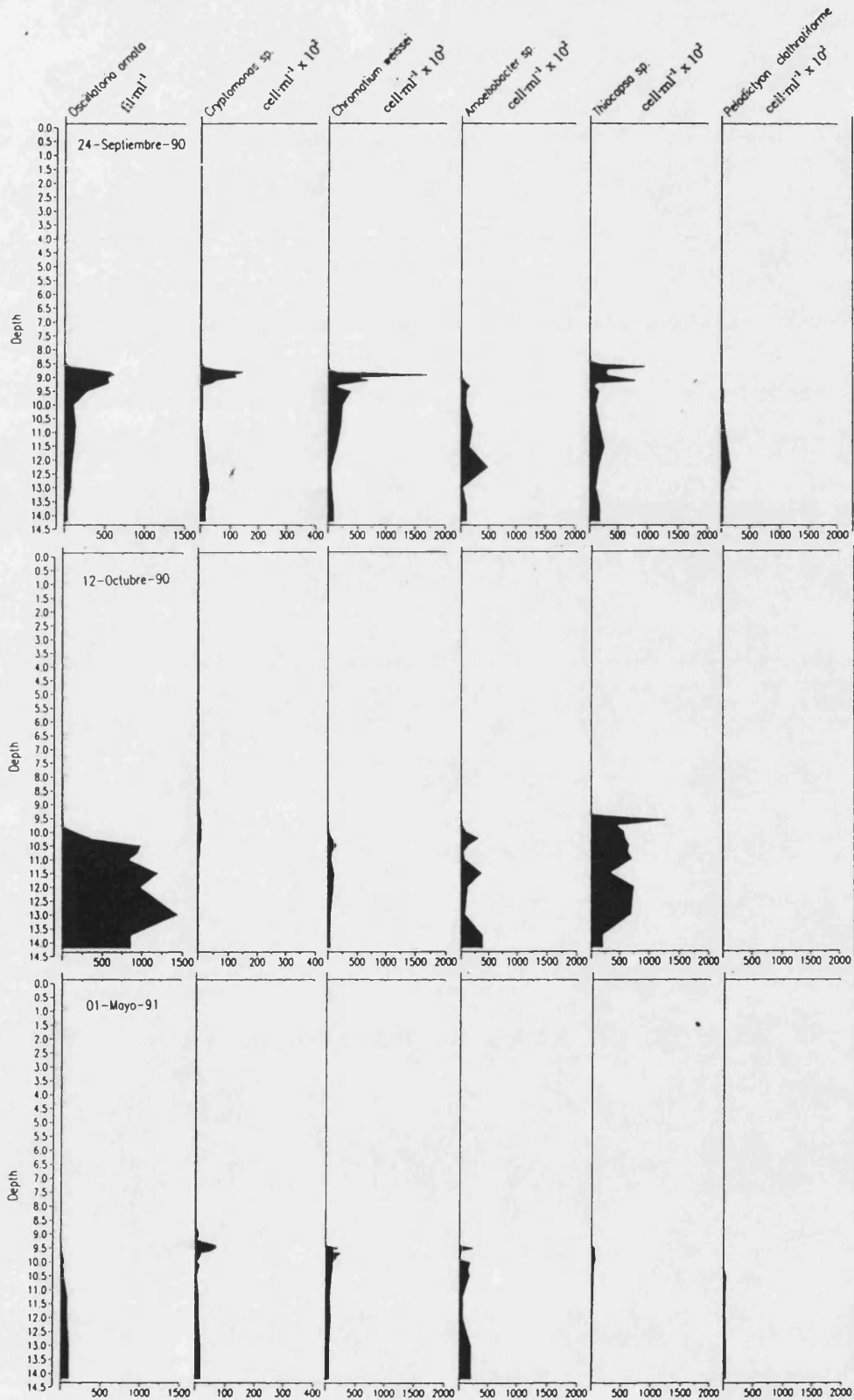


CAPÍTULO 4.- DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

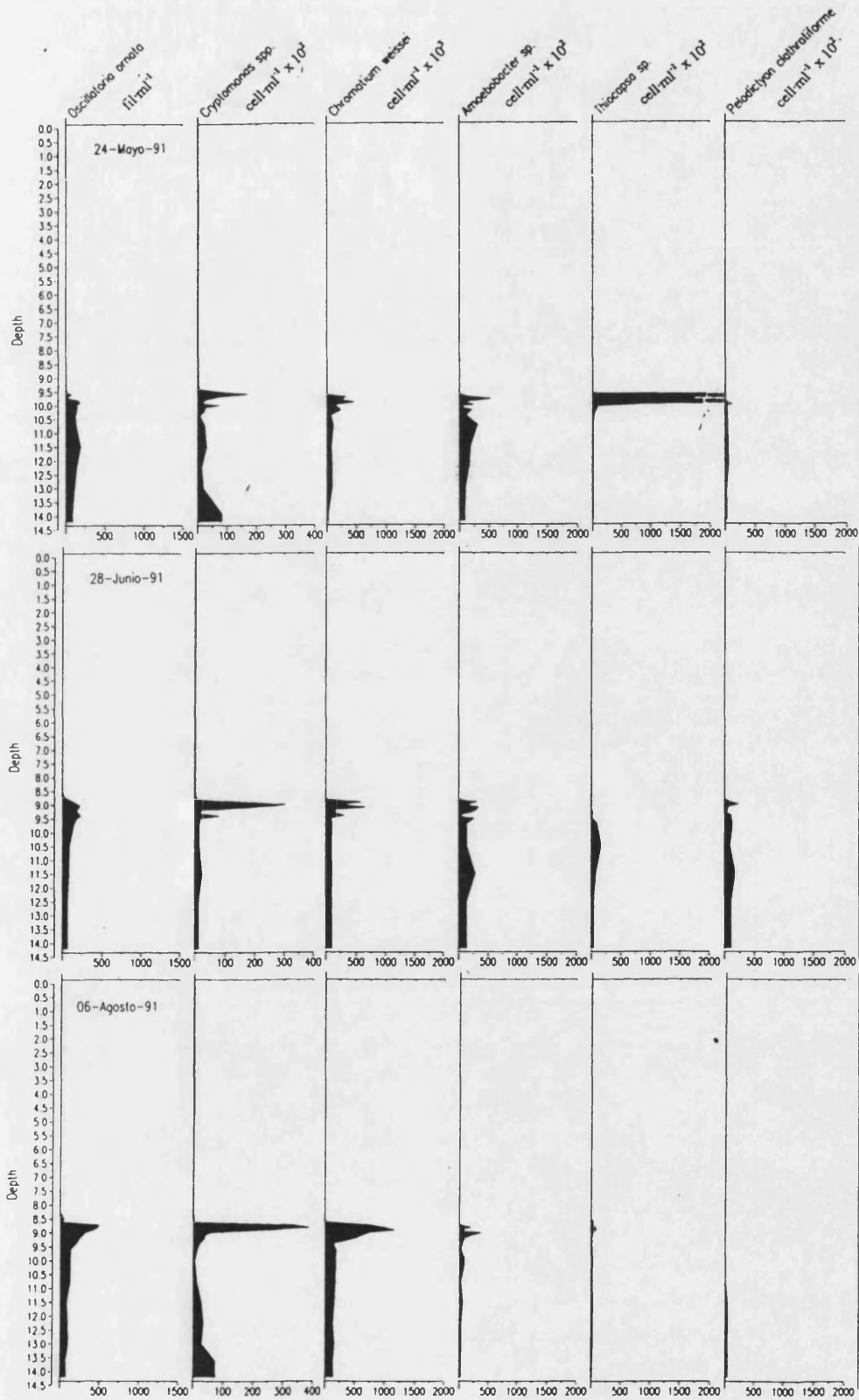


CAPÍTULO 4.- DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS





CAPÍTULO 4.- DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS



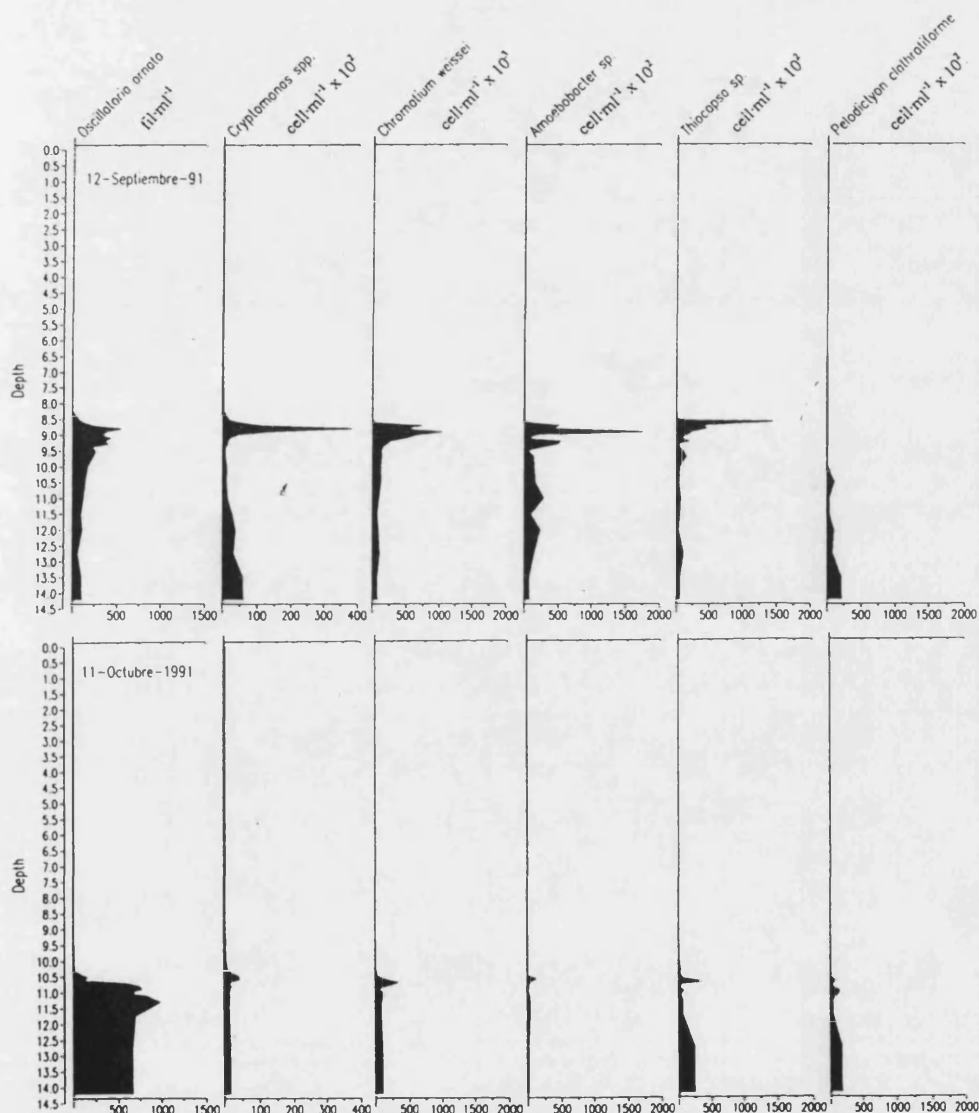


Figura 4.11.- Evolución de las poblaciones de los principales microorganismos fotosintéticos presentes en las aguas microaeróbicas y anóxicas de la Laguna de Arcas. Los valores de la escala representan: a) *Oscillatoria ornata* - filamentos por mililitro, b) *Cryptomonas* spp - cel ml⁻¹, debe multiplicarse por 10², c) *Chromatium weissei* - cel ml⁻¹, debe multiplicarse por 10³, d) resto de microorganismos - cel ml⁻¹, debe multiplicarse por 10².

Figure 4.11.- Population dynamics of the main phototrophic microorganisms inhabiting microaerophilic and anoxic waters in Lake Arcas. Scale values represent a) *Oscillatoria ornata* - filaments per milliliter, b) *Cryptomonas* spp - cell ml⁻¹, must be multiplied by 10², c) *Chromatium weissei* - cell ml⁻¹, must be multiplied by 10³, d) rest of microorganisms - cell ml⁻¹, must be multiplied by 10².

Las poblaciones de estos microorganismos prácticamente desaparecen con la mezcla vertical (a excepción de *Cryptomonas* spp.). Esta desaparición es extremadamente rápida, y, aunque su mecanismo no ha podido ser dilucidado, podría estar relacionado con una coprecipitación con hierro y manganeso oxidado, como ha sido descrito para otras bacterias fotosintéticas (Eichler y Pfennig, 1990) y cianobacterias (Oliver *et al.*, 1985). Sin embargo, dado que las concentraciones de estos elementos son bastante bajas en la Laguna de Arcas, nos inclinamos por un mecanismo simple de formación de agregados que sedimentan rápidamente hacia el fondo de la laguna (Van Gemerden y Mas, 1995) y que pueden permanecer en el sedimento anóxico como inóculos para la formación de nuevas poblaciones. En el primer caso, aunque no resulta el más plausible en nuestro caso, al restablecerse las condiciones anóxicas la resolubilización del hierro y el manganeso desharía los agregados y pondría de nuevo parte de las bacterias en circulación, a modo de inóculo para la formación de la nueva población (Eichler y Pfennig, 1990).

Por otro lado, el proceso de mezcla no solo hace recircular en el lago los nutrientes disueltos acumulados en las aguas hipolimnéticas, sino que podría hacer disponible para los organismos heterótrofos una gran cantidad de nutrientes acumulados en los organismos de la quimioclina: Esto sería similar al proceso descrito para *Amoebobacter purpureus* en el Lago Mahoney, donde si bien no por la mezcla sino por un aumento de la flotación, esta bacteria accedía al mixolimnion, liberando nutrientes que rápidamente eran incorporados por el bacterioplancton heterótrofo que aumentaba considerablemente su número (Overmann *et al.*, 1996a). Un efecto parecido de estimulación del bacterioplancton heterótrofo podría aumentar la demanda de oxígeno durante el periodo posterior al proceso de mezcla en la Laguna de Arcas, que sumada a la demanda de oxígeno originada por el consumo mediado por procesos químicos, explicaría la permanencia prolongada de la subsaturación de oxígeno en las aguas de la laguna posteriormente a la mezcla (ver capítulo 3). No obstante, lo que se ha visto en la Laguna de Arcas es que es el propio proceso de mezcla el que hace circular la población de bacterias fotosintéticas por toda la columna de agua, aunque este proceso es más rápido que el observado en el Lago Mahoney, por lo que sus consecuencias serían probablemente menos intensas.

Chromatium weissii es la bacteria fotosintética de azufre que, con gran diferencia, domina sobre las otras. Este microorganismo presenta una distribución típica de las poblaciones de bacterias fotosintéticas en lagos holomícticos, con un máximo marcado en la quimioclina pero estando presente en todo el hipolimnion, de manera similar al tipo II de las distribuciones descritas por Montesinos y Van Gemerden (1986). En la figura 4-11, en la que se detalla la distribución vertical y la evolución temporal de estas poblaciones, debe tenerse en cuenta que las escalas son diferentes, puesto que para *Chromatium weissii* la escala es de miles de células por mililitro frente a una escala de centenas de células por mililitro en el caso de las otras bacterias fotosintéticas del azufre y de

Cryptomonas spp. Además de ser mayor su densidad poblacional también es mucho mayor el tamaño celular, lo que hace que la contribución en términos de biovolumen del resto de bacterias fotosintéticas del azufre sea poco importante respecto al de *Chromatium weissei*. Al seguir la evolución de la población de este microorganismo a lo largo del periodo de estratificación vemos que aunque en los primeros estadios de este periodo la estratificación de la población no es muy marcada, si que se va desarrollando una densa población localizada justo por debajo de la interfase óxica-anóxica, de cuya sedimentación resulta que se encuentre a este microorganismo en todo el hipolimnion anóxico pero en números considerablemente más bajos que en la quimioclina. Si se considera la población de manera integrada (tabla 4-7) se observa que en las primeras etapas de la estratificación se da un crecimiento muy rápido pero partiendo de densidades poblacionales pequeñas, hasta alcanzar el mayor desarrollo de la población que tiene lugar durante el mes de agosto, iniciándose un lento declive durante el mes de septiembre que culmina con la desaparición de la población tras la mezcla otoñal.

La dominancia de las especies de Cromatiaceas de tamaño grande como *Chromatium weissei* sobre las de tamaño pequeño, como *Chromatium vinosum*, que tienen una mayor tasa de crecimiento y mayor afinidad por el sulfhídrico, fue explicada por Van Gemerden (1974). Su argumento se basaba en una mejor adaptación de la primera a las fluctuaciones en la concentración de sulfhídrico, frecuentes en las quimioclinas de los lagos (Jørgensen, 1982) En esta zona, al cesar la actividad fotosintética durante la noche, la concentración de sulfhídrico, proveniente del proceso continuo de sulfatorreducción, aumenta, mientras que por el día se reduce como consecuencia de la fotooxidación (Veldkamp *et al.*, 1984). La especie de mayor tamaño oxidaría primero el sulfhídrico a azufre intracelular, mientras que la de pequeño tamaño lo haría a sulfato, con lo que al disminuir la concentración de sulfhídrico durante el día, la especie de mayor tamaño utilizaría el azufre intracelular, mientras que durante la noche su metabolismo se basaría en la fermentación endógena del glucógeno acumulado. Las condiciones imperantes en la quimioclina de Arcas, con concentraciones de sulfhídrico relativamente bajas, luz débil y perteneciente al rango central del espectro y temperatura relativamente baja favorecen el desarrollo de las especies de *Chromatium* de mayor tamaño, al igual que son favorables para *Pelodictyon* en comparación con otras Clorobiaceas (Imhoff, 1992). Además, la mayor versatilidad del movimiento flagelar puede ser un mecanismo importante en la dominancia de *C. weissei* sobre las otras especies de Cromatiaceas.

En la tabla 4-8 se encuentra una versión modificada en base a la consulta de la bibliografía de la revisión realizada por Van Gemerden y Mas (1995) donde se recogen los trabajos en los que se ha descrito de una forma suficiente la presencia de poblaciones naturales de bacterias fotosintéticas.

Tabla 4.8.- Recopilación de referencias a poblaciones de bacterias fotosintéticas del azufre que habitan sistemas naturales (modificado de Van Gernerden y Mas, 1995)

Table 4.8.- Report of references to phototrophic sulfur bacteria inhabiting natural ecosystems (modified from Van Gernerden and Mas, 1995)

Sistema	Organismo	Prof. (m)	Bchl	BChl $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	cel·ml ⁻¹	Referencia
PLANCTÓNICO						
Ace	<i>Chlorobium spp</i>	10-23	c, d	-	-	Volkman <i>et al.</i> , 1988
Arcas-2	<i>Chromatium weissei</i>	9,25	a	605	1,2x 10 ⁶	Vicente <i>et al.</i> , 1991.
Banyoles III	<i>Chromatium minus</i>	13	a	4	-	García-Gil & Abellà 1992
	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	17	e	20	-	García-Gil & Abellà 1992.
Banyoles IV	<i>Chromatium minus</i>	13	a	16	-	García-Gil & Abellà 1992.
	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	15	e	60	-	García-Gil <i>et al.</i> , 1996.
Banyoles VI	<i>Chromatium minus</i>	13	a	6	-	García-Gil & Abellà 1992.
	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	15	e	16	-	García-Gil & Abellà 1992.
Belovod	<i>Chromatium okenii</i>	10-13	-	-	5,0x 10 ⁴	Sorokin 1970.
Biétri Bay	<i>Chromatium gracile</i>	3,5	a	65	-	Caumette <i>et al.</i> , 1983. Caumette 1984.
	<i>Chromatium violascens</i>					
	<i>Chromatium vinosum</i>					
	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	4	d	60	-	Caumette <i>et al.</i> , 1983. Caumette 1984.
	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	4	e	50	-	Caumette <i>et al.</i> , 1983.
	<i>Pelodictyon</i>					Caumette 1984.
Big Soda Lake	<i>Ectothiorhodospira vacuolata</i>	21-22	a	150-200	-	Cloern <i>et al.</i> , 1983a, 1983b.
Black Sea	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	74	e	1	-	Repeta <i>et al.</i> , 1989.
	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	160-200	-	-	2,3x 10 ⁵	Dickman & Artuz 1978.
Bol,shoi Kichier	<i>Ancalochloris perfilievii</i>	5,75	-	-	1,0x 10 ⁶	Gorlenko <i>et al.</i> , 1983.
	<i>Pelodictyon luteolum</i>	6	-	-	4,0x 10 ⁶	Gorlenko <i>et al.</i> , 1983.
Burton	<i>Chlorobium vibrioforme</i>				5,4 x 10 ⁶	Burke & Burton, 1988a
	<i>Chlorobium limicola</i>					Burke & Burton, 1988b
	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>				1,25 x 10 ⁵	
Buchensee	<i>Chloronema giganteum</i>	8	d	15	-	García-Gil & Abellà 1992b.
Chernoe-Kucheer	<i>Chlorobium</i>	4	-	-	5,0x 10 ⁶	Kuznetsov 1970.
Chernyi Kichier	<i>Pelodictyon luteolum</i>	4	-	-	7,5x 10 ⁶	Gorlenko <i>et al.</i> , 1983.
	<i>Ancalochloris perfilievii</i>	6	-	-	2,0x 10 ⁶	Gorlenko <i>et al.</i> , 1983.
Chiprana	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	-	d	-	-	Guerrero <i>et al.</i> , 1991
Cisó	<i>Chromatium</i>	2	a	450	7,6x 10 ⁵	Guerrero <i>et al.</i> , 1985a.
	<i>Amoebobacter</i>	2,5	-	-	7,5x 10 ⁵	Pedrés-Alió & Guerrero 1983. Guerrero <i>et al.</i> , 1985a.
	<i>Chlorobium</i>	2-3	c,d,e	50	7,9x 10 ⁵	Pedrés-Alió & Guerrero 1983. Guerrero <i>et al.</i> , 1985a.
Coromina	<i>Pelodictyon clathratiforme</i>		d	400	--	Pedrés-Alió & Guerrero 1983
Cullera	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	4	e	110	-	Borrego & García-Gil, 1994a Miracle & Vicente 1985.
Deadmoose	-	-	a	1355	-	Lawrence <i>et al.</i> , 1978.
	<i>Lamprocystis roseopersicina</i>	9-9,2	a	120-250	-	Parker & Hammer 1983. Parker <i>et al.</i> , 1983.
Estanyol Nou	<i>Chromatium minus</i>	4	a	280	7,3x 10 ⁵	Abellà <i>et al.</i> , 1985.
Faro	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	12-15	-	-	4,0x 10 ⁶	Sorokin & Donato 1975.
Fayetteville Green	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	18-20	-	-	1,2x 10 ⁶	Culver & Brunskill 1969.
Fidler	<i>Chlorobium limicola</i>	2,7-3	c	900	3,0x 10 ⁵	Baker <i>et al.</i> , 1985b.
	<i>Chlorobium</i>	3	d	4000	4,0x 10 ⁶	Croome & Tyler 1984a.
	<i>Chlorochromatium aggregatum</i>	2,4	d	2000	6,4 x 10 ⁵	Croome & Tyler 1984b.
Fish	<i>Thiopedia</i>	10	a	4-5	-	Parkin & Brock 1980a
	<i>Chlorobium</i>	13	a,d	32	-	Parkin & Brock 1980a
	<i>Pelodictyon</i>	11	d	13	-	Parkin & Brock 1980b
Gek Gel	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	30,5	-	-	3.5x 10 ⁶	Dubinina <i>et al.</i> , 1973.

CAPITULO 4. DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

Hamana	-	11	c	61	-	Takahashi & Ichimura 1968.
Haruna	-	13-14	a	24	-	Takahashi & Ichimura 1968.
Harutori	-	3,6	d,e	543	-	Takahashi & Ichimura 1968.
Holmsjön	<i>Chromatium sp.</i>	4	a	484	-	Lidholm <i>et al.</i> , 1985.
	-	4-4,5	d	4000	-	Lidholm <i>et al.</i> , 1985.
Kaiike	<i>Chromatium</i>	4,75-6	-	-	5,6x 10 ⁶	Matsuyama 1981.
						Matsuyama & Shirouzu 1978.
Kinneret	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	18	-	-	1,0x 10 ²	Bergstein <i>et al.</i> , 1979.
	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	18	-	-	1,0x 10 ⁶	Bergstein <i>et al.</i> , 1979.
Kisaratsu	-	6,2	a	186	-	Takahashi & Ichimura 1968.
	-	6,2	d,e	828	-	Takahashi & Ichimura 1968.
	-	7	-	-	-	Takahashi & Ichimura 1968.
Knaack	<i>Clathrochloris</i>	1,7-2,5	c,d,e	550-575	-	Parkin & Brock 1980b.
						Parkin & Brock 1981a.
	<i>Chlorobium</i>					
	<i>Pelodictyon</i>					
Konon,er	<i>Amoebobacter roseus</i>	10,75	-	-	4,0x 10 ⁶	Gorlenko & Kuznetsov 1972.
Kuznechikha	<i>Chlorochromatium aggregatum</i>	6	-	-	2,6x 10 ⁵	Gorlenko <i>et al.</i> , 1983.
	<i>Chloronema giganteum</i>					
Laguna de la Cruz	<i>Chromatium</i>	16	a	100	-	Vicente & Miracle 1988b.
	<i>Thiocapsa</i>					
	<i>Chlorobium</i>	16	d,e	300	-	Vicente & Miracle 1988b.
Lesnaya Lamba	<i>Pelodictyon clathratiforme</i>	4,3	-	-	2,0x 10 ⁵	Dubinina & Kuznetsov 1976.
	<i>Pelodictyon luteolum</i>					
	<i>Chlorochromatium aggregatum</i>					
	<i>Chloronema giganteum</i>					
Mahoney	<i>Amoebobacter purpureus</i>	6,68	a	20880	4,0x 10 ⁸	Overmann <i>et al.</i> , 1991b.
	-	7,5-8,3	a	7090	-	Hall & Northcote 1990.
Mary	<i>Pelodictyon</i>	3,5	d	110	-	Parkin & Brock 1980a.
	<i>Cathrochloris</i>					
	<i>Chlorobium</i>					
Mirror	<i>Chlorobium</i>	10-10,5	a,d	145	-	Parkin & Brock 1980a.
						Parkin & Brock 1980b.
	<i>Lamprocystis</i>	8,75	a	14	-	Parkin & Brock 1980b.
	<i>Chromatium</i>					
Myshin,er	<i>Amoebobacter roseus</i>	13,5	-	-	1,0x 10 ⁴	Gorlenko <i>et al.</i> , 1983.
	<i>Thiocapsa</i>					
	<i>Pelochromatium roseum</i>					
Mittlerer Buchensee	<i>Amoebobacter purpureus</i>	9	a	50	-	Overmann & Tilzer 1989.
	<i>Pelodictyon</i>	9	d,e	100	-	Overmann & Tilzer 1989.
	<i>phaeoclathratiforme</i>					
	<i>Pelochromatium</i>					
Mogilnoye	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	9,5-10,5	-	-	2,4x 10 ²	Van Gemen & Mas, 1995
	<i>Pelodictyon phaeum</i>					
	<i>Prosthecochl. phaeoasteroidea</i>	9,5-10,5	-	-	4,5x 10 ⁵	
Mutek	<i>Chlorobium limicola</i>	4	c	184	-	Czeczuga 1968a.
Palau Jellyfish	<i>Chromatium sp.</i>	14-15	-	-	2,2 x 10 ⁵	Venkateswaran <i>et al.</i> , 1993
Paul	<i>Prosthecochloris. Pelodictyon</i>	6,5	d	421	-	Parkin & Brock 1980a.
Peter	<i>Chlorobium</i>	10-14	a,d	11	-	Parkin & Brock 1980a.
Pluss-See	<i>Clathrochloris hypolimnica</i>				5,0x 10 ⁵	Anagnostidis & Overbeck 1966.
	<i>Thiopedia rosea</i>	5	-	-	5,0x 10 ⁴	Anagnostidis & Overbeck 1966.
	<i>Pelochromatium roseum</i>	6	-	-	5,0x 10 ⁴	Anagnostidis & Overbeck 1966.
Pomyaretskoe	<i>Chlorobium vibrioforme</i>	3,25	-	-	4,6x 10 ⁷	Gorlenko <i>et al.</i> , 1974a.
Popowka Mala	<i>Chlorobium limicola</i>	4	c	150	-	Czeczuga 1968a.
	<i>Chlorobium limicola</i>	4-6	c	538	-	Czeczuga 1968a.
Popowka Wielka	<i>Chlorobium limicola</i>	3,5	c	3410	-	Czeczuga 1968a.
Prevost	<i>Thiocapsa spp.</i>	-	-	-	hasta 10 ⁸	Caumette, 1986
Puddledock	<i>Chlorobium limicola</i>	4,5	c	410	-	Banens 1990.
	<i>Thiopedia rosea</i>	6	a	107	-	Banens 1990.
Repnoe	<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	5,75	-	-	3,5x 10 ⁷	Gorlenko <i>et al.</i> , 1973.
Rose	<i>Pelodictyon</i>	4	d	550	-	Parkin & Brock 1980a.

Sistema	Organismo	Prof. (mm)	Bchl	Bchl $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	cel $\cdot\text{ml}^{-1}$	Referencia
	<i>Clathrochloris</i>					
	<i>Chlorobium</i>					
Rotsee	<i>Pelochromatium roseum</i>	11,5	-	-	$2,9 \times 10^3$	Kohler <i>et al.</i> , 1984.
	<i>Thiopedia rosea</i>	7	-	-	$3,1 \times 10^5$	Kohler <i>et al.</i> , 1984.
	<i>Lamprocystis roseopersicina</i>	7,5-9,5	-	-	$3,5 \times 10^5$	Kohler <i>et al.</i> , 1984.
Scheleinsee	<i>Chloronema giganteum</i>	6	d	34	-	García-Gil & Abellà 1992b.
Solar Lake	<i>Chromatium sp.</i>	2,5-2,8	a	20	-	Jørgensen <i>et al.</i> , 1979a.
	<i>Chromatium violascens</i>	1-3	-	-	$1,0 \times 10^6$	Cohen <i>et al.</i> , 1977a.
	<i>Prosthecochloris</i>	3-4,5	-	-	$2,0 \times 10^6$	Cohen <i>et al.</i> , 1977b.
Suga	-	8,6	a	120	-	Takahashi & Ichimura 1968.
	-	8,6	d,e	148	-	Takahashi & Ichimura 1968.
Sugetsu	<i>Chromatium</i>	7	-	-	-	Matsuyama 1978.
	-	8,5	a	81	-	Takahashi & Ichimura 1968.
	-	8,5	d,e	100	-	Takahashi & Ichimura 1968.
Vae San Juan	<i>Amoebobacter roseus</i>	10	-	-	$2,2 \times 10^4$	Romanenko <i>et al.</i> , 1976.
	<i>Pelodictyon phaeum</i>	10	-	-	$6,8 \times 10^6$	Romanenko <i>et al.</i> , 1976.
Vasikkalampi pond	<i>Chlorobium limicola</i>	4-5	c	300	-	Eloranta 1985.
	<i>Pelodictyon luteolum</i>					
	<i>Chlorochromatium aggregatum</i>					
Vechten	<i>Thiopedia</i>	6,2	a	3	50-150 plat	Steenbergen <i>et al.</i> , 1989.
	<i>Chloronema</i>	6,2	d	15	$7,0 \times 10^3$	Steenbergen <i>et al.</i> , 1989.
	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	7,6	e	20	-	Steenbergen <i>et al.</i> , 1989.
	<i>Chloronema giganteum</i>	6	d	30	-	García-Gil & Abellà 1992b.
Veisovo	<i>Pelodictyon phaeum</i>	15	-	-	$9,0 \times 10^6$	Gorlenko <i>et al.</i> , 1974b.
Vilar	<i>Chromatium</i>	4,2	a	900	$3,4 \times 10^6$	Guerrero <i>et al.</i> , 1985a.
	<i>Chlorobium</i>	4,4	c,d,e	200	$3,9 \times 10^6$	Guerrero <i>et al.</i> , 1985a.
Wadolek	<i>Chlorobium limicola</i>	6	c	400	-	Czeczuga 1968a.
Waku-Ike	-	2,5-3	c	79.5	-	Takahashi & Ichimura 1968.
Waldsea	<i>Chlorobium sp</i>	7,8	d	2325	-	Lawrence <i>et al.</i> , 1978.
	<i>Chlorobium sp</i>	7,9	d	2325	-	Parker <i>et al.</i> , 1983.
Zaca	<i>Thiopedia rosea</i>	6-8	a	203	-	Folt <i>et al.</i> , 1989.

Sistema	Organismo	Prof. (mm)	Bchl	Bchl $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	cel $\cdot\text{ml}^{-1}$	Referencia
BÉNTICO						
Delta del Ebro	<i>Chromatium gracile</i>	2,5-4	a	150-467	-	Mir <i>et al.</i> , 1991.
	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>					
	<i>Chromatium sp.</i>					
Mellum	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	0-1,3	a	125-310	-	Stal <i>et al.</i> , 1984a.
	<i>Chromatium</i>					
	<i>Thiopedia</i>					
	<i>Ectothiorhodospira</i>					
Scapa Bay	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	0-5	a	-	$2,9 \times 10^6$	Van Gernerden <i>et al.</i> , 1989a.
	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	2-2,5	a	900	-	Van Gernerden <i>et al.</i> , 1989a.
Schiermonnikoog	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	3-3,5	a	100	-	De Wit <i>et al.</i> , 1989.
Sippewissett (layer 3)	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	3-4	a	242	-	Pierson <i>et al.</i> , 1987.
	<i>Chromatium</i>					
	<i>Thiocystis</i>					
Sippewissett (layer 4)	<i>Thiocapsa pfennigii</i>	5-6	b,c	52, 114	-	Pierson <i>et al.</i> , 1987.
	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>					
Sippewissett (layer 5)	<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	6-7	b,c	40.117	-	Pierson <i>et al.</i> , 1987.
	<i>Thiocapsa pfennigii</i>					
Swanbister Bay	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	0-3	a	160-500	-	Van Gernerden <i>et al.</i> , 1989b.
	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	0-5	a	-	$2,4 \times 10^7$	Van Gernerden <i>et al.</i> , 1989a.
Texel	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	0-5	a	-	$1,0 \times 10^7$	Visscher & V. Gernerden 1991.
	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	2,5-5	a	440	-	Visscher <i>et al.</i> , 1990.

Al comparar la densidad de población de *Chromatium weissei* en la Laguna de Arcas con la de otros lagos en los que aparecen especies congénicas, encontramos que la máxima densidad a lo largo del ciclo anual (algo inferior a los 2 millones de células por mililitro) es una de las más elevadas densidades descritas hasta la fecha para *Chromatium*, aunque algunos lagos como en el Kaiike (Matsuyama, 1981), el Vilar (Guerrero *et al.*, 1985a) y el Cisó (Gasol *et al.*, 1990), las densidades poblacionales descritas son más elevadas, pero debe tenerse en cuenta que en estos lagos la población de *Chromatium* se sitúa a menor profundidad, con lo que la disponibilidad de luz podría ser mayor, y además, en el Cisó la población está constituida por *Chromatium minus*, una bacteria más pequeña que *Chromatium weissei*. Todo esto entronca con lo demostrado por Mas y colaboradores (1990), que estudiando las tasas de crecimiento (separando los factores de ganancia y pérdida) de las poblaciones de las bacterias fotosintéticas de la Laguna del Cisó, vieron que la luz resultaba el factor limitante del crecimiento de estas bacterias. No obstante, al comparar la Laguna de Arcas con las referencias bibliográficas recogidas en la tabla 4-8 debe tenerse en cuenta que muchas de las referencias no son comparables en términos numéricos con nuestro caso debido a la carencia de datos sobre densidades poblacionales o bien porque estas se dan en forma de medidas indirectas como la concentración de pigmentos fotosintéticos.

No comparamos aquí la densidad poblacional de *C. weissei* en la Laguna de Arcas con las poblaciones dominadas con otros géneros, ya que las Clorobiaceas, de mucho menor tamaño, suelen alcanzar mayores densidades celulares en los lugares en los que dominan, pero si debe resaltarse el caso del Lago Mahoney, donde *Amoebobacter purpureus* supera las 10^8 células por mililitro, siendo esta la mayor densidad poblacional descrita hasta la fecha para una bacteria fotosintética planctónica (Overmann *et al.*, 1991).

El biovolumen de las células de *Chromatium weissei* era normalmente algo mayor en la población situada en la quimioclina que en la del hipolimnion profundo, lo que coincide con los resultados de Montesinos (1987), que encontró mayores tamaños en las células de *Chromatium minus* situados en la parte superior del "plate" del Lago Cisó como consecuencia de diferencias en las tasas de crecimiento y en la síntesis o degradación de gránulos de azufre o de polímeros orgánicos. Sin embargo, Esteve y colaboradores (1990) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en el Lago Cisó entre el tamaño de las células de *Chromatium minus*, si bien las diferencias en la ultraestructura si que eran importantes, sobre todo debido a un mayor contenido en polihidroxibutirato (PHB) de las células del fondo. Este polímero se forma a partir de la oxidación endógena en la oscuridad del glucógeno acumulado durante los periodos de actividad fotosintética usando el azufre intracelular como aceptor electrónico (Van Gemerden, 1968 a, b, 1980, Van Gemerden y Befting, 1983).

Guerrero y colaboradores (1985a) propusieron un modelo dinámico para explicar el desarrollo de las poblaciones estratificadas de Cromatiaceas. Según este modelo, las células de la capa superior de la población se cargan de azufre y glucógeno, como consecuencia de su elevada actividad fotosintética, con lo cual aumentan su densidad y van sedimentando. Al ir sedimentando, la luz disponible para esas células es menor y la concentración de sulfhídrico mayor, lo que les obliga a metabolizar sus reservas energéticas, pasando el glucógeno a polihidroxibutirato (PHB). Como a estas profundidades ya carecen de luz, y además la concentración de sulfhídrico es grande, el azufre intracelular no puede ser oxidado, lo que hace que estas células sigan sedimentando y perdiendo viabilidad. No obstante, este azufre elemental si puede ser utilizado como aceptor electrónico en la degradación del glucógeno, por lo que podría existir una vía de degradación de parte de ese azufre intracelular. Por otro lado, debe considerarse que *C. weissei* tiene movilidad flagelar, lo que le permite desplazarse en el perfil vertical. Por todo ello este modelo podría ser una aproximación al funcionamiento de las poblaciones de *Chromatium*, aunque muy matizado por aspectos como la viabilidad de las células que se acumulan en el hipolimnion, las cuales aun presentan procesos de división, así como lo anteriormente comentado respecto a la degradación de los gránulos de azufre y en lo referente a la movilidad de *Chromatium*.

El resto de bacterias fotosintéticas del azufre se encuentran a menores densidades poblacionales y sus distribuciones siguen, en algunos casos, patrones diferentes. En lo que se refiere a la evolución de sus densidades poblacionales, en el periodo de estratificación de 1990 encontramos un crecimiento progresivo de la población que culmina a final de agosto, produciéndose un descenso posterior de las densidades poblacionales (figura 4-11). Sin embargo, en el periodo de estratificación del año 1991 las densidades alcanzadas son inferiores y el patrón de distribución temporal no aparece tan claro. Por regla general, *Amoebobacter* sp. tiene una distribución irregular en la columna de agua, encontrándose diversos picos de mayor densidad intercalados entre zonas de menor densidad poblacional. Esta bacteria posee vacuolas gaseosas, que le permiten una regulación de la profundidad a la que se encuentra la célula, incluyendo mecanismos como la agregación en ausencia de sulfhídrico que provocan una disminución de la flotabilidad (Overmann y Pfennig, 1992a). Estos cambios pueden tener lugar a un plazo relativamente largo, como en el Lago Cisó, donde en el estudio durante un ciclo diario de la población de estas bacterias no se encontró, a diferencia de otras especies de bacterias fotosintéticas flageladas (*Chromatium minus*), una migración de las células vacuoladas de *Amoebobacter* (Pedrós-Alió y Sala, 1990). Algo similar, en lo que se refiere a la presencia de vacuolas gaseosas, sucede con *Pelodictyon clathratiforme*, que pertenece a un género que también tiene la capacidad de formar vacuolas gaseosas (Abellà y García-Gil, 1988; Overmann *et al.*; 1991a, Walsby, 1994), y que se encuentra distribuido en todo el hipolimnion anóxico sin una estructura estratificada.

A diferencia de las otras dos especies minoritarias, *Thiocapsa* sp. si presenta sus máximos poblacionales en la zona de la oxiclina, lo cual no es de extrañar si pensamos que se trata de una especie que no dispone de ningún mecanismo que le permita regular su posición en la columna de agua (Imhoff, 1992) Por ello, el crecimiento de la población a expensas de la actividad fotosintética solo puede darse en esta zona, donde la luz y el sulfhídrico están disponibles, mientras que las células que sedimentan desde esta capa no tienen, a diferencia del resto de las especies de microorganismos fotosintéticos de la Laguna de Arcas, capacidad para remontar hacia la quimioclina. Resulta llamativo que *Thiocapsa* se encuentra en ocasiones en aguas microaerobias, aunque probablemente solo durante determinados periodos del ciclo diario debido a las variaciones de las concentraciones de oxígeno y sulfhídrico. Esto puede explicarse en función las capacidades metabólicas descritas para algunas especies de este género (Van den Ende *et al.*, 1996), que le permiten permanecer algún tiempo en un medio con oxígeno teniendo un metabolismo quimioorganotrofo (Kondratieva *et al.*, 1976) o quimiolitotrofo (De Wit y Van Gernerden, 1987b; 1990, Overmann y Pfennig, 1992b). Aunque en *Thiocapsa roseopersicina* los enzimas del ciclo de Calvin no son inhibidos por la presencia de oxígeno (Kondratieva, 1976), lo cual permitiría que siguiera con la actividad de la fase oscura de la fotosíntesis en presencia de oxígeno, Madigan (1988) sugirió que cuando las condiciones se hacían óxicas este organismo pasaría de un metabolismo fotótrofo a uno quimiolitotrofo, sin embargo Schaub y Van Gernerden (1994) demostraron la capacidad de un crecimiento con funcionamiento simultáneo de ambos procesos. A diferencia de los enzimas implicados en la fijación fotosintética de carbono, la síntesis de bacterioclorofila *a* si es un proceso inhibido por el oxígeno (De Wit y Van Gernerden, 1990, Imhoff, 1992). Esta capacidad de crecimiento quimiolitotrofo en presencia de oxígeno resulta especialmente importante para su dominancia en sistemas sedimentarios laminados (Herbert *et al.*, 1986; Pierson *et al.*, 1987, Van Gernerden *et al.*, 1989a, 1989b) en los que se producen importantes variaciones cíclicas en las concentraciones de oxígeno y sulfhídrico (Jørgensen *et al.*, 1979b; De Wit *et al.*, 1989, Jørgensen y Des Marais, 1990, De Wit y Van Gernerden, 1990, De Wit *et al.*, 1995), lo que también ocurre, aunque en menor medida, en la quimioclina de los lagos con hipolimnion anóxico (Imhoff, 1992). Cabe también reseñar que los requerimientos de luz de *Thiocapsa* son relativamente altos (Veldhuis y Van Gernerden, 1986), con lo que esta bacteria podría ver limitada su zona de crecimiento a la parte superior de la quimioclina, en la cual evita el efecto de sombra de los otros microorganismos fotosintéticos que viven en esa zona de la laguna. La capacidad de crecimiento quimiolitotrófico, con respiración aerobia de sulfhídrico y tiosulfato no se ha encontrado en las Cromatiaceas de gran tamaño (Overmann y Pfennig, 1992b), para las cuales el oxígeno es letal (Van Gernerden y Mas, 1995). Por otra parte, aunque si se ha observado la asimilación de sustancias orgánicas por parte de *Amoebobacter* y *Chromatium* (Eichler y Pfennig, 1988; Garcia-Cantizano *et al.*, 1994), *Chromatium weissii* es un microorganismo exclusivamente fotótrofo (Madigan, 1988; Imhoff, 1992).

Si comparamos la evolución de los microorganismos en los dos ciclos completos (1990 y 1991) encontramos que, por regla general, las densidades poblacionales de estos microorganismos fueron más elevadas durante el periodo de estratificación de 1990 que durante el de 1991 (tabla 4-7, figura 4-11), lo que podría achacarse a una mayor estabilidad de la estructura vertical estratificada de las aguas de la laguna en 1990 que en 1991, consecuencia directa de unas condiciones meteorológicas más favorables en el primer año. Únicamente *Cryptomonas* alcanzó mayores tamaños poblacionales durante el periodo 1991, quizá también por el mismo motivo, ya que una cierta inestabilidad podría favorecer a *Cryptomonas* y perjudicar a las bacterias fotosintéticas y a su vez el menor desarrollo de estas bacterias podría relajar su efecto de "filtro" de nutrientes hacia la zona microaeróbica que habita *Cryptomonas*, lo que permitiría un mayor desarrollo de este alga.

La población de *Oscillatoria ornata* de la Laguna de Arcas tiene un crecimiento sostenido a lo largo del periodo de estratificación pero, a diferencia del resto de los organismos estudiados, la población de *Oscillatoria ornata* no inicia un rápido declive durante los días del mes de octubre previos a la mezcla, sino que se concentra en el cada vez más reducido hipolimnion anóxico, en el cual su densidad poblacional se hace mayor al reducirse este a un volumen de agua más pequeño. La elevada tolerancia metabólica de las cianobacterias las convierte en unos microorganismos idóneos para crecer en zonas de fuertes gradientes físico-químicos, como la quimioclina de los lagos o en los sistemas sedimentarios bien iluminados (Padan, 1979a). Esta tolerancia incluye en muchos casos la resistencia a condiciones anóxicas, altas concentraciones de sulfhídrico, y bajos potenciales de óxido-reducción, esto es, algunas de las circunstancias que se dan en la quimioclina e hipolimnion anóxico de los lagos. De entre estos microorganismos, son los del género *Oscillatoria* los que más frecuentemente aparecen en medios microaerobios o anóxicos (Richardson y Castenholz, 1987a), resumiéndose algunos ejemplos en la tabla 4-9. No obstante, puesto que la ecofisiología de la población de *Oscillatoria ornata* de la Laguna de Arcas es objeto del capítulo 6 de esta tesis, no emplearemos aquí más espacio en su descripción.

La población de *Cryptomonas* spp de la Laguna de Arcas, que se encuentra a lo largo de todo el año, presenta sus máximos poblacionales a partir de la mitad del periodo de estratificación (tabla 4-7), debido sobre todo a la gran densidad alcanzada en la zona de la quimioclina. Esta población sufre un rápido descenso durante los días previos a la mezcla otoñal, de manera similar a la de *Chromatium weissii*. El máximo poblacional a la hora del muestreo solía encontrarse unos centímetros por encima del agua en la que aparecía sulfhídrico, aunque buena parte de la población podía encontrarse en las aguas anóxicas. Sin embargo, la permanencia en las aguas anóxicas no es un proceso que se pueda prolongar durante mucho tiempo, puesto que el sulfhídrico inhibe la fotosíntesis

en *Cryptomonas* (Gasol *et al.*, 1993). La ultraestructura de las células de *Cryptomonas* en las muestras de las aguas anóxicas de la Laguna de Arcas no revelaba alteraciones significativas respecto al patrón habitual en estos microorganismos (figura 4-10) ni se observó fagotrofia de bacterias por parte de estas algas.

Tabla 4-9.- Algunas cianobacterias presentes en ambientes anóxicos o microaerobios.

Table 4-9.- Some cyanobacteria found in microaerobic or anoxic habitats.

Cianobacteria	Medio	Referencia
<i>Oscillatoria agardhii</i> var. <i>isothrix</i>	quimioclina lago	Saunders, 1972
<i>Oscillatoria splendida</i>	sedimento anaerobio	citado en Richardson & Castenholz, 1987
<i>Oscillatoria margaritifera</i>	sedimento anaerobio	Richardson & Castenholz, 1987
<i>Oscillatoria uthermoehliana</i>	hipolimnion lago	Gorlenko <i>et al.</i> , 1983
<i>Oscillatoria prolifica</i>	hipolimnion lago	Saunders, 1972
<i>Oscillatoria chalybea</i>	hipolimnion embalse	citado en Richardson & Castenholz, 1987
<i>Oscillatoria redekei</i>	hipolimnion lago	citado en Richardson & Castenholz, 1987
<i>Oscillatoria terebriformis</i>	manantial termal	Richardson & Castenholz, 1987
<i>Oscillatoria amphigranulata</i>	manantial termal	Castenholz & Utkilen, 1984
<i>Spirulina labyrinthiformis</i>	manantial termal	Castenholz, 1977
<i>Oscillatoria</i> sp.	quimioclina lago	Jørgensen <i>et al.</i> , 1979a
<i>Microcoleus</i> sp.	quimioclina lago	Jørgensen <i>et al.</i> , 1979a
<i>Oscillatoria limnetica</i>	hipolimnion lago	Cohen <i>et al.</i> , 1975a, b
<i>Mastigocladus laminosus</i>	manantial termal	Castenholz, 1976
<i>Dactylococcopsis salina</i>	quimioclina lago	Van Rijn y Cohen, 1983
<i>Oscillatoria rubescens</i>	hipolimnion lago	Camps <i>et al.</i> , 1976
<i>Oscillatoria rubescens</i>	hipolimnion lago	Avila <i>et al.</i> , 1984
<i>Oscillatoria annae</i>	hipolimnion lago	Vicente y Miracle, 1984
<i>Phormidium</i> sp.	tapete microbiano	Caumette <i>et al.</i> , 1994
<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	tapete microbiano	Stolz, 1983, 1990
<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	tapete microbiano marino	Stal <i>et al.</i> , 1985
<i>Oscillatoria limnetica</i>	quimioclina lago	Wyverman y Tyler, 1995
<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	tapete microbiano lago	Jørgensen <i>et al.</i> , 1986
<i>Oscillatoria</i> sp., <i>Lyngbya</i> sp. y <i>Pseudanabaena</i> sp.	Manantial sulfuroso	Martinez <i>et al.</i> , 1997

En lo que se refiere a la permanencia de *Cryptomonas* en las aguas anóxicas ricas en sulfhídrico en condiciones de oscuridad, los resultados de los experimentos de supervivencia de este organismo en esas condiciones resultaron reveladores. Si se tomaban muestras de dos profundidades de la Laguna de Arcas con elevada concentración de *Cryptomonas*, la supervivencia en la oscuridad de este alga en la muestra de la parte superior de la quimioclina, en condiciones microaerobias se podía prolongar durante bastantes días, activándose al pasarlas a condiciones de iluminación. Sin embargo, si la muestra era más profunda y contenía elevadas concentraciones de sulfhídrico, las células se inactivaban en pocas horas. Ello implica que la población de *Cryptomonas* de la Laguna de Arcas debe realizar una migración activa a lo largo del ciclo diario en torno a la quimioclina, tal como se ha descrito en los trabajos que se comentan más adelante. Por otro lado,

las células que se encuentran en el hipolimnion profundo podrían ser células que, bien por sedimentación o por movimiento activo, han llegado a esas profundidades, donde, de prolongarse su estancia, acabarían inactivándose.

La aparición de máximos profundos de algas flageladas es un hecho bastante frecuente en la oxiclina de lagos estratificados (Croome y Tyler, 1984a, 1985; Miracle *et al.*, 1991, Wyverman y Tyler, 1995). Estas comunidades de la oxiclina son bastante diferentes de las epilimnéticas, ya que habitualmente sólo están formadas por una especie, que acumula grandes cantidades de biomasa y cuya población mantiene un equilibrio dinámico durante el periodo de estratificación, basado en bajas tasas de crecimiento y de pérdidas (Miracle *et al.*, 1992). En consecuencia, estas comunidades no siguen los modelos habituales de sucesión descritos para las comunidades de algas planctónicas epilimnéticas (Gasol *et al.*, 1992a), como el propuesto por el "Plankton Ecology Group" (Sommer *et al.*, 1986), siendo la estructura de la comunidad metalimnética menos diversa y más persistente en el tiempo (Haffner y McNeely, 1989). De entre las algas que se encuentran en estas poblaciones, *Cryptomonas* spp es probablemente la más frecuente. En la Laguna de la Cruz, un lago meromítico situado en la zona cárstica carbonatada de Cuenca, Dasí y Miracle (1991) encontraron abundantes poblaciones de *Cryptomonas obovata*, *C. phaseolus* y *C. erosa* en las proximidades de la oxiclina, aunque a diferencia de la Laguna de Arcas y del Lago Cisó, esta laguna es oligosulfidófila dada su situación sobre un sustrato carbonatado (Vicente y Miracle, 1988b). Así mismo, también se encontraron poblaciones de *Cryptomonas* en las aguas microaerobias del Lagunillo del Tejo, laguna adyacente a la anterior (Vicente y Miracle, 1984), que además tenía por debajo, ya en las aguas anóxicas oligosulfidófilas, una densa población de *Oscillatoria annae*. De similares características oligosulfidofilas es el Lago de El Tobar (Vicente *et al.*, 1993), donde *Cryptomonas erosa* alcanza mayores concentraciones en las aguas microaeróbicas que en el resto del epilimnion (Miracle *et al.*, 1993), aunque en este caso existen otras algas que aparecen en aguas anóxicas. En el Lago de Banyoles también se encontraron poblaciones profundas de *Cryptomonas phaseolus*, aunque la aparición de sulfhídrico hacía desplazarse la población hacia capas superiores. También en los lagos de Montcortés (Camps *et al.*, 1976) y Estanya (Avila *et al.*, 1984), este último con alta concentración de sulfhídrico, se ha descrito la presencia de poblaciones metalimnéticas de *Cryptomonas*, así como densas poblaciones de *Oscillatoria rubescens*. Rott (1988) también describió el mismo tipo de poblaciones de flageladas en lagos de montaña centroeuropeos, al igual que hizo Gervais (1991) en su descripción de las poblaciones fitoplanctónicas del Schachtensee, en Alemania.

Sin duda el caso mejor estudiado de una población metalimnética de *Cryptomonas* es el del Lago Cisó, descrito ampliamente en la tesis doctoral de Josep Gasol (1988) y desde un punto de vista más amplio por Pedrós-Alió y Guerrero (1993). En este lago, *Cryptomonas phaseolus* alcanza densidades

poblacionales de hasta 10^5 cel·ml⁻¹ en el metalimnion, en presencia de bajas concentraciones de oxígeno y sulfhídrico (Pedrós-Alió *et al.*, 1987), llegándoles intensidades luminosas que varían entre el 1 y el 20 % de la luz incidente, que generalmente estaban por debajo de las intensidades óptimas para este organismo (Gasol *et al.*, 1993). No obstante esta criptoficea se adapta bien a esas condiciones luminosas, por lo que la luz no parece ser un factor limitante (Gasol *et al.*, 1990). Las elevadas densidades poblacionales de *Cryptomonas phaseolus*, a diferencia de las de otras flageladas que forman poblaciones metalimnéticas (Pick *et al.*, 1984), se deben al crecimiento *in situ* de la población (Gasol y Pedrós-Alió, 1991, Gasol *et al.*, 1992b), que era máximo en marzo y se iba ralentizando a lo largo del periodo de estratificación, siendo bajo durante el invierno y aumentando hasta el nuevo máximo en marzo (Pedrós-Alió *et al.*, 1987, Gasol *et al.*, 1990). El crecimiento de *Cryptomonas phaseolus* era constante, pero las pérdidas equilibraban ese crecimiento en buena parte de la estratificación (Gasol *et al.*, 1992b), siendo la descomposición el principal factor de pérdida durante la mayoría del año, mientras que otros factores de pérdida como la sedimentación o el lavado solo llegaban a ser importantes en determinados periodos, concretamente en algunos periodos de la primavera y el invierno respectivamente (Pedrós-Alió *et al.*, 1987). Este protista permanece en aguas con bajas concentraciones de sulfhídrico durante la noche (Gasol *et al.*, 1992b), al igual que durante el periodo invernal cuando alcanza concentraciones de alrededor de hasta 100 ind ml⁻¹ en las aguas anóxicas (Gasol *et al.*, 1990). La población de *Cryptomonas phaseolus* del Lago Cisó se mantenía con su propia fijación de carbono (no ingería bacterias) acumulando almidón, la cual resultaba inhibida por el sulfhídrico, a diferencia del proceso de degradación de carbohidratos intracelulares, que continuaba durante la noche en aguas con sulfhídrico (Gasol *et al.*, 1993). Esta degradación de carbohidratos ya había sido propuesta por Morgan y Kalff (1975) como un mecanismo de mantenimiento en condiciones de oscuridad para *Cryptomonas erosa*, aunque estos autores no mencionaban la posibilidad de que fuera en condiciones anóxicas. La buena adaptación de *Cryptomonas* a las condiciones metalimnéticas, unido a una posible reducción de la presión de predación, eran las causas aducidas por Gasol y colaboradores (1993) para explicar la formación de estas densas poblaciones de *Cryptomonas*. Massana y colaboradores (1994), trabajando en el Lago Cisó, comprobaron que la ausencia de una presión eficaz de predación permitió el desarrollo masivo de este alga en la quimioclina, ya que la aparición de una importante población de *Daphnia pulex* tenía como consecuencia una drástica disminución de la población de *Cryptomonas*, lo que se corroboró con experiencias de laboratorio.

En la Laguna de Arcas no se ha observado la predación de *Cryptomonas* por los cladóceros, sin embargo, como se describe en un apartado posterior, estas algas constituyen la base alimenticia de varios ciliados, lo que supone una importante presión de predación sobre *Cryptomonas*. Ello nos hace pensar que las altas concentraciones encontradas podrían deberse no tanto a la baja presión de

predación, sino a la buena adaptación de *Cryptomonas* a las condiciones de la quimioclina de la laguna, tanto en lo que se refiere a sus condiciones lumínicas (Ojala; 1993a; Gervais, 1997) como a la capacidad de migración para encontrar las condiciones que en cada momento supongan un equilibrio en sus necesidades de nutrientes o adaptaciones metabólicas.

Los distintos microorganismos situados en la quimioclina de la Laguna de Arcas disponen de mecanismos que les permiten ajustar su posición en la columna de agua en aquel punto en el que las condiciones son más favorables (o menos desfavorables). Además de la posesión de flagelos, que les permite una movilidad activa, el cambio de la densidad de flotación es uno de ellos, puesto que la presencia de diversas estructuras celulares (Guerrero *et al.*, 1985b), como las inclusiones de glucógeno, PHB, desarrollo de vacuolas gaseosas (Overmann *et al.*, 1991a), cambios en el contenido celular de azufre (Guerrero *et al.*, 1984; Mas y Van Gemerden, 1987), entre otros, puede producir importantes variaciones en la densidad celular. Estas inclusiones tienen efectos sobre el volumen y la densidad de los microorganismos que las presentan (Mas *et al.*, 1985). En el lago Mahoney, en el cual se ha descrito la más densa población de bacterias fotosintéticas encontrada hasta ahora en un lago, la bacteria fotosintética *Amoebobacter purpureus* aumenta hasta 9 veces su vacuolación, disminuyendo su densidad de flotación hasta un valor muy por debajo de la densidad del agua del lago (Overmann y Pfennig, 1992a), pero además disponen de un mecanismo de agregación celular basado en efectos hidrofóbicos que también contribuye a la acumulación pasiva de células en la quimioclina con lo que se consigue una estratificación de la población en un rango más estrecho. En el caso de las cianobacterias, el mecanismo que regula su flotabilidad les permite situarse a una profundidad en la que ni la luz ni los nutrientes inorgánicos estén en exceso relativo uno frente al otro (Konopka, 1984)

La flotabilidad debida a la posesión de vacuolas gaseosas capacita a los microorganismos para permanecer en la parte de la columna de agua que le resulta más adecuada para desarrollo. En teoría, la capacidad de movimiento libre que viene dada por la posesión de flagelos es el medio más versátil, pues permite al microorganismo un movimiento horizontal, además del vertical, así como una serie de respuestas hacia estímulos direccionales. Sin embargo, muchos microorganismos poseen vacuolas de gas y no flagelos, a pesar de la aparente mayor versatilidad de estos. Walsby (1994) sugiere tres posibles razones para ello. Por un lado, que la información genética necesaria para la producción de flagelos no está en el material genético de todos los procariotas, por ejemplo, no aparecen en ninguna cianobacteria, a pesar de que Waterbury y colaboradores (1985) describieron una capacidad "natatoria" en una cianobacteria unicelular. También existirían problemas en el mantenimiento de una migración hacia arriba, ya que los gradientes químicos en los lagos se pueden extender en distancias relativamente amplias, con lo que la quimiotaxis, función esencial en los flagelos, no sería aplicable en este caso, aunque si la fototaxis en organismos

fotosintéticos como los que nos ocupan. Por último, y la razón más puramente ecológica, que la flotabilidad por medio de vacuolas es un medio de transporte más barato y/o veloz en muchos microorganismos

La capacidad de movimiento de los microorganismos planctónicos les permite regular su posición en la columna de agua no solo a largo plazo, sino que también pueden medirse migraciones de estos microorganismos a lo largo del ciclo diario. Este tipo de migraciones también se han observado en sistemas sedimentarios dominados por cianobacterias (Shilo y Fattom, 1984, Malin y Walsby, 1985; Richardson y Castenholz, 1987a, 1989; Garcia-Pichel *et al.*; 1994, Bebout y Garcia-Pichel, 1995). Estos ajustes pueden servir a los organismos que los realizan en distintos sentidos, como asegurarse unas condiciones nutricionales más favorables o evitar la predación, lo cual puede afectar tanto la abundancia como la composición de especies (Salonen *et al.*, 1993). En el Lago Holmsjon *Chromatium* realiza una migración diaria de unos 30 cm (Lindholm *et al.*, 1985), mientras que *Thiopedia rosea* migra hasta un metro diariamente en el Rotsee para adaptarse a las condiciones de sulfhídrico (Kohler *et al.*, 1984) En el Lago Cisó, la población de *Chromatium minus* presenta una migración vertical diaria de 36 cm (Pedrós-Alió y Sala, 1990), mientras que *Cryptomonas phaseolus* llega a realizar migraciones verticales de hasta 43 cm (Gasol *et al.*, 1990), aunque el rango de migración de los flagelados puede llegar a ser de 2-5 metros diarios (Sommer, 1988b), como los 2,2 metros de *Cryptomonas marsonii* en el Lago Nimeton (Salonen *et al.*, 1984). En el caso de la Laguna de Arcas también se observaron migraciones que podían llegar a decenas de centímetros a lo largo de un ciclo diario por parte de los microorganismos que viven en la quimioclina (Rodrigo, 1997). A lo largo de ese ciclo, *Cryptomonas* spp desciende durante la noche y sube por la mañana, para volver a descender durante la tarde.

En general, *Cryptomonas* spp presentan un patrón bastante extendido en cuanto a sus variaciones diarias según el cual migra hacia arriba desde un par de horas antes de la salida del sol partiendo desde las aguas anóxicas ricas en sulfhídrico, hasta mediodía, y a partir de entonces desciende en la columna de agua hasta volver a ocupar aguas con sulfhídrico, donde permanece durante la mayor parte de la noche. Algo así sucedía en el Lago Cisó, donde el pico de *Cryptomonas phaseolus* no se movía siguiendo la intensidad luminosa óptima, sino las oscilaciones de la interfase óxica-anóxica (Gasol *et al.*, 1990; 1992b). En lagos finlandeses, *Cryptomonas* sp. permanece durante el día en las aguas epilimnéticas para realizar su actividad fotosintética (Arvola *et al.*, 1987, 1992), mientras que por la noche migra hacia el metalimnion en busca de fósforo (Salonen, 1984) lo cual ha podido también ser comprobado en diseños experimentales de laboratorio (Arvola *et al.*, 1991), aunque Gasol y colaboradores (1990) se inclinaban más por que los nutrientes que podrían motivar esa migración en el Lago Cisó serían micronutrientes o vitaminas. Ojala y colaboradores (1996) encontraron que la conducta migratoria de las criptofíceas en condiciones favorables les permitía conseguir una mayores tasas de crecimiento durante cortos periodos, lo que

apoyaba la hipótesis de Raven y Richardson (1984), basada en un análisis costo-beneficio, que propugnaba que la migración diaria podía incrementar la tasa de crecimiento de los flagelados. En el caso de la población de la Laguna de Arcas, dada la fuerte limitación de fósforo existente en la zona óxica de la laguna, *Cryptomonas* podría sacar provecho de esas migraciones hacia la zona anóxica para captar este nutriente, cuya difusión hacia arriba se ve limitada por la presencia de la densa capa de bacterias fotosintéticas que ejercen un papel de filtro de nutrientes.

En otros flagelados, como el caso de *Chattonella antiqua*, se ha podido demostrar una migración similar a la descrita en lagos finlandeses, hacia las capas iluminadas durante el día y hacia aguas ricas en nutrientes, donde acumula estos nutrientes inorgánicos durante la noche (Watanabe *et al.*, 1991). Esta misma conducta mostraba el dinoflagelado *Gymnodinium bogoriense*, que por la noche asimilaba amonio y fósforo en las capas profundas de embalses estratificados en Israel (Lieberman *et al.*, 1994). Sin embargo, Hansson (1995) encontró que en el Long Lake (Michigan), si bien en la primera mitad del periodo de estratificación *Cryptomonas cf. marsonii* presentaba un patrón migratorio similar, a final de ese periodo migraba hacia arriba en las horas de oscuridad, lo que este autor relacionó con alteraciones debidas a la desestabilización de la estructura térmica que estarían relacionadas con la alteración de los gradientes, así como con la posible existencia de quimiorreceptores (en especial para el oxígeno) en este alga. Arvola y colaboradores (1991) también observaron que el patrón migratorio podía variar entre las distintas especies de criptofíceas según su estado fisiológico y la fase del ciclo celular, respondiendo a causas internas como los ritmos circadianos, fototaxis o geotaxis modificadas por factores externos como la luz o los nutrientes.

En general, las criptofíceas son un grupo del fitoplancton que utiliza su capacidad fotosintética como el principal medio de obtención de carbono (Arvola *et al.*, 1991), ya que si bien se ha podido observar cierta capacidad fagotrófica sobre bacterias, su contribución no superaba el 2 % de la captación diaria de carbono (Tranvik *et al.*, 1989). En cambio, otros flagelados pigmentados, especialmente las crisofíceas, tienen un metabolismo principalmente heterotrófico, que normalmente se basa en la fagotrofia (Bird y Kalff, 1987; Carrick y Fahnenstiel, 1989; Caron *et al.*, 1990, Wilcox y Wedemayer, 1991), aunque otros son fotótrofos obligados cuya fagotrofia les faculta para proveerse de factores nutricionales (Nygaard y Tobiesen, 1993) o para resistir periodos en la oscuridad (Caron *et al.*, 1993), con un comportamiento mixotrófico (Porter, 1988; Laliberte y De la Noüe, 1993; Jones, 1997). Todo ello, unido a nuestras observaciones, basadas en estudios de ultraestructura, que no detectaron ningún tipo de vacuolas digestivas que pudieran indicar actividad fagotrófica en las criptofíceas de la Laguna de Arcas, nos hace pensar que la población de *Cryptomonas* en la quimioclina estará sustentada por su actividad fotosintética normal, aunque

desconocemos si estas algas podrían tener alguna capacidad osmótrofa (Gervais, 1997) y si, de existir, esta tiene alguna relevancia ecológica.

4.3.2.2.- Tasas netas de crecimiento de las poblaciones y frecuencia de células en división en *Chromatium weissei*

El cálculo de la tasa neta de crecimiento de las poblaciones de los microorganismos estudiados (tabla 4-10) deja vislumbrar con una mayor claridad la evolución de las poblaciones reflejada en el apartado anterior, sobre todo en el caso de *Chromatium weissei*, que es el microorganismo fotosintético más importante en términos de biomasa. El mismo patrón ya comentado anteriormente se reproduce con el cálculo de la tasa de crecimiento, que es alta en los periodos iniciales de la estratificación, para mantenerse algo más ralentizada hasta finales de agosto, y a partir de entonces la población comienza a decrecer hasta desaparecer durante la mezcla.

Tabla 4.10.- Tasas de crecimiento de las poblaciones (d^{-1}) de los principales microorganismos fotosintéticos estudiados, calculadas con una frecuencia de 3-5 semanas durante los periodos de estratificación de 1990 y 1991 en base a la población total en la Laguna de Arcas.

Table 4.10.- Net growth rates (d^{-1}) in the populations of the main phototrophic microorganisms studied, calculated every 3-5 weeks during the stratification periods of 1990 and 1991, calculations were based on total population of each microorganism in Lake Arcas.

Fecha	<i>Chromatium weissei</i>	<i>Oscillatoria ornata</i>	<i>Cryptomonas</i> spp	<i>Amoebobacter</i> sp.	<i>Pelodictyon clathratiforme</i>	<i>Thiocapsa</i> sp.
1990						
28/4 - 17/5	0,1253	0,1599	0,1494	0,2431	-	0,2327
17/5 - 8/6	0,0484	0,0457	0,0449	0,0511	0,1811	0,0079
8/6 - 4/7	0,0370	0,0010	-0,0453	0,0135	0,0315	0,0231
4/7 - 30/7	0,0124	-0,0005	0,0794	0,0168	-0,0055	0,0441
30/7 - 25/8	0,0171	0,0256	0,0024	0,0089	0,0351	0,0574
25/8 - 7/9	-0,0092	-0,0162	-0,0326	-0,0247	-0,1424	-0,0987
7/9 - 24/9	-0,0211	-0,0150	0,0383	-0,0803	0,0190	0,0089
24/9 - 12/10	-0,1231	0,0370	-0,1257	-0,0176	-0,2569	-0,0019
1991						
1/5 - 24/5	0,0008	0,0205	0,0079	0,0022	0,0018	0,1187
24/5 - 27/6	0,0201	0,0084	0,0723	0,0180	0,0512	-0,0399
27/6 - 6/8	0,0202	0,0124	0,0172	-0,0247	-0,0397	-0,0257
6/8 - 12/9	-0,0009	0,0052	-0,0025	0,0359	0,0373	0,0473
12/9 - 11/10	-0,0693	-0,0069	-0,0758	-0,2122	-0,0439	-0,0430

Los valores obtenidos en nuestro estudio son superiores a los encontrados por Mas y colaboradores (1990), que en el Lago Cisó encontraron tasas que estaban comprendidas entre 0,0365 y -0,0719 d⁻¹ para *Chromatium*. En nuestro caso el rango es considerablemente más amplio, lo que sin duda tiene relación con las distintas características de ambos lagos, ya que en el Cisó las poblaciones de bacterias fotosintéticas pueden tener una mayor estabilidad durante todo el año, pues predominan las condiciones anóxicas durante la mayor parte del ciclo, mientras que en la Laguna de Arcas estas solo perduran durante el periodo de estratificación térmica, de manera que el crecimiento y la disminución de las poblaciones debe tener un desarrollo más activo, lo que redonda en mayores tasas de crecimiento y desaparición. Estas tasas, pese a ser altas, son bastante inferiores a las medidas en el laboratorio en condiciones óptimas, que oscilan entre 1,2 y 3,3 d⁻¹ (Van Gemerden, 1984), pero obviamente, las condiciones de desarrollo de los microorganismos en la naturaleza nunca son óptimas, estando siempre limitados por diversos factores.

En el caso de *Oscillatoria ornata*, a excepción de los periodos iniciales de la estratificación, las tasas son más bajas, siendo lo más reseñable que además de no presentarse un patrón temporal tan claro, durante el periodo final de la estratificación la población apenas declina o incluso, como ocurrió a final de este periodo en 1990, se puede dar un crecimiento muy activo de la población (tabla 4-10). Esto es comprensible si consideramos que, como se expone en un capítulo posterior, la población de *Oscillatoria ornata* puede padecer la competencia de las Cromatiaceas en la captación de luz, de manera que al declinar la población de estas podría encontrar unas condiciones más favorables para su crecimiento.

Cryptomonas spp. presenta un desarrollo bastante anárquico de su población durante el periodo de estratificación. Aquí debe tenerse en cuenta que en el desarrollo de este microorganismo existen diversos factores que pueden afectarle más que al resto, como podrían ser el efecto de filtro de nutrientes de la población de Cromatiaceas que se encuentra por debajo de ellas y sobre todo, una presión de predación mucho más intensa que la sufrida por el resto de los microorganismos estudiados (ver apartado 4.3.3). Las oscilaciones de esos factores podrían explicar este comportamiento aparentemente anárquico de las tasas de crecimiento, aunque cualquier afirmación al respecto requeriría el estudio específico de estos factores. En cualquier caso, la evolución poblacional de la población de *Cryptomonas* en la Laguna de Arcas parece bastante diferente a la descrita en el Lago Cisó, ya que en este caso los vaivenes del tamaño poblacional parecen mucho más frecuentes que en aquel, lo que implicaría mayores tasas de reproducción y pérdida de una manera más descompasada.

Respecto a las otras tres bacterias fotosintéticas, es *Amoebobacter* sp. el que presenta un patrón más claro en 1990, con un crecimiento cada vez más lento hasta alcanzar el mayor tamaño poblacional en el mes agosto, decreciendo

después. En *Thiocapsa* sp y *Pelodictyon clathratiforme* encontraríamos un comportamiento parecido, aunque el patrón no es tan claro. En cambio, la evolución de las poblaciones de estos microorganismos durante el periodo de estratificación de 1991 no seguía un patrón claro, lo que unido a su menor tamaño poblacional durante ese año nos hace intuir una mayor incidencia de factores ambientales durante ese año.

Los valores de frecuencia de células en división obtenidos para *Chromatium weissei* en nuestro estudio son excesivamente elevados en comparación con los obtenidos en la mayoría de estudios que han utilizado esta técnica (tabla 4-11, figura 4-12). Ello puede deberse a que *Chromatium weissei* es una bacteria bastante grande si la comparamos con los tamaños habituales de la mayoría de las bacterias. Este tamaño hace que desde un principio, el proceso de división pueda ser detectado fácilmente, ya que la formación del septo previo a la división puede ser vista desde el más temprano inicio de este proceso. Dado que este ha sido el criterio utilizado para distinguir las células en proceso de división, resulta difícil comparar nuestros resultados con los de otros estudios, que además generalmente han sido realizados en bacterias heterótrofas, cuyo ciclo celular no tiene porque coincidir con el de *Chromatium weissei*. No pretendemos aquí ser críticos con la técnica en lo que se refiere a esos heterótrofos, pero nuestros resultados si que sirven para alertar del uso de la misma en bacterias fotosintéticas, en las que, a la vista de nuestros resultados, no se pueden aplicar las diversas ecuaciones propuestas para el cálculo de las tasas de crecimiento. Ello requeriría una calibración con otras técnicas y un estudio detallado del ciclo celular de *Chromatium weissei*, y puesto que esto no resultaba un objetivo de este trabajo, hemos optado simplemente por utilizar el índice de la frecuencia de células en división como un parámetro a ser comparado entre las distintas muestras, de manera que pudiéramos valorar en que zonas de la columna de agua era más importante el crecimiento, así como las variaciones temporales en la tasa de reproducción de la población, las cuales no son comparables con la tasa de crecimiento de la población de *Chromatium weissei* ya que en nuestro trabajo no se incluyen los factores de pérdida de esta población. Es por ello que, a pesar del relativo “fracaso” en la aplicación de esta técnica para la evaluación de la tasa de crecimiento de la población, lo cual era el objetivo inicial, se ha mantenido en esta memoria la expresión de los resultados obtenidos.

El cálculo de la frecuencia de células en división se realizó para cada una de las muestras correspondientes a las distintas profundidades y fechas muestreadas. En la tabla 4-11 se han calculado los valores medios correspondientes a la división de la población de *Chromatium weissei* en dos subpoblaciones, correspondientes al “plate” bacteriano y al resto del hipolimnion.

Tabla 4.11.- Frecuencia de células en división (FDC) de *Chromatium weissei* calculando los valores medios en la zona del "plate" bacteriano y en el resto del hipolimnion anóxico en los muestreos en los que aparecía esta bacteria.

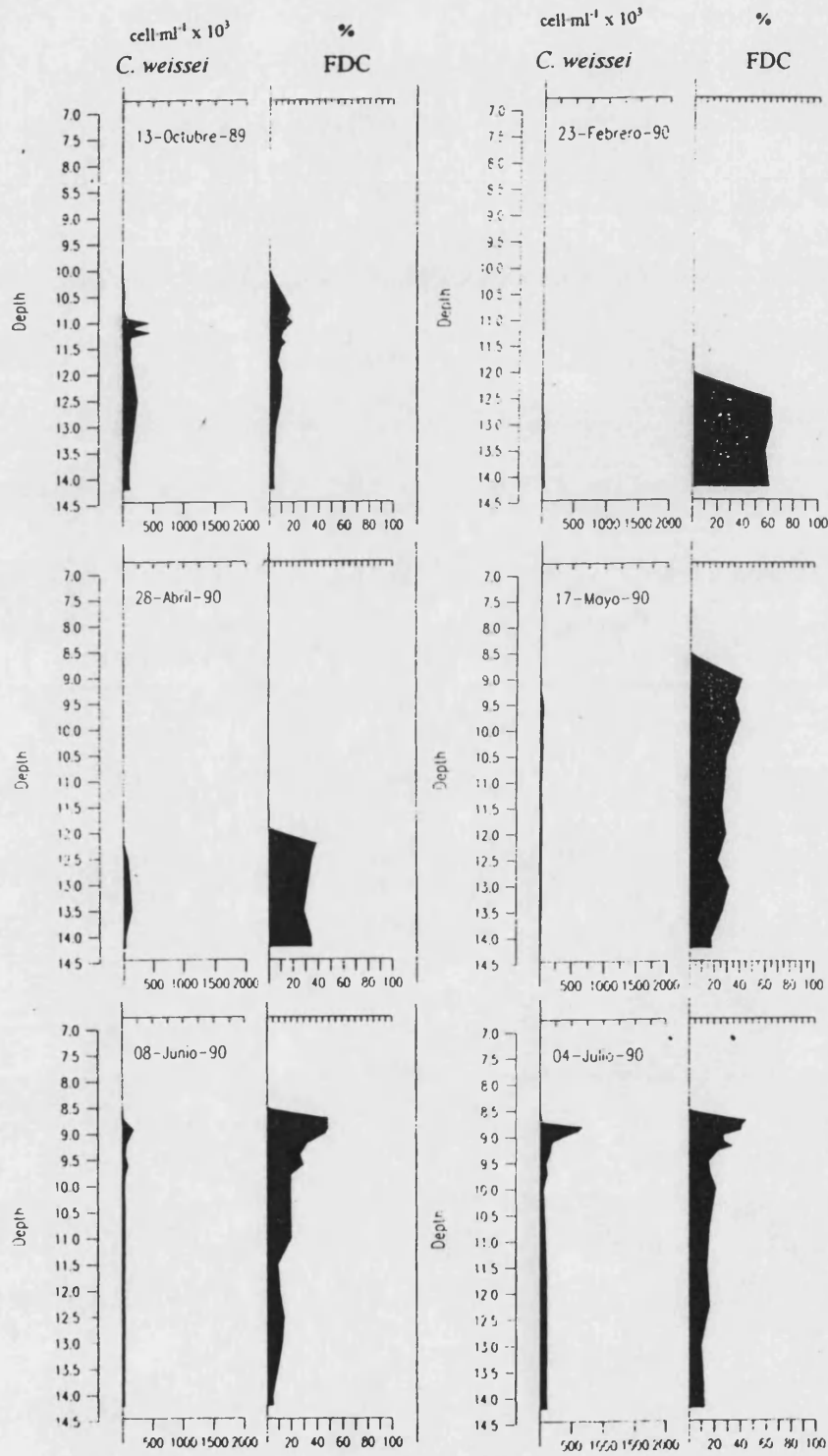
Table 4.11.- Mean values of the frequency of dividing cells (FDC) of *Chromatium weissei* calculated for the bacterial plate as well as for the remainder anoxic hipolimnion. Only samplings in which *Chromatium weissei* was present are shown.

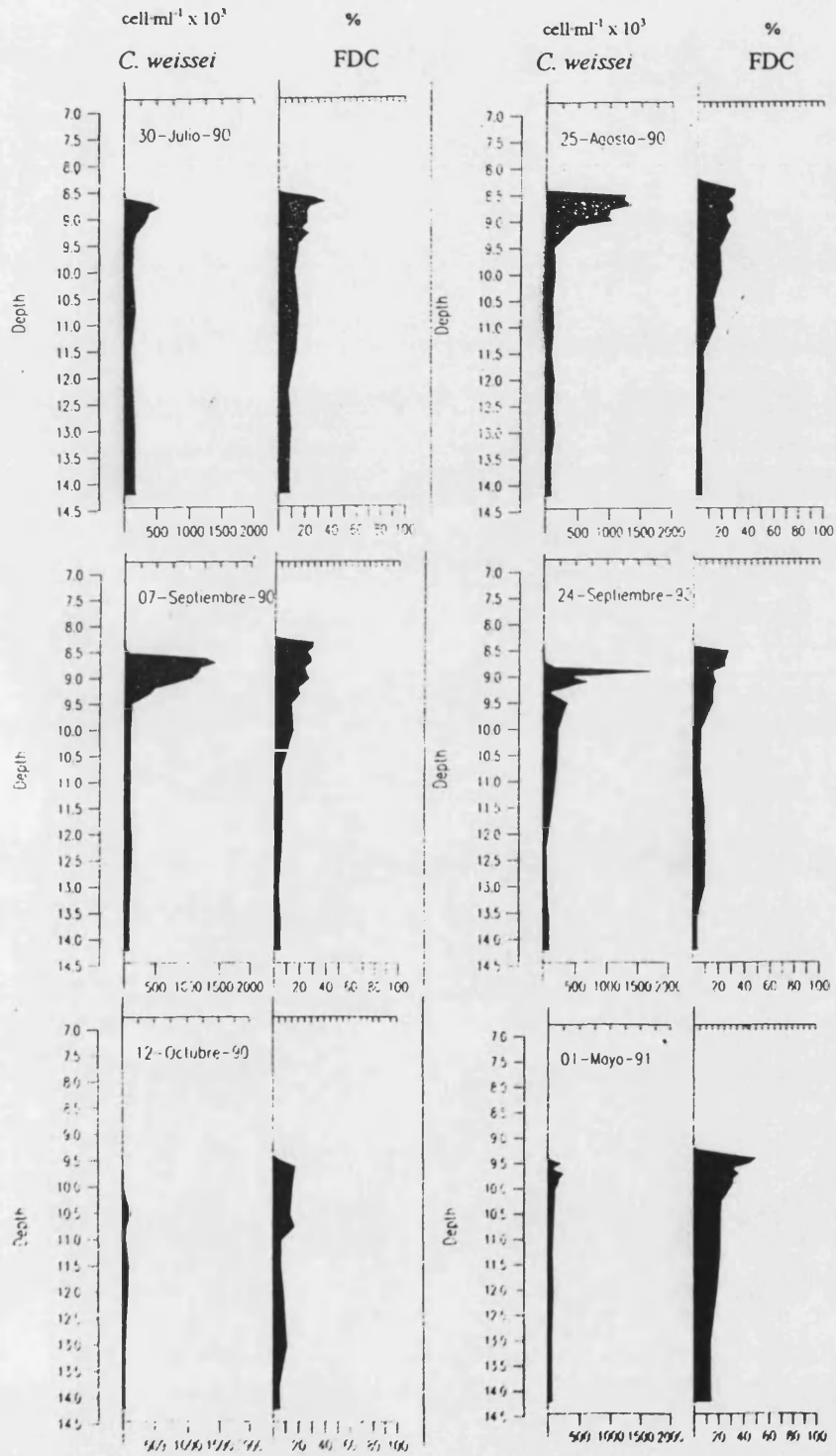
Fecha	FDC "Plate" %	FDC (%) hipolimnion	Fecha	FDC "Plate" %	FDC (%) hipolimnion
13-10-89	13,0	13,0	24-9-90	18,9	10,1
23-2-90	63,2	63,2	12-10-90	11,3	11,3
23-3-90	61,1	61,1	1-5-91	33,0	33,0
28-4-90	34,1	34,1	24-5-91	33,6	15,1
17-5-90	32,9	32,9	27-6-91	25,5	13,9
8-6-90	39,4	12,9	6-8-91	31,1	10,4
4-7-90	34,5	16,1	3-9-91	22,3	9,9
30-7-90	24,8	12,7	12-9-91	17,2	9,3
25-8-90	24,8	9,8	2-10-91	26,2	10,3
7-9-90	24,6	8,3	11-10-91	15,9	15,9
18-9-90	23,9	9,1			

Los resultados de este estudio revelan que el crecimiento de la población de *Chromatium weissei* tiene lugar principalmente en la zona más superficial de la distribución de este organismo, que es la única en que la luz es suficiente para mantener la actividad fotosintética. En el Lago Cisó, Van Gemerden y colaboradores (1985), al estudiar el ciclo diario del metabolismo de las bacterias fotosintéticas del azufre, obtuvieron unos resultados similares, ya que el máximo crecimiento se encontraba en la parte superior del "plate", disminuyendo la actividad y/o viabilidad de las células al ir hacia capas inferiores. A pesar de ello, la densidad de población de *Chromatium* en la parte no iluminada del hipolimnion de la Laguna de Arcas es importante, pero si tomamos la frecuencia de células en división como una medida del crecimiento de la población, el crecimiento en esas zonas sería muy reducido, o incluso nulo, como se observó en el Lago Cisó (Gasol *et al.*, 1990). Esa población hipolimnética puede mantener tasas de crecimiento muy reducidas, pero al ser transferidas a mejores condiciones se produce un crecimiento bastante más activo, lo que resulta similar a otras poblaciones como la de *Thiopedia rosea* en el Lago Zaca (California), la cual mantiene su viabilidad en las condiciones de oscuridad del hipolimnion con un crecimiento muy reducido (Folt *et al.*, 1989).

Aunque en el hipolimnion se seguían observando células en proceso de división, ello no implica necesariamente que se produzca un crecimiento de la población, ya que sería posible que la célula quedara totalmente inactivada antes de completarlo, no obstante en función del porcentaje de células en división probablemente el proceso de división se complete en algunas de las células manteniéndose en base a la degradación de reservas.

CAPÍTULO 4.- DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS





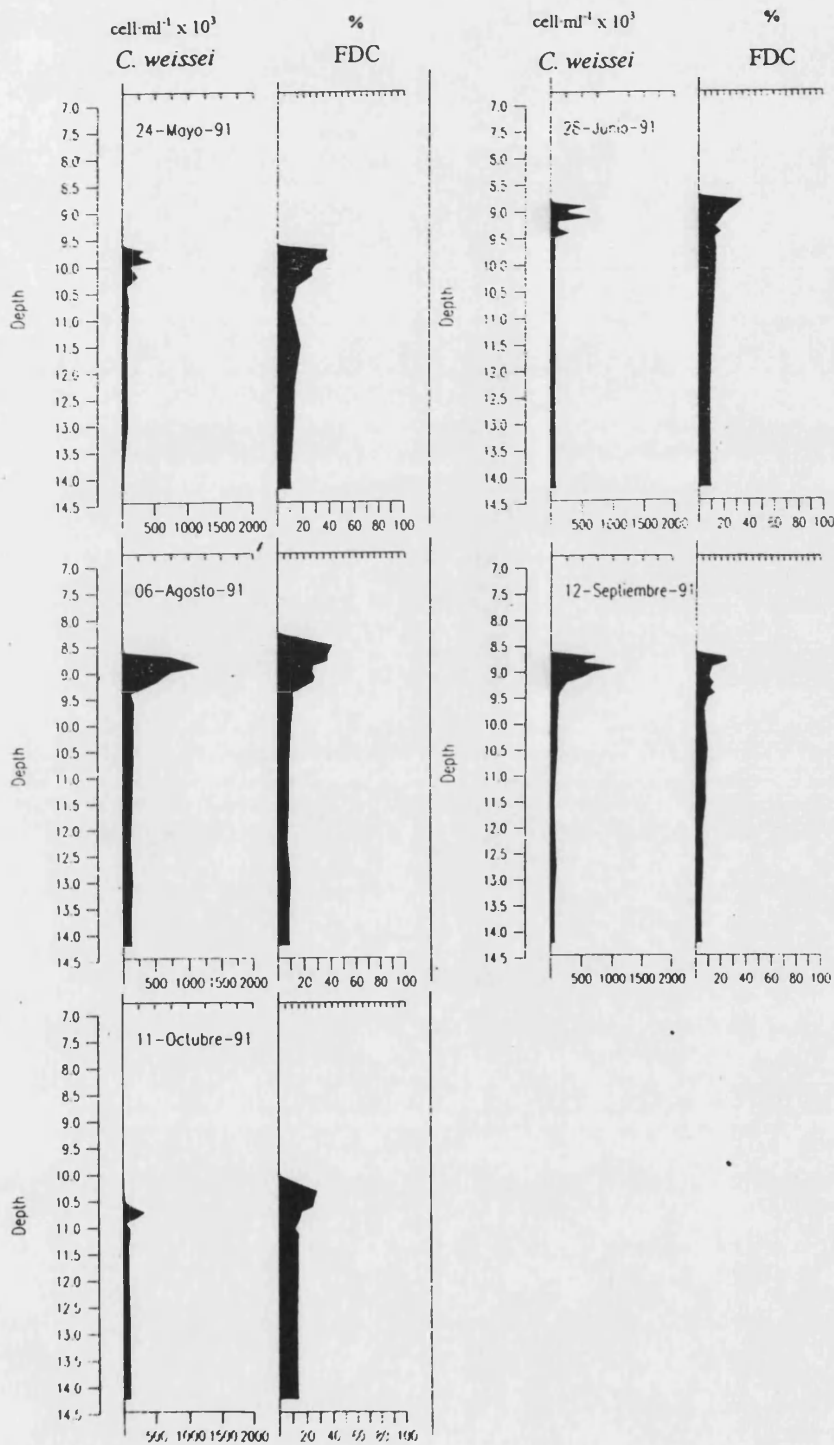


Figura 4.12.- Frecuencia de células en división de *Chromatium weissei* (%) en la Laguna de Arcas, la escala del número de células debe multiplicarse por 10^3 .

Figure 4.12.- Frequency of *Chromatium weissei* dividing cells (%) in Lake Arcas. Scale of cell number must be multiplied by 10^3 .

4.3.3.- OTROS ORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN LA LAGUNA: FITOPLANCTON, ZOOPLANCTON Y PROTOZOOS CILIADOS

Además de los microorganismos en los que se centra este trabajo, en la Laguna de Arcas existen poblaciones de otros microorganismos, de los cuales comentaremos algunos aspectos en este apartado.

4.3.3.1.- Fitoplancton

La comunidad fitoplanctónica de los lagos cársticos es normalmente bastante pobre en especies, dominando las diatomeas, especialmente del género *Cyclotella*, que forma poblaciones más densas en el metalimnion conforme avanza la primavera, cobrando importancia las clorofíceas en verano (Miracle *et al.*, 1992). También es frecuente la aparición de poblaciones de criptofíceas, principalmente en las proximidades de la oxiclina.

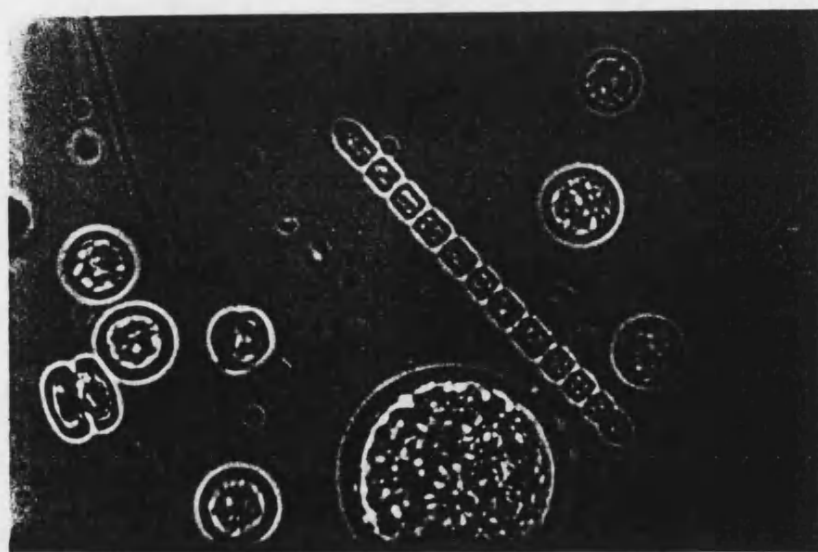


Figura 4.13.- Observación en microscopio invertido (x1000) de una muestra concentrada del epilimnion de la Laguna de Arcas correspondiente al 12 de septiembre de 1991, en la que se observan principalmente diatomeas céntricas del género *Cyclotella*, así como un filamento de *Pseudanabaena* sp..

Figure 4.13.- Microscopical observation, by using an inverted microscope (1000x), of an epilimnetic sample from Lake Arcas corresponding to September 12, 1991, showing several centric diatoms (*Cyclotella* spp) and the filamentous cyanobacterium *Pseudanabaena* sp.

Las poblaciones fitoplanctónicas que se encuentran en las aguas epilimnéticas nunca llegan a alcanzar densidades muy elevadas, estando generalmente

dominadas por diatomeas, especialmente del género *Cyclotella* (figura 4-13, tabla 4-12). Dos son las especies de este género que se encuentran de manera perenne en las aguas de la laguna, *Cyclotella stelligera* y *Cyclotella distinguenda*, constituyendo las poblaciones fitoplanctónicas más importantes en términos de biomasa., mientras que otras especies de diatomeas pennadas (*Nitzschia* spp., *Navicula* sp.) aparecían de forma ocasional en bajas densidades poblacionales. Durante la primavera y el verano es frecuente la presencia de poblaciones relativamente importantes de *Pedinomonas minor* y, en menor medida, de *Rhodomonas minuta*, apareciendo también otras especies de clorofíceas (*Monoraphidium* spp., *Scenedesmus* spp.,...) y dinofíceas como *Peridinium* spp. Las Criptofíceas (*Cryptomonas* spp.) también están presentes en las aguas epilimnéticas, aunque a densidades poblacionales muy inferiores a las que se encuentran en la quimioclina. Por último, también debe señalarse la presencia de *Synechococcus* sp, una cianobacteria unicelular que aparece durante el periodo de estratificación en las aguas epi- y metalimnéticas, aunque su contribución en términos de biovolumen es pequeña.

Tabla 4.12.- Especies y densidades del fitoplancton presente en las aguas epilimnéticas en la Laguna de Arcas en dos fechas de muestreo (mezcla y estratificación).

Table 4.12- Phytoplanktonic species and densities in epilimnetic waters from Lake Arcas at two different sampling dates (mixing and stratification).

ARCAS (mezcla)	24/03/96						
(Datos en individuos/ml)							
Especies	Ar-0,5	Ar-2	Ar-4	Ar-6	Ar-9	Ar-12	Ar-13,5
Bacillariophyceae							
<i>Cyclotella distinguenda</i>	98	161	96	134	146	186	229
<i>Cyclotella stelligera</i>	3181	4626	4706	6045	5989	4745	5388
<i>Amphora ovalis</i>	4	4	8	*	*	5	*
<i>Achnanthes minutissima</i>	*	*	4	*	*	16	*
<i>Nitzschia palea</i>	*	26	14	20	10	18	10
<i>Nitzschia</i> sp.	4	*	*	*	*	*	*
<i>Surirella</i> sp.	*	*	1	*	*	*	*
Cryptophyceae							
<i>Cryptomonas erosa</i>	31	152	62	90	70	113	330
<i>Rhodomonas minuta</i>	122	60	43	8	20	20	12
Chrysophyceae							
<i>Pseudokephyrion blatnense</i>	4	*	*	*	*	*	*
Dinophyceae							
<i>Peridinium umbonatum</i>	87	75	24	21	9	19	6
<i>Katodinium fungiforme</i>	87	75	28	8	*	1	3
Chlorophyceae							
<i>Monoraphidium kormakovae</i>	114	155	139	175	75	69	103
<i>Monoraphidium contortum</i>	153	97	82	85	55	77	108
<i>Kirchneriella contorta</i>	3959	3887	3585	3382	394	1341	1989
<i>Oocystis marsonii</i>	*	*	*	8	60	28	31
<i>Chlamydomonas cf tremulans</i>	*	19	87	146	118	154	59
<i>Chlamydomonas</i> sp.	*	7	8	1	*	*	*

CAPÍTULO 4 - DESCRIPCIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

<i>Chroococcus sp.</i>	275	255	566	209	292	186	347
<i>Pedinomonas minor</i>	315	787	330	531	303	75	28
<i>Scenedesmus aldavei</i>	*	39	*	16	13	3	8
Euglenophyceae							
<i>Euglena sp.</i>	*	*	1	1	1	8	1

ARCAS (estratificación) 20/09/96
(Datos en individuos/ml)

Especies	Ar-0,5	Ar-3	Ar-6	Ar-7	Ar-7,5	Ar-7,7	Ar-7,9
Bacillarophyceae							
<i>Cyclotella stelligera</i>	861	991	1612	2395	2084	2468	1202
<i>Cyclotella distinguenda</i>	494	29	489	630	316	374	79
<i>Cymbella affinis</i>	*	*	*	4	*	*	*
<i>Navicula radiosa</i>	*	4	*	2	*	*	*
<i>Navicula sp.</i>	20		28	28	16	*	13
<i>Nitzschia palea</i>	*	39	*	*	*	10	*
Cryptophyceae							
<i>Cryptomonas erosa</i>	23	24	29	14	20	59	52
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	4	*	*	3	49	20	26
<i>Rhodomonas lacustris</i>	*	8	*	4	*	*	*
<i>Rhodomonas minuta</i>	8	31	51	43	79	*	20
Dinophyceae							
<i>Gymnodinium sp.</i>	9	12	4	3	*	*	*
<i>Katodinium fungiforme</i>	*	20	*	*	4	*	*
<i>Peridinium cinctum</i>	4	*	3	4	1	*	*
<i>Peridinium umbonatum</i>	26	47	26	10	11	10	*
Chlorophyceae							
<i>Chlamydomonas sp1.</i>	31	8	20	8	59	118	33
<i>Chlamydomonas sp2.</i>	*	*	*	8	260	59	*
<i>Chlamydomonas sp3.</i>	*	*	8	2	*	10	*
<i>Chroococcus sp.</i>	1640	267	2128	1573	2722	1681	1960
<i>Gloeodystis sp.</i>	*	12	16	10	35	39	26
<i>Kirchneriella irregularis</i>							
<i>var. spiralis</i>	55	47	51	43	633	1131	610
<i>Monorraphidium contortum</i>	4	4	3	3	11	29	20
<i>Monorraphidium griffithii</i>	90	169	136	123	126	187	184
<i>Monorraphidium convolutum</i>							
<i>var. pseudosabulosum</i>	*	134	34	38	51	*	7
<i>Oocystis marsonii</i>	*	*	*	8	*	20	7
<i>Pedinomonas minor</i>	*	*	*	*	614	39	7
<i>Scenedesmus sp.</i>	*	*	*	*	8	*	*
Cyanophyceae							
<i>Pseudanabaena spp.</i>	*	*	4	8	32	70	33
Euglenophyceae							
<i>Astasia curvata</i>	*	*	*	*	2	10	13
<i>Euglena viridis</i>	4	*	4	4	11	*	13
<i>Euglena sp2.</i>	*	*	*	*	*	*	*
<i>Phacus sp.</i>	*	*	*	*	1	*	*

Aunque el estudio detallado de las poblaciones fitoplanctónicas durante el periodo correspondiente a esta memoria es objeto de un trabajo independiente por parte de otros compañeros de nuestro grupo de investigación, resultará de interés para el lector el contar con un mayor detalle de estas poblaciones. Para ello, en la tabla 4-12 se expresan los resultados de los recuentos fitoplanctónicos correspondientes a dos campañas de muestreo realizadas *ex profeso* durante el año 1996, de manera que su exposición en esta memoria, sin interferir en los trabajos de otros compañeros, nos da idea de la composición de las poblaciones fitoplanctónicas del lago. El estudio de la sucesión en poblaciones fitoplanctónicas resulta de gran utilidad en la constatación de hipótesis ecológicas (Reynolds, 1984; Harris, 1986), sin embargo, al exponer los resultados de solo dos muestreos no se pretende más que ilustrar sobre cuales son las principales especies fitoplanctónicas presentes en la laguna, ya que cualquier estudio que tratara de estudiar la sucesión en las poblaciones fitoplanctónicas requeriría un muestreo más frecuente (quincenal) y unos esfuerzos de determinación que escapan de nuestro objetivo.

4.3.3.2.- Zooplancton

Al igual que las poblaciones fitoplanctónicas del epilimnion, los componentes de zooplancton epilimnético de la Laguna de Arcas han sido objeto de estudio en otra tesis doctoral todavía en elaboración. Sin embargo, los aspectos más interesantes en relación a nuestro trabajo, como es la presencia de especies de rotíferos en las cercanías de la interfase fueron estudiados por Miracle y Armengol-Díaz (1995). Estos autores encontraron que dos rotíferos, *Filinia hofmanii* y *Anuraeopsis fissa*, están presentes en la oxiclina de la laguna. *Filinia hofmanii* es una especie microaerófila que únicamente aparecía en las aguas microaerobias, desapareciendo en los periodos en los que estas condiciones no se daban en la laguna. Por su parte, *Anuraeopsis fissa* desarrolla sus poblaciones principalmente en las aguas epilimnéticas, estando presente desde la primavera hasta el otoño, aunque en ocasiones se encuentran máximos poblacionales justo por encima de la interfase óxica-anóxica, al igual que fue descrito en el Lago Cisó (Gasol *et al.*, 1990). Ambas especies u otras congénéricas ya habían sido descritas previamente como típicas especies de oxiclina (Guerrero *et al.*, 1978; Miracle y Vicente, 1983; Esparcia *et al.*, 1991; Miracle y Alfonso, 1993). Aunque se ha visto que *Anuraeopsis* puede alimentarse de bacterias fotosintéticas (Massana y Pedrós-Alió, 1994a), no parece que en la naturaleza estas bacterias sean una fuente importante de alimento para los rotíferos (Miracle *et al.*, 1992)

Respecto a otras especies de zooplancton, el copépodo *Tropocyclops prasinus* resulta especialmente abundante, mientras que sólo dos especies más de crustáceos, *Cyclops abyssorum* y *Ceriodaphnia reticulata* aparecían regularmente en el plancton de la laguna y solo en sus aguas epilimnéticas (Miracle y Armengol-Díaz, 1995). En la Laguna de Arcas, a diferencia de lo encontrado en otros estudios (Salonen y Lehtovaara, 1992), no se ha detectado la presencia de

cladóceros en las aguas anóxicas, lo cual puede deberse a la elevada concentración de sulfhídrico que aquí se alcanza.

La ausencia en las aguas anóxicas de otros organismos zooplanctónicos distintos de los comentados resulta importante, puesto que la abundancia de algunos organismos zooplanctónicos, además de los ciliados (tabla 4-13), ha sido propuesta como uno de los factores capaz de controlar el tamaño de las poblaciones de bacterias fotosintéticas.

Tabla 4.13.- Algunos ejemplos de predación de organismos zooplanctónicos sobre bacterias fotosintéticas (tomado de Van Gernerden y Mas, 1995).

Table 4.13. - Some examples of zooplanktonic predation on photosynthetic bacteria (From Van Gernerden and Mas, 1995).

Lago	Predador	Abundancia ind l ⁻¹	Observaciones	Referencia
Varios	Copépodos	-	color rojo debido a la predación sobre bacterias fotosintéticas fagotrofia sobre bacterias marcadas con ¹⁴ C	Takahashi & Ichimura 1968.
Fayetteville Green	<i>Daphnia</i>	2-3	color rojo debido a la predación sobre bacterias fotosintéticas	Culver & Brunskill 1969.
Kaiike	<i>Acartia</i>	4	fagotrofia sobre <i>Chromatium</i> marcadas con ¹⁴ C	Matsuyama & Shirouzu, 1978
	<i>Oithona</i>	727		
	<i>Paracalanus</i>	13		
	<i>Brachionus</i>	1126		
Biétri Bay	<i>Acartia</i>	8	el análisis del su contenido indica su alimentación con bacterias fotosintéticas	Caumette <i>et al.</i> , 1983.
	<i>Brachionus</i>	170		
	Ciclopidos	6		
Belovod	<i>Daphnia</i>	122-190	migración siguiendo el "plate" bacteriano	Sorokin 1970.
	Copépodos	30-56	color rojo debido a la predación sobre bacterias fotosintéticas fagotrofia sobre <i>Chromatium</i> marcadas con ¹⁴ C	
Cisó	<i>Daphnia</i>	80-130	color rojo debido al contenido en hemoglobina 8,8% de <i>Chromatium</i> consumido por día (-0,092 d ⁻¹) ^b 6,6% de <i>Amoebobacter</i> consumido por día (-0,069 d ⁻¹) ^b	Massana <i>et al.</i> , 1994.
Crawford	<i>Daphnia</i>	15	0,3-1,6% de la presa consumido por hora equivalente a -0,003 -0,016 h ⁻¹)	Mazumber & Dickman 1989.
Devil's Hole	-	-	color rojo debido a la predación sobre bacterias fotosintéticas	Goehle & Storr 1978.

En el caso de *Daphnia* se ha descrito que puede llegar a consumir el 1,8 %·h⁻¹ de la biomasa de estos fotótrofos (Mazumber y Dickman, 1989), si bien este valor parece un poco excesivo. Otros autores (Gasol *et al.*, 1995) concluían que la

predación por parte de *Daphnia* podía ser importante en el declive de las poblaciones de *Cryptomonas*. No obstante, la presencia de *Oscillatoria*, que se da en nuestro caso y no en los mencionados anteriormente podría interferir el proceso de alimentación de *Daphnia* (Hartmann y Kunkel, 1991), y ha sido descrita como una de las causas de la desaparición de las poblaciones de *Daphnia* en otros lagos (Infante y Abella, 1985), lo que podría explicar la no aparición de este cladócer.

4.3.3.3.- Protozoos Ciliados

Los ciliados constituyen uno de los grupos de microorganismos más interesantes que se han estudiado en la Laguna de Arcas, aunque obviamente no a fondo dentro de este trabajo. Los aspectos más importantes se basan en la aparición de ciliados anaerobios en las aguas de la laguna ricas en sulfhídrico. Un estudio inicial, en el que participaron los directores de nuestro grupo de investigación, reveló la presencia de diversas especies de estos ciliados. De ellos algunos eran estrictamente anaerobios (Finlay *et al.*, 1991), alcanzando en algunos casos sus máximas densidades poblacionales (hasta 50 ind ml⁻¹) en las proximidades del sedimento, citándose como los más abundantes *Caenomorpha medusula*, *Lacrymaria elegans*, *Lacrymaria sapropelica* y *Lagynus* sp. Su distribución vertical no estaba relacionada con el perfil de sulfhídrico y en algunos casos su dieta incluía individuos de *Cryptomonas* sp, y otras bacterias anaerobias presentes en el hipolimnion o en la interfase agua-sedimento. Algunos ciliados no alcanzaban sus principales densidades en el hipolimnion anóxico, como *Coleps hirtus*, que se situaba por encima de la interfase bien alimentándose de *Cryptomonas* sp. o bien teniendo zoochlorellas simbiotas como se ha descrito en otros estudios (Esteve *et al.*, 1988, Gasol *et al.*, 1990; Finlay *et al.*, 1996); u otros como algunos scuticociliados bacterivoros o *Loxodes striatus* que alcanzaban sus máximas densidades en la interfase óxico-anóxica. Todos los ciliados anaerobios presentes en la laguna contenían al menos un tipo de bacteria endosimbionte, que mostraba la autofluorescencia de las bacterias metanógenas (Finlay *et al.*, 1991, 1993), aunque algunos mostraban otro tipo de simbiotas sin éstas características fluorescentes. Un estudio posterior (Esteban *et al.*, 1993), encontró hasta 14 especies de ciliados presentes en las aguas anóxicas de la laguna, explicando esa elevada diversidad en el hecho de que existían especies representantes de todos los tipos diferentes de alimentación en los ciliados, siendo estos los únicos consumidores fagotróficos tanto de los organismos que sedimentan como de los microorganismos procarióticos en hábitats anóxicos (Madoni, 1990; Fenchel y Finlay, 1995). Esteban y colaboradores (1993) proporcionan una lista de especies de ciliados encontrados en las aguas anóxicas de la Laguna de Arcas, algunos de los cuales descritos como nuevas especies, la cual resumimos en la tabla 4-14. Estos ciliados pertenecen a diversos grupos, que cubren la mayoría de los tipos tróficos.

Tabla 4.14.- Especies de protozoos ciliados encontrados en las aguas anóxicas de la Laguna de Arcas (Esteban *et al.*, 1993).Table 4.14.- Ciliated protozoa found in anoxic waters of Lake Arcas (Esteban *et al.*, 1993).

<p>Orden Haptorida</p> <p><i>Lacrymaria elegans</i> Engelmann <i>Lacrymaria sapropelica</i> Kahl</p>	<p>Orden Prostomatida</p> <p><i>Holophrya bicoronata</i> n. sp. <i>Prorodon corpulentissimum</i> n. sp.</p>
<p>Orden Heterotrichida</p> <p><i>Caenomorpha corlissi</i> Jankowski <i>Caenomorpha lata</i> Kahl <i>Metopus</i> sp.</p>	<p>Orden Scuticociliatida</p> <p><i>Cyclidium dilectissimum</i> n. sp. <i>Isocyclidium globosum</i> n. gen., n. sp. <i>Cristigera</i> sp.</p>
<p>Orden Odontostomatida</p> <p><i>Saprodinium difficile</i> n. sp. <i>Epalxella oligotricha</i> n. sp. <i>Epalxella spinosa</i> n. sp.</p>	<p>Orden Trichostomatida</p> <p><i>Plagiophyla nasuta</i> Stein</p>

La fagotrofia de los ciliados anaerobios de la Laguna de Arcas podría representar un nexo de unión entre los ciclos del carbono y el azufre. El carbono fijado por las bacterias fotosintéticas puede ser digerido en parte y fermentado por los ciliados, seguidamente, los metanógenos simbioses terminarían el proceso liberando ese carbono como metano. No se ha encontrado ningún otro tipo de predadores fagótrofos en las aguas anóxicas de la laguna, lo que resulta coherente con las observaciones de Fenchel y Finlay (1990) sobre la menor longitud de las cadenas tróficas anaerobias debido al reducido rendimiento energético del metabolismo anaerobio (Guhl *et al.*, 1996), lo que deriva en una menor tasa de crecimiento de las poblaciones de ciliados anaerobios en comparación con los aerobios a pesar de tener tasas de filtración similares (Massana *et al.*, 1994).

La predación por parte de flagelados y ciliados se ha descrito como una de las principales fuentes de mortalidad en el bacterioplancton (Porter *et al.*, 1985; Berninger *et al.*, 1991; Sherr *et al.*, 1992; Furhman y Noble, 1995), ya que éste acumula una buena parte de los nutrientes (C; N; P) disponibles en los sistemas acuáticos (Cole *et al.*, 1993), si bien trabajos limitados a sistemas anóxicos han demostrado que el impacto de la predación de los ciliados anaerobios sobre las poblaciones bacterianas puede ser insignificante (Massana y Pedrós-Alió, 1994b). Esta entrada de las bacterias en la cadena trófica ("microbial loop", Azam *et al.*, 1983) diversifica el papel de las bacterias en la estructura trófica de las comunidades acuáticas al compararlas con el patrón tradicional de las terrestres (Pedrós-Alió, 1989). En la Laguna de Arcas, las distintas especies de ciliados presentan determinadas preferencias en cuanto a su alimentación, aunque

no se ha podido demostrar que ninguna de las especies encontradas se alimente de *Chromatium weissei* (Guhl *et al.*, 1996), que constituye la mayor fuente potencial de alimento para los ciliados anaerobios. En este sentido, resulta interesante poner de manifiesto que Schulz y colaboradores (1990) encontraron que el ciliado anaeróbico *Trimyema* sólo era capaz de digerir unas pocas cepas específicas de *Chromatium*. En la Laguna de Arcas *Caenomorpha lata* basaría su dieta en bacterias heterótrofas grandes (< 4 µm) (Guhl *et al.*, 1996), ya que aunque anteriormente Finlay y colaboradores (1991) habían encontrado indicios de una posible predación sobre Cromatiaceas, esto no se pudo confirmar con seguridad. En cambio, en otras lagunas estratificadas (tabla 4-15), este ciliado se alimenta de la bacteria fotosintética *Thiopedia* sp (Guhl y Finlay, 1993), estando su distribución mediatizada por la de estas bacterias (Guhl y Finlay, 1994). *Holophrya bicornata* y *Prorodon* basan su alimentación en la Laguna de Arcas en la ingestión de *Cryptomonas* sp (Guhl *et al.*, 1996). En otros ciliados anaerobios no se observó la ingestión de estos organismos fotosintéticos (o a niveles muy pequeños), mientras que la ingestión de pequeñas bacterias, probablemente heterótrofos era mucho más frecuente. Por ello, estas bacterias, que podrían obtener sus requerimientos energéticos gracias al carbono fijado fotosintéticamente, sobre todo en la quimioclina, podrían ser una importante fuente de alimento para los ciliados anaerobios. Los ciliados aerobios como *Coleps hirtus* permanecen impasibles ante la presencia de Cromatiaceas, alimentándose preferentemente de *Cryptomonas* spp.. Los cálculos efectuados por Finlay y colaboradores (1991) suponían que el consumo de *Cryptomonas* spp. por parte de los ciliados anaerobios abarcaría el 13 % de la producción diaria de biomasa de *Cryptomonas* spp, lo que unido al consumo por parte de *Coleps* supone que la presión de predación que sufren estas criptomonadales en las capas microaeróbicas y anóxicas es muy grande. Por ello podríamos descartar que la menor presión de predación lleve a estas algas a formar sus poblaciones más densas en las capas microaeróbicas en lugar de otras profundidades de la laguna, aunque para otros autores (Gasol *et al.*, 1993) este podía ser un proceso que, junto con su buena adaptación a las condiciones metalimnéticas, podía explicar la formación de estas poblaciones metalimnéticas de *Cryptomonas*. El mismo tipo de cálculos apoyaría la hipótesis de que *Chromatium* sería sólo una fuente más de alimento caso de ser consumido por los ciliados, contribuyendo mucho más a la dieta de estos organismos las bacterias heterótrofas. En lo que respecta a la predación de *Oscillatoria ornata* por los ciliados no se detectó en ningún caso, aunque el consumo de cianobacterias de diversos tipos por ciliados pertenecientes a distintos grupos esta bien documentado (Dryen y Wright, 1987) en otras especies de estos microorganismos.

Tabla 4.15.- Algunos ejemplos de predación de ciliados sobre bacterias fotosintéticas (tomado de Van Gernerden y Mas, 1995).

Table 4.15.- Some examples of ciliated protozoa predation on photosynthetic bacteria (From Van Gernerden and Mas, 1995).

Lago	Predador	Abundancia ind l ⁻¹	Observaciones	Referencia
Faro	<i>Urostila sp.</i>	1mg pf l ⁻¹	vacuolas digestivas rojas	Sorokin & Donato 1975.
Cisó	<i>Trachelostyla Plagiopyla</i>	<2000	0,1% presa consumido por dia (-0,001 d ⁻¹)	Massana & Pedrós- Alió 1994 b
Arcas-2	<i>Metopus Caenomorpha Lacrymaria</i>	50000	6% presa consumido por dia (-0,062d ⁻¹) estimación teórica 0,4 g C·m ⁻² ·d ⁻¹	Finlay <i>et al.</i> , 1991.
Priest Pot	<i>Lagynus Caenomorpha</i>	10000	<i>Caenomorpha</i> sigue la distribución de su presa	Guhl & Finlay 1993.

4.3.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

El análisis de componentes principales de las variables físico-químicas y biológicas estudiadas pone de manifiesto que el paso de un ambiente oxidante en las aguas epilimnéticas a un ambiente reductor en las hipolimnéticas es el factor principal que gobierna tanto la composición química del agua como la estructura de la comunidad de microorganismos fotosintéticos. Este primer factor, que explica un 58 % de la varianza común, separa aquellas variables que alcanzan sus valores mayores en el epilimnion (la mayoría relacionadas con el estado de oxidación, como el oxígeno, nitrato, Eh y pH, u otras como la luz que disminuye con la profundidad), frente a las variables que aumentan en las aguas de la quimioclina e hipolimnion de la laguna, como el amonio, fósforo, concentraciones de microorganismos etc.. Ese factor no está relacionado totalmente con la profundidad, ya que el gradiente se hace máximo en la quimioclina y luego ya muy suave en el resto del hipolimnion.

Es un segundo factor, que aunque sólo explica un 9 % de la varianza, el que diferencia entre la zona de la quimioclina y el resto del hipolimnion anóxico, con una relación más directa con la profundidad. Así, mientras que en la parte negativa encontramos una mayor presencia de variables que alcanzan sus mayores valores en la quimioclina (las relacionadas con las densidades poblacionales de los microorganismos que allí viven), con valores positivos de ese factor encontraríamos las variables que aumentan considerablemente conforme nos acercamos al fondo del hipolimnion, como las concentraciones de nutrientes.

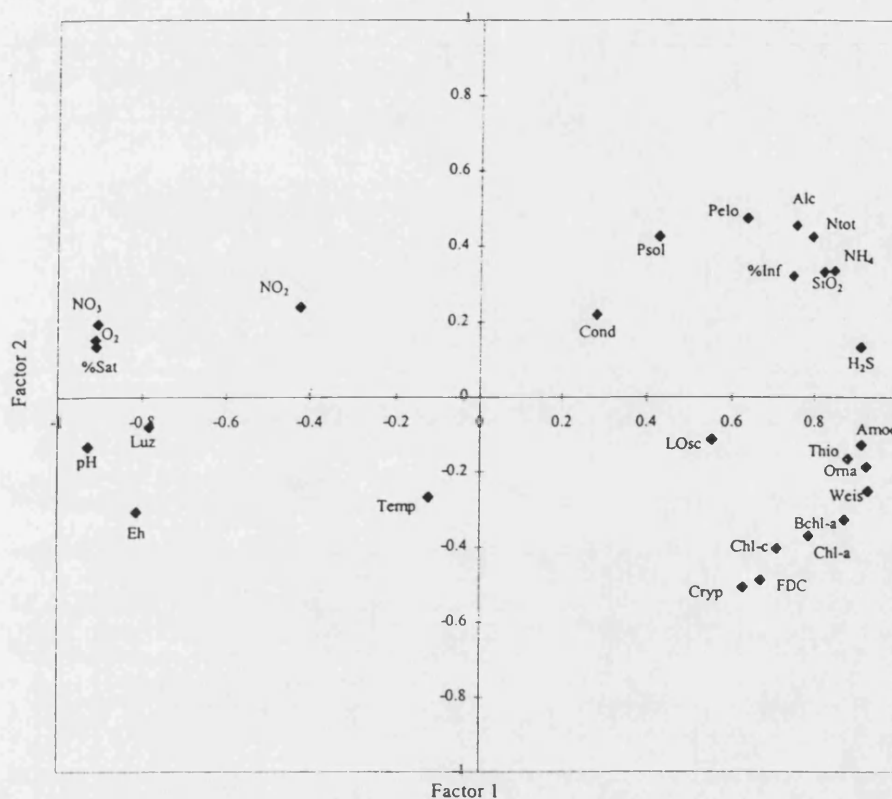


Figura 4.14.- Resultados del análisis de componentes principales (PCA) incluyendo las principales variables físico-químicas y biológicas estudiadas previa normalización. Las abreviaturas se encuentran tras el pie de esta figura.

Figure 4.14.- Results of the principal component analysis (PCA) including the main transformed physical, chemical and biological variables studied. Abbreviation code follows.

Weis - cell ml⁻¹ *Chromatium weissei*. **Orna** - fil ml⁻¹ *Oscillatoria ornata*. **Cryp** - cell ml⁻¹ *Cryptomonas* spp. **Thio** - cell ml⁻¹ *Thiocapsa* sp. **Amoc** - cell ml⁻¹ *Amoebobacter* sp. **Pelo** - cell ml⁻¹ *Pelodictyon clathratiforme*. **FDC** - Frequency of dividing cells *Chromatium weissei*. **%Inf** - percent of epibiotic infection in *Chromatium weissei*. **LOsc** - Length of *Oscillatoria ornata* filaments. **Chl-a** - Chlorophyll-*a*. **Chl-c** - Chlorophyll-*c*. **Bchl-a** - Bacteriochlorophyll-*a*. **NH₄** - Ammonia. **NO₃** - Nitrate. **NO₂** - Nitrite. **Ntot** - Total inorganic nitrogen. **Pso1** - Soluble reactive phosphorus. **SiO₂** - Soluble reactive silica. **H₂S** - Sulfide. **Alc** - Alkalinity. **O₂** - Oxygen (mg·l⁻¹). **%Sat** - Oxygen saturation. **Temp** - Temperature. **pH** - pH. **Eh** - Eh. **Luz** - Light intensity

Al situar las muestras utilizadas en el análisis de componentes principales (figura 4-15), estas quedan perfectamente separadas por el primer factor en función de si son muestras procedentes de aguas de la zona óxica de la laguna, ya sean correspondientes a cualquier punto del perfil vertical durante el periodo de mezcla como a la parte superior oxigenada durante el periodo de estratificación, o si proceden de la zona anóxica. La discriminación dada por el segundo factor, que separa las variables entre aquellas más propias de la quimioclina respecto a

las que alcanzan mayores valores en el hipolimnion profundo queda mejor reflejada al observar la distribución de las muestras, que ilustra claramente como ese factor 2 separa las muestras correspondientes a esas dos zonas, repartiéndose dichas muestras a lo largo de ese eje formando un gradiente. Este factor también está relacionado con la abundancia de nutrientes inorgánicos, que aparecen con un valor positivo en ese segundo eje.

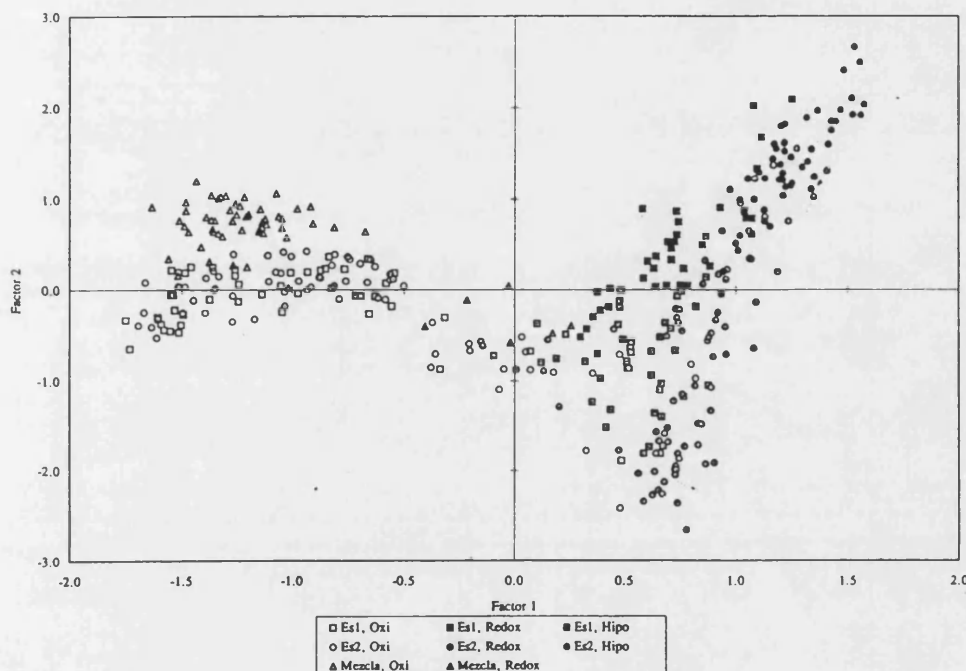


Figura 4.15- Situación en el espacio determinado por los dos primeros factores de las muestras utilizadas en el análisis de componentes principales, diferenciando entre los periodos correspondientes a la primera (Es1) y segunda mitad de la estratificación (Es2) y al periodo de mezcla (Mezcla), y a su vez separando las muestras de la zona óxica (Oxi), de la redoxclina (Redox) y del hipolimnion (Hipo) de la Laguna de Arcas.

Figure 4.15.- Situation in the space determined by the first two factors of the samples used in the principal component analysis (PCA), differentiating those of the first (Es1) and the second part (Es2) of the stratification period as well as those of the mixing period (Mezcla). Samples from the oxic zone (Oxi), the redoxcline (Redox) and the anoxic hipolimnion (Hipo) are also distinguished by the different colours filling the figures.

Aunque el resultado de este análisis resultaba predecible, con él se confirma que el gradiente de óxido-reducción que se establece entre las aguas superficiales y las del fondo, y que se agudiza en la quimioclina, resulta determinante en la distribución de los microorganismos estudiados, existiendo además un gradiente en profundidad dentro de la zona anóxica, positivo en cuanto a las concentraciones de nutrientes y de microorganismos que, como *Pelodictyon* son

más abundantes en aguas profundas, y negativo en cuanto a la abundancia de los organismos fotosintéticos que se distribuyen en la quimioclina, que constituye un segundo factor que resulta explicativo de una parte de la variabilidad de las muestras de la zona anóxica.

CAPÍTULO 5

LUZ, PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS Y PRODUCCIÓN PRIMARIA

5.1.- INTRODUCCIÓN

Los estudios de campo sobre poblaciones fotosintéticas en sus condiciones ambientales naturales son importantes para un mejor conocimiento del funcionamiento de los ecosistemas acuáticos. En este capítulo se estudia la contribución de los organismos fotosintéticos que viven en las capas microaerobias y anaerobias de la Laguna de Arcas a la producción fotosintética total que tiene lugar en la misma, que puede ser de vital importancia en el mantenimiento de la cadena trófica en la zona anaerobia de la laguna, relacionándola con las características de la luz que les llega y las adaptaciones de los aparatos fotosintéticos de los microorganismos para captarla. Debe hacerse aquí la salvedad de que nuestro estudio no intenta abarcar toda la producción primaria, sino que se restringe casi únicamente al estudio puntual del proceso de asimilación de carbono inorgánico, concepto que no es necesariamente equivalente al de producción primaria (Flynn, 1988) pero con el que si que está íntimamente relacionado, por lo que en ocasiones ambas expresiones se utilizarán indistintamente.

Desde que en 1952 Steeman-Nielsen presentó el método del ^{14}C para la medida de la producción primaria en ecosistemas acuáticos, que se ha revelado como el mejor para este tipo de estudios (Peterson, 1980), se han venido realizando una serie de trabajos para evaluar la importancia de la fotoasimilación que tiene lugar en las capas circundantes a la interfase óxico-anóxica de los lagos estratificados. Lyalikova (1957) estudió por primera vez la asimilación de carbono inorgánico por bacterias fotosintéticas, concretamente en las poblaciones de *Chromatium* del Lago Belovod. Hasta que Biebl y Pfennig (1979) hicieron su revisión sobre los estudios de este tipo realizados hasta entonces, 18 eran los lagos estratificados en los que se había estudiado la fotoasimilación debida a los organismos que viven en torno a la interfase óxico-anóxica. Desde entonces han sido pocos los estudios que prestaran atención a la importancia de la contribución de estos microorganismos a la producción primaria total en los lagos, por lo que su contribución cuantitativa a la fijación de carbono no es todavía muy bien conocida (Pedrós-Alió, 1989).

5.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1.- MEDIDA DE LA RADIACIÓN LUMINOSA

5.2.1.1.- Medida de la penetración luminosa en la laguna

Para la medida de la penetración luminosa en la laguna se utilizaron sensores subacuáticos (Jewson *et al.*, 1984) que detectan la radiación fotosintéticamente activa (PAR), conectados a un medidor capaz de almacenar datos (Li-Cor Inc., 1988). Se utilizaron dos tipos de sensores, uno plano y otro esférico, usándose habitualmente el sensor plano en todos los muestreos y esporádicamente el sensor esférico. El sensor de tipo plano (LI-COR modelo LI-192SA) permite medir la densidad de flujo fotónico por unidad de área al tratarse de un sensor corrector de coseno que corrige las variaciones debidas al ángulo de incidencia, en él la detección se realiza por un detector fotovoltaico de silicio de alta estabilidad. El sensor esférico (LI-COR modelo LI-193SA) permite medir específicamente la tasa de afluencia del flujo de fotones fotosintéticamente activos, la cual se define como los fotones de longitud de onda comprendida entre 400 y 700 nm que inciden por unidad de tiempo en la superficie de una esfera dividido por el área transeccional de dicha esfera, captando la radiación fotosintéticamente activa proveniente de todas las direcciones, ya que este sensor dispone de un difusor acrílico, aunque la existencia de la base del sensor provoca una pequeña merma en la respuesta angular (Li-Cor Inc., 1986). El sensor elegido para realizar la lectura se une por medio de un cable subacuático modelo 2222UWB a un medidor multicanal capaz de almacenar datos (LI-COR modelo LI-1000), del cual se obtiene la medida de densidad de flujo fotónico (en el caso del sensor plano). Por tanto, lo medido con ambos sensores no es lo mismo, ya que mientras el sensor plano mide la radiación fotosintéticamente activa incidente al sensor desde arriba, la célula esférica detecta también la radiación difusa ya que capta la proveniente de todos los ángulos. El error total (suma de los errores debidos al sistema de medida) es del 7,6 %. Las unidades de medida utilizadas han sido los $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, siendo el E (Einstein) un mol de fotones, ya que son las unidades con mayor significación biológica cuando hablamos de luz disponible para los organismos fotosintéticos.

También, de forma adicional, se realizó la medida de la profundidad a la cual dejaba de ser visible el disco de Secchi, el cual consta de un disco de PVC cuya parte superior esta pintada de blanco y que incorpora un contrapeso en su parte central inferior para facilitar su hundimiento.

5.2.1.2.- Medida de la penetración de la luz de distintas calidades espectrales en el agua

La medida de la penetración de la luz diferenciando la longitud de onda de la misma se realizó con un espectro-radiometro sumergible modelo LI-1800UW (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebr., U.S.A.), propiedad de la Universitat de Girona, con la colaboración de investigadores de dicha Universidad. Este aparato permite conocer la composición espectral de la luz que llega a una determinada profundidad, ya que mide la energía radiante que incide por unidad de superficie, de tiempo, y de longitud de onda, con una resolución de 2 nm. El aparato consta de dos unidades, una sumergible que va unida a un terminal portátil por medio de un cable de conexión. La unidad sumergible contiene, además de las baterías y un microprocesador, un sistema de detección de luz, que comprende un colector translúcido semiesférico con corrección de coseno, un sistema de filtros, un monocromador y un detector de fotodiodos.

Los perfiles de penetración vertical de la luz de distintas longitudes de onda en la laguna se realizaron en campañas de muestreo correspondientes al año 1996, ya que hasta entonces no se pudo acceder a un aparato que permitiera su medida. Para que la información obtenida de estas campañas fuera más completa se realizó un muestreo planteado con la misma estructura que los realizados a lo largo del periodo 1989-91, añadiendo el recuento del fitoplancton..

Las medidas se realizaron en momentos en los cuales las condiciones de iluminación no fuesen cambiantes, ya sea porque estaba bien despejado y no aparecía la interferencia de las nubes, o bien porque el cielo estaba totalmente nublado, ya que la interferencia de las nubes únicamente merma la intensidad de luz incidente pero no varía substancialmente la composición espectral de la luz (Vila, 1996). La medida se realizaba en las horas próximas al mediodía, en las cuales la incidencia de los rayos del sol era más vertical. El aparato se sumergía desde el lado en el que no había sombra de la barca hasta la profundidad mayor a la que se deseaba medir, se desplazaba lateralmente para evitar la distorsión debida a su penetración, y se realizaba la medida de la penetración de las distintas longitudes de onda entre 300 y 850 nm, medida cada dos nanometros, tras lo cual se subía hasta la siguiente profundidad, realizando el mismo proceso hasta registrar las medidas de todas las profundidades deseadas

5.2.2.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

El estudio de los métodos para la extracción, identificación y cuantificación de pigmentos fotosintéticos ha dado lugar a un gran número de trabajos, siendo amplia la bibliografía existente al respecto. Ello nos permite elegir los métodos más adecuados en función de los objetivos a cubrir y del esfuerzo que se pueda

dedicar a la determinación de los pigmentos fotosintéticos sin detraer dedicación a otros aspectos del trabajo en su conjunto. De esta manera se eligieron los métodos a aplicar en el presente estudio, ya que si bien existen otros más sensibles y/o laboriosos, la información obtenida en este trabajo es la necesaria para cubrir los objetivos, resultando suficientemente precisa para los mismos. Siendo conscientes de las limitaciones de los métodos usados, estos eran los mejores que se podían aplicar en las condiciones de disponibilidad de tiempo y material durante la realización del trabajo.

5.2.2.1.- Extracción y medida de los pigmentos fotosintéticos

Para la determinación de los pigmentos fotosintéticos se tomaban volúmenes de hasta un litro de agua de cada profundidad y se recogían en botellas de polietileno, situándose rápidamente en la oscuridad y refrigeradas al depositarlas en neveras de campo que contenían bloques refrigerantes. A la llegada al laboratorio, se filtraba un volumen conocido de la muestra a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/F) de 47 mm de diámetro, usualmente el volumen filtrado era el máximo posible sin que se obturase el filtro. Una vez filtrada la muestra, el filtro se depositaba en un tubo de vidrio con tapón hermético protegido de la luz con una cubierta de papel aluminio, el cual contenía 5 ml de una mezcla 1:1 de acetona 90 % (v/v) con dimetilsulfóxido (Shoaf y Lium, 1976; Burnison, 1980). La extracción de los pigmentos solubles en el solvente se realizaba durante 24 horas en un congelador (-20°C), si bien dicho proceso puede también realizarse a temperatura ambiente durante 4 horas. Finalizado el proceso de extracción, los filtros se retiraban de los tubos y estos se centrifugaban a 3000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C, de forma que se sedimentaba cualquier resto particulado. A continuación, se tomaba una alícuota del sobrenadante y se depositaba en una cubeta de espectrofotómetro de cuarzo de 1 cm de paso óptico, con tapón para evitar evaporaciones en el solvente que redundaran en la concentración de la muestra, determinándose la absorbencia del extracto entre 350 y 850 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7. Las medidas de absorbencia, obtenidas cada 0,5 nm en el intervalo antedicho, se almacenaban informáticamente utilizando el programa Data-Capture V.2.3 (Beckman) instalado en un ordenador portátil acoplado al espectrofotómetro por medio de un dispositivo de salida, obteniéndose además una gráfica mediante impresora del espectro de absorción del extracto. Para discernir los picos de absorción correspondientes a los diferentes pigmentos fotosintéticos resultó de gran utilidad la utilización de la primera y segunda derivada (Faust y Norris, 1985), que separaban los picos permitiendo su diferenciación, lo cual fue especialmente necesario para asegurar que el pico de clorofila *a* correspondía realmente a este pigmento y no a bacterioclorofilas de Clorobiaceas. Esto mismo se utilizó también en la determinación de los pigmentos *in vivo*.

De la misma manera se procedía para obtener los extractos acetónicos (acetona 90 %) de los pigmentos de las distintas especies de organismos fotosintéticos

obtenidos en cultivos de laboratorio. Para realizar la separación de los carotenos, el extracto acetónico se mezclaba con éter de petróleo, repartiéndose los pigmentos liposolubles en dos fracciones, la clorofilica, que quedaba en la acetona, y los carotenos, que quedaban en el éter de petróleo. Recuperando esta última fracción se registraba su espectro de absorción para determinar los carotenoides que poseían cada una de las especies de bacterias fotosintéticas.

En 1996 se realizó la determinación de los pigmentos fotosintéticos en muestras de la laguna utilizando la técnica de HPLC, siguiendo el procedimiento descrito por Borrego (1996), únicamente para confirmar la presencia de los pigmentos principales en estas muestras.

5.2.2.2.- Cálculo de las concentraciones de pigmentos

Los ficheros informáticos que contenían los datos de absorción de los extractos se transformaban a un formato utilizable en el programa Lotus, diseñándose una hoja de cálculo que permitiera, de forma general, utilizar los datos contenidos en dichos ficheros transformados para calcular directamente las concentraciones de los pigmentos y las relaciones entre los mismos. Para ello se utilizaron las relaciones que se detallan a continuación, las cuales, convenientemente introducidas en la hoja de cálculo, permitían obtener los valores de los parámetros deseados.

Para la determinación de las clorofilas algales se utilizó el método tricromático (Jeffrey y Humphrey, 1975), que permite calcular la concentración de las clorofilas *a*, *b* y *c*, el cual resulta especialmente apropiado ya que considera la influencia de las colas de los picos de absorción de unas clorofilas sobre los de otras. Las fórmulas utilizadas, cuyos valores de clorofilas se expresan en $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, utilizan valores de absorbencia corregidos respecto a la absorbencia a 830 nm para minimizar el efecto de la turbidez, y son las siguientes:

$$\text{Clor } a = (11,85 \cdot A_{665} - 1,54 \cdot A_{645} - 0,08 \cdot A_{630}) \cdot v / V \cdot z$$

$$\text{Clor } b = (21,03 \cdot A_{645} - 5,43 \cdot A_{665} - 2,66 \cdot A_{630}) \cdot v / V \cdot z$$

$$\text{Clor } c = (24,52 \cdot A_{630} - 1,67 \cdot A_{665} - 7,60 \cdot A_{645}) \cdot v / V \cdot z$$

donde *v* es el volumen de solvente de extracción (5 ml en nuestro caso), *V* es el volumen de muestra filtrado en litros y *z* es el paso óptico de la cubeta en cm (en este estudio se emplearon cubetas de 1 cm). La corrección de la turbidez se realizaba a 830 nm y no a 750 nm debido a la presencia en muchas de las muestras de bacterioclorofila *a*, que en extracto acetónico tiene un máximo de absorción a 772 nm.

De entre las clorofilas bacterianas, tan sólo se calculó la bacterioclorofila a , la cual corresponde a las poblaciones de Cromatiaceas, las otras bacterioclorofilas correspondientes a Clorobiaceas eran prácticamente despreciables dada la reducida densidad poblacional de estas bacterias y sólo podrían cuantificarse de forma rutinaria con fiabilidad utilizando técnicas de HPLC, aunque esa tecnología no estaba disponible en nuestro laboratorio en el momento del trabajo de campo. Estas técnicas han sido muy mejoradas en los últimos años para la determinación de pigmentos fotosintéticos algales y bacterianos (Mantoura y Llewellyn, 1983; Korthals y Steenbergen, 1985; Sartory, 1985; Hurley y Watras, 1991; Millie *et al.*, 1993; Borrego, 1996). En consecuencia, no se utilizó el método separativo descrito por Stal y colaboradores (1984), ni tampoco se utilizaron las fórmulas de Caraco y Puccoon (1986), útiles para la mezcla de clorofila a y bacterioclorofilas d y e , en el cálculo de la concentración de clorofila a , ya que prácticamente toda la absorbencia a 665 nm se debía a las clorofilas algales. En ese caso, la utilización del método tricromático para la determinación de la clorofila a da resultados similares a los de HPLC (Murray *et al.*, 1986, Webb *et al.*, 1992), ya que las diferencias principales se dan debido a la presencia de distintos alómeros de la clorofila a , consecuencia de la sucesión del fitoplancton (Meyns *et al.*, 1994), un proceso que no se da en las poblaciones de la interfase. La fórmula usada para el cálculo de la bacterioclorofila a (Takahashi y Ichimura, 1968) es la siguiente:

$$B_{clor a} = 25,2 \cdot A_{772} \cdot v / V \cdot z$$

expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, siendo las abreviaturas usadas las mismas que en las anteriores fórmulas y corrigiendo también la absorbencia para la turbidez (A_{830}).

5.2.2.3.- Espectros de absorción *in vivo*

Mediante ésta determinación no se pretendía obtener medidas cuantitativas, sino evaluar cualitativamente la capacidad de captación de radiación fotosintéticamente activa de los organismos contenidos en la muestra. El espectro de absorción *in vivo* se determinó tanto en los cultivos de las especies fotosintéticas aisladas de la laguna como directamente en muestras de agua de la misma. Para ello, la muestra (de agua o de cultivo) se filtraba a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F de 2,5 cm de diámetro, usándose un volumen suficiente para colorear el filtro (Trüper y Yentsch, 1967). El filtro húmedo se adhería al portacubetas del espectrofotómetro de manera que se interpusiera en la trayectoria del haz luminoso, determinándose la absorbencia entre 350 y 850 nm o entre 400 y 900 nm, dependiendo de la composición pigmentaria del cultivo o de la muestra así tratados, frente a un blanco formado por un filtro del mismo tipo humedecido sin contener ningún tipo de muestra. Como la muestra no contenía partículas minerales u orgánicas en suspensión a excepción de los propios microorganismos, no era necesario efectuar una corrección del blanco

debida a la interferencia de estas partículas. Los valores de absorbencia se almacenaban informáticamente mediante el sistema descrito en el apartado anterior, obteniéndose así mismo una gráfica por impresora de cada uno de los espectros.

5.2.3. ESTIMA DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA

5.2.3.1.- Preparación del material y procedimiento experimental general.

Para realizar las experiencias de campo se diseñó un procedimiento que permitiera, con el uso de material adecuado, realizar experimentos complejos minimizando las interferencias. El método elegido estaba basado en la estima de la asimilación del CO_2 o HCO_3^- procedente del $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, determinando la radioactividad incorporada en las muestras.

En la mayoría de los experimentos de campo las muestras se incubaban a distintas profundidades del lago inmediatamente después de preparadas, para lo cual se construyó un sistema que permitiera realizar este proceso (figuras 5-1 y 5-2). Se construyó un "colgador" flotante, consistente en cuatro flotadores bicónicos huecos de fibra de vidrio bañada en poliéster, que servían de soporte a una barra transversal de acero inoxidable que poseía una serie de ganchos donde se podían sujetar los cables necesarios para la suspensión de las muestras a distintas profundidades. Para colocar las botellas se fabricaron unos cilindros de metacrilato transparente, de 85 mm de diámetro, huecos, y de 0'5 ó 1 metro de longitud, en los que se practicaron longitudinalmente (y separados cada 10 cm) orificios a los que se adaptaba el tapón de las botellas de incubación. Cada 10 cm se practicaron 4 orificios en ángulos de 90° y formando un ángulo de 45° con los inmediatamente superiores o inferiores, para evitar el efecto de sombra. De esta manera se podían incubar hasta 4 botellas a cada profundidad y con sólo 10 cm de separación respecto a otra muestra (si se deseaba), lo cual resultaba de gran utilidad para determinar la asimilación de carbono inorgánico en un sistema altamente estratificado, tanto respecto a las características físico-químicas del agua e intensidad luminosa en cada profundidad como, sobre todo, en cuanto a la zonación de los microorganismos a lo largo de los gradientes. El uso de múltiples cilindros, que se situaban a la profundidad deseada suspendiéndolos desde el colgador, con cables de acero plastificados previamente medidos, permitía realizar simultáneamente experiencias complejas que maximizaban el aprovechamiento del tiempo para hacer más comparables las diferentes incubaciones.

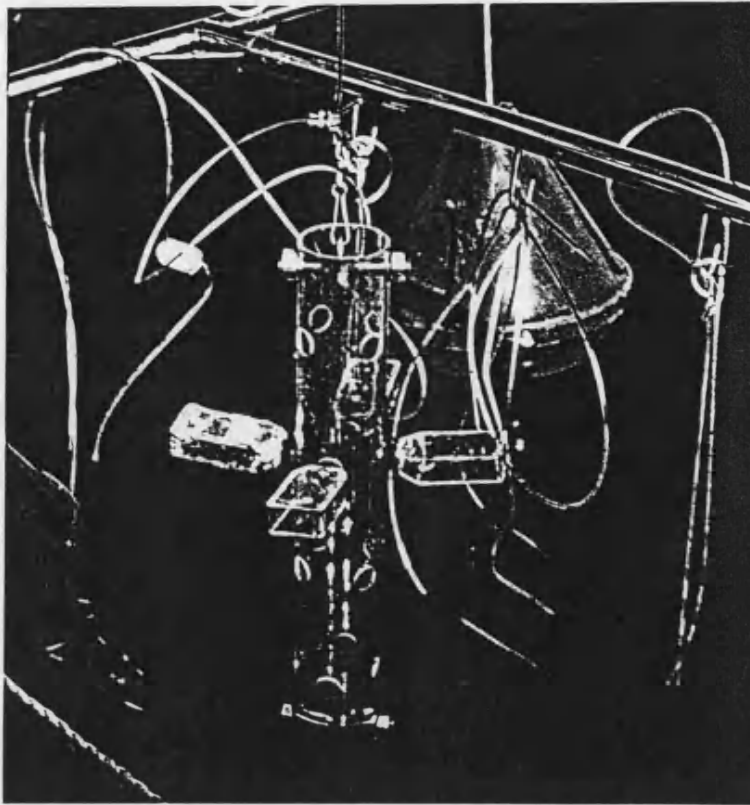


Figura 5 1- Sistema utilizado para la colocación de las muestras a la profundidad de incubación en los experimentos de fotoasimilación *in situ*. Las botellas de incubación se podían situar cada 10 cm evitando la sombra de las botellas superiores.

Figura 5 1- Device system used in the *in situ* photoassimilation experiments to place samples at the desired depth for incubation. Incubation bottles can be situated every 10 cm, avoiding shading of the overlying bottles.

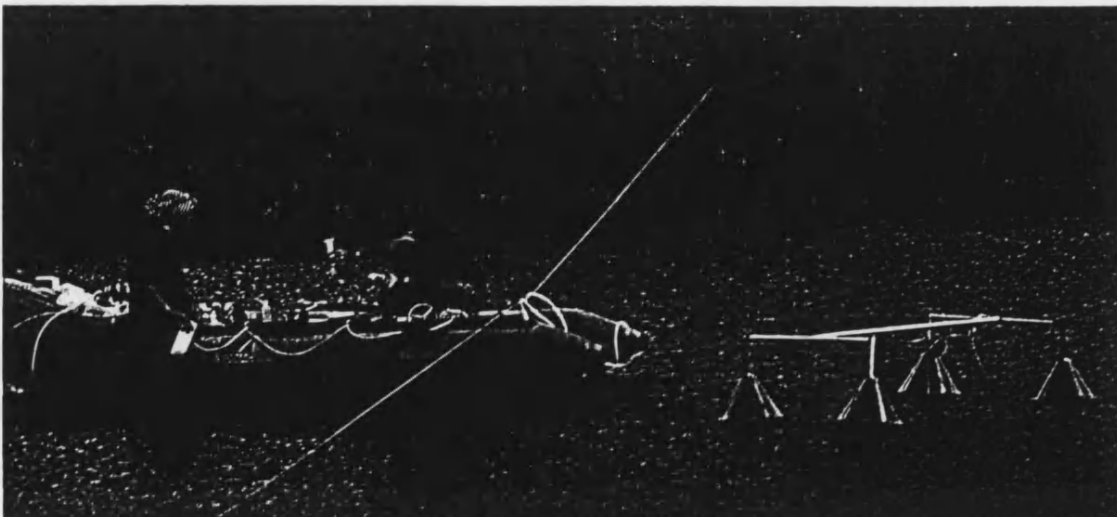


Figura 5 2- Fotografía que muestra la embarcación desde donde se preparan los experimentos de fotoasimilación *in situ*. Junto a la barca puede verse el soporte flotante utilizado para la colocación de las muestras a las profundidades de incubación

Figura 5.2- Photograph showing the boat in which the *in situ* photoassimilation experiments were prepared. Next to the boat is the floating hanger used for placing samples at the desired depth for incubation.

Las muestras se tomaban utilizando el sistema de muestreo fino indicado en los capítulos anteriores. La alícuota que se iba a incubar se introducía en una botella transparente (en lo sucesivo “botella blanca”) tipo “Falcon” de material plástico (Nunclon®, InterMed), de 60 ml de capacidad y 25 cm² de área total. Las mismas botellas, recubiertas por una doble capa de papel de aluminio y con sus tapones oscurecidos, a las que denominamos como botellas negras, eran utilizadas para determinar la asimilación en la oscuridad. El llenado de las botellas se realizaba dejando fluir agua dentro de las mismas de manera que se evitara el burbujeo, dejándose reemplazar un par de veces el contenido. Las botellas previamente se introducían en unos saquitos con cierre hermético contruidos en una tela totalmente opaca (Foscurit®), de manera que la muestra recién tomada para su incubación se preservaba de la luz, ya que al tratarse de muestras procedentes de diversas profundidades del lago la incidencia de un exceso de luz podría provocar alteraciones en los organismos. Si había que extraer alguna otra muestra para incubarla simultáneamente, las botellas conteniendo la muestra anterior se refrigeraban en una nevera de campo conteniendo bloques acumuladores de frío, aunque normalmente el lapso de tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su incubación era de unos pocos minutos, excepto cuando se añadían inhibidores como el DCMU o el N-Serve, en cuyo caso se preincubaban durante 20-30 minutos con estas sustancias antes de proceder a añadir el bicarbonato marcado (Steenbergen y Van den Hoven, 1990). A cada botella de las que se iba a incubar se le añadía la cantidad necesaria de NaH¹⁴CO₃ para alcanzar la actividad deseada del material radioactivo (expresada en µCi). Una vez añadido el bicarbonato, se retiraba la protección del saquito y rápidamente se situaba la botella en la profundidad deseada. Transcurrido el tiempo de incubación, se extraía el cilindro portabotellas, introduciendo inmediatamente las botellas en los saquitos de foscurit y rápidamente se añadía formol a una concentración suficiente para detener la actividad los organismos y con ello dar por terminada la asimilación de carbono. El gran número de muestras a procesar hacía imposible su filtrado inmediato, por lo cual se realizaron las comprobaciones pertinentes para confirmar que la conservación con formol no interfería en la determinación de la asimilación. De esta manera se podían guardar las muestras para su procesado inmediato nada más llegar al laboratorio.

Ya en el laboratorio se procedía al filtrado de las muestras en una cámara extractora de gases. Para ello se utilizaba un multifiltrador con 10 embudos acoplado a una bomba millipore, en el cual se podían recoger los volúmenes filtrados. Los filtros utilizados dependían de la experiencia, pero normalmente se utilizaban filtros de fibra de vidrio GF/F o filtros de policarbonato de 25 mm de diámetro y 0,2 µm de tamaño de poro. El volumen de muestra a filtrar dependía de la concentración celular para evitar la obturación del filtro, oscilando entre los 10 y 30 ml, realizándose el filtrado por duplicado de la muestra previamente homogeneizada. Una vez pasado el volumen elegido el embudo se enjuagaba dos veces con agua destilada estéril, a continuación se lavaba otras dos veces con

HCl 1N para eliminar el carbono marcado no asimilado (al desplazarse el equilibrio de los carbonatos hacia la forma de CO₂ en la que es fácilmente liberado) y por último se volvía a lavar dos veces con agua destilada. Los filtros se situaban de forma ordenada sobre un papel de filtro y se mantenían durante 24 horas en la campana de gases para su secado. Una vez secos, se introducían en viales de centelleo, se añadía el coctel de centelleo compuesto por diversos solventes orgánicos y se determinaba la radioactividad incorporada mediante un contador de centelleo LKB.

5.2.3.2.- Diseño de los experimentos de producción.

Estas experiencias no se plantearon con el objetivo de realizar balances completos, ya que ello hubiera exigido la realización de los experimentos con un planteamiento distinto. En lugar de ello, se optó por realizar un menor número de ensayos, pero más complejos, de forma que pudieran proporcionar información sobre aspectos concretos de la productividad primaria del ecosistema. Antes de efectuar los diferentes experimentos se realizaban una serie de ensayos previos, con el objeto de determinar las condiciones experimentales más adecuadas, como la actividad de NaH¹⁴CO₃ a añadir y el tiempo de incubación, así como la influencia que en los resultados podían tener otros aspectos de la metodología, como la adición de formol o HgCl₂ para detener la actividad biológica o el efecto de los disolventes de los inhibidores usados (etanol en el caso de DCMU y acetona en el del N-Serve). Con ello se descartaron efectos indeseables y se optimizaban las condiciones del ensayo, con tiempos de incubación de entre 1 y 2 horas y añadiendo una actividad exacta previamente cuantificada de NaH¹⁴CO₃ por botella, que normalmente se añadía a una concentración final de 0,16 µCi ml⁻¹. Esta cantidad de NaH¹⁴CO₃ era adecuada para realizar las incubaciones, como se demostró en los ensayos realizados previamente, en los cuales se incubaron muestras procedentes de la profundidad en la que se encontraba la máxima densidad de *Chromatium* distintas actividades de NaH¹⁴CO₃ por botella (tabla 5.1).

Tabla 5.1. - Incorporación de ¹⁴C en función de la actividad del NaH¹⁴CO₃ añadido por botella.
Tabla 5.1.- ¹⁴C uptake with different additions of NaH¹⁴CO₃ activity to each bottle.

	media dpm asimiladas por botella		
	0,08 µCi·ml ⁻¹	0,16 µCi·ml ⁻¹	0,32 µCi·ml ⁻¹
BOTELLAS BLANCAS	11516	34442	35198
BOTELLAS NEGRAS	6218	15055	16416

Previamente a la incubación se realizaba un perfil de penetración de la luz, y durante la misma se medía la radiación incidente cada minuto, de manera que se

podía estimar la radiación luminosa total recibida por la muestra durante el periodo de incubación. Para conocer la temperatura de incubación tan sólo era necesario realizar un perfil vertical de temperatura previo a la experiencia, ya que las variaciones de temperatura del agua a lo largo del experimento eran despreciables. La incubación se realizaba por regla general con dos botellas transparentes y dos opacas por cada profundidad, aunque cuando era necesario el uso de más botellas para una misma profundidad (p.ej. cuando se usaban inhibidores), se situaban todas las botellas transparentes de una misma muestra en el mismo cilindro y las opacas en un cilindro contiguo. Se diseñaron diversas experiencias, más o menos complejas, que agruparemos aquí en función de como y cuando se realizaron.

- **Experiencia 1.-** Se realizó entre los días 13 y 14 de octubre de 1989, y corresponde a una situación en la cual el lago ya ha comenzado su proceso de mezcla, aunque esta todavía no se ha completado. Ello provoca una desestabilización de las poblaciones de la interfase, siendo su estratificación menos acusada y pudiendo producirse una distribución de la producción primaria a lo largo del perfil vertical. En este experimento se incubaron, durante una hora y media, muestras epi- e hipolimnéticas, así como de la interfase, a las propias profundidades o en algún caso a una profundidad menor para determinar el efecto de la limitación de la luz (fotoasimilación potencial). Además se incubaron botellas opacas para determinar la asimilación oscura. El diseño concreto se puede observar en la tabla 5-2.

Tabla 5.2.- Profundidades de las muestras y botellas incubadas a cada una de ellas en la experiencia 1.

Table 5.2.- Sample depths and bottles incubated at each depth, experiment 1.

PROFUND. MUESTRA (m)	PROFUND. INCUBACIÓN (m)	BOTELLAS BLANCAS (n°)	BOTELLAS NEGRAS (n°)
0,5	0,5	2	2
3	3	2	2
8	8	2	2
10,8	10,8	2	2
11,1	11,1	2	2
11,5	11,5	2	2
11,5	10,8	2	2
12	12	2	2
12,9	12,9	2	2

- **Experiencia 2.-** Realizada el 17 de enero de 1990. Se trataba de evaluar la importancia de la producción invernal, en época de mezcla completa del lago, para compararla con la que se da en periodos de estratificación. Para ello las botellas (tanto las transparentes como las opacas) se incubaron en el lago a las

profundidades de procedencia de las muestras, que en este caso fueron 0,1; 0,5; 3; 7,5 y 12 metros, durante 2 horas. En este caso no se utilizó DCMU ya que la total mezcla del lago impide la existencia de zonas anóxicas en las que pudieran desarrollarse poblaciones de organismos capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica.

- **Experiencia 3.-** En este caso se realizó, entre el 2 y 3 de septiembre de 1991, una combinación de anteriores experiencias. Por un lado se incubaron muestras de la zona mezclada de la laguna, correspondientes a 0,5 y 7 metros, a sus correspondientes profundidades. Obviamente no se uso el inhibidor del fotosistema II DCMU por tratarse de muestras bien oxigenadas carentes de fotótrofos anoxigénicos. Por otro lado se incubaron muestras correspondientes a 8,5 m (justo por encima de la interfase), 8,7 m (máxima densidad de *Oscillatoria ornata*) y 8,9 m (máxima densidad de *Chromatium*), realizándose una incubación adicional de muestras procedentes del "plate" bacteriano (8,9 m) a una profundidad por encima de las densas poblaciones fotosintéticas de la interfase (8,6 m).

- **Experiencia 4.-** Se realizó entre los días 29 y 30 de septiembre de 1991. Se incubaron muestras de distintas profundidades en la misma profundidad de procedencia. En este caso se ensayó un mayor número de profundidades, prestando especial atención a la interfase óxico-anóxica y a su zona verticalmente contigua. Como novedad adicional respecto a las anteriores experiencias se incubaron botellas opacas adicionales conteniendo nitrapirina (N-Serve), que inhibe los procesos de nitrificación biológica que son bastante importantes en estas interfases (Hall, 1984, Hall y Jeffries, 1984). El diseño de la experiencia se resume en la siguiente tabla:

Tabla 5.3.- Profundidades de procedencia de las muestras y botellas incubadas a cada una de ellas, con o sin adición de inhibidores, en la experiencia 4.

Table 5.3.- Sample depths and bottles incubated at each depth, with or without inhibitors, in experiment 4.

PROFUNDIDAD MUESTRA (m)	PROFUND. INCUBACIÓN	BOTELLAS BLANCAS	BOT. BLANCA + DCMU	BOTELLAS NEGRAS	BOTELLAS NITRAPIRINA
0,5	0,5	2	0	2	0
3	3	2	0	2	0
7	7	2	0	2	0
9,1	9,1	2	0	1	1
9,2	9,2	2	1	1	1
9,3	9,3	2	1	1	1
9,4	9,4	2	1	1	1
9,5	9,5	2	1	1	1
9,8	9,8	2	1	1	1

- **Experiencia 5.-** Realizada casi en las mismas fechas que la anterior (1 de octubre, 1991), consistía en tomar muestras correspondientes a la profundidad de máxima densidad de procariotas fotosintéticos (9,2 m) e incubarlas a distintas profundidades. Así, estas muestras se incubaron a 2,5; 5; 7; 8,5; 8,8; 9; 9,2; 9,4; 9,6 y 9,8, esto es, tanto por encima como por debajo de su lugar de procedencia. Esta experiencia se llevó a cabo en un periodo en el que la estratificación fisico-química y de los organismos aún se mantenía bastante estable, mientras que el gradiente térmico en el perfil vertical ya se ha visto muy reducido, con lo cual las diferencias en los resultados obtenidos en las distintas profundidades podrán atribuirse principalmente a las diferencias de luz disponible (parámetro que interesaba estudiar), quedando minimizado el efecto de aumento de tasa metabólica por la temperatura.

5.2.3.3.- Cálculo de la asimilación de $H^{14}CO_3^-$

En todas las experiencias se incubaba para cada profundidad una botella con la muestra previamente fijada de formol. Estas botellas, que se procesaban igual que el resto de muestras, eran las utilizadas como blancos de fijación pasiva y su contaje se restaba al de las muestras respectivas, siendo normalmente valores muy bajos (menores de 100 d.p.m.). Con las incubaciones que incluían el uso de DCMU se obtenía el valor de la fotoasimilación anoxigénica, que sustraído del de la botella sin inhibidor daba el valor de la fotoasimilación oxigénica.

El cálculo del carbono total asimilado se realizaba mediante la siguiente fórmula:

$$C_{\text{asimilado}} (\text{mg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}) = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot C_{\text{disponible}} \cdot 1,05$$

siendo:

$$K_1 = (\text{dpm}_{\text{asimilado}} - \text{dpm}_{\text{blanco}}) / \text{dpm}_{\text{agregadas}}$$

$$K_2 = V_{\text{botella}} / V_{\text{filtrado}}$$

$$K_3 (\text{h}^{-1}) = 1 / t_{\text{incubación}}$$

$$C_{\text{disponible}} (\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}) = \text{Alcalinidad} (\mu\text{eq/l}) \cdot 12 \cdot F$$

donde F es un factor que depende de la fuerza iónica, del pH y de la temperatura, que puede calcularse a partir de tablas o mediante programas de cálculo de equilibrios químicos. El factor 1,05 supone una corrección para la discriminación isotópica. Las $\text{dpm}_{\text{agregadas}}$ se calculaban considerando que $1 \mu\text{Ci} = 2,2 \cdot 10^6 \text{ dpm}$, preparándose patrones de la solución madre de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ para poder valorar exactamente la cantidad total agregada a las muestras.

El Casimilado determinado en estas experiencias era la fracción particulada, ya que no se medía el carbono asimilado que era metabolizado y excretado durante el transcurso de la experiencia (DOC). No obstante, experiencias previas demostraron que la fracción excretada durante el transcurso de las incubaciones suponía alrededor del 10-15 % del total asimilado, sin excesivas diferencias entre las muestras, lo que hacía que a nivel práctico fuera más rentable dedicar el tiempo disponible a mejorar las experiencias ensayadas antes que a pretender determinar esa fracción minoritaria, lo que hubiera significado un engorroso y largo procesamiento adicional de las muestras.

5.2.3.4.- Cálculo de la fotoasimilación integrada para la totalidad de la laguna

Para el cálculo de la fotoasimilación integrada se procedió a la cubicación de la laguna en base a la batimetría reflejada en el capítulo 2. Ello permitía establecer una integración de los valores de fotoasimilación a lo largo de la columna de agua, con lo que se podía calcular la contribución de la fotoasimilación que tenía lugar en las distintas capas de la laguna a la fotoasimilación total.

5.3.- RESULTADOS

5.3.1. - RADIACIÓN LUMINOSA

La penetración de la luz en las aguas de la Laguna de Arcas resulta fuertemente determinada por la composición y densidad de las poblaciones de organismos fotosintéticos presentes en las diversas profundidades. En la figura 5-3 podemos observar las isocurvas de penetración de la luz a lo largo del periodo trienal estudiado. Para evitar las variaciones debidas a la distinta iluminación en función del periodo del año o de la cobertura nubosa, estas isocurvas representan para cada fecha y profundidad los porcentajes respecto a la intensidad luminosa incidente en superficie que llegan a dicho punto del perfil vertical, lo que representa de forma fidedigna la absorción en el agua.

La penetración de la luz durante el periodo de mezcla térmica tiene lugar hasta el fondo de la laguna, si bien las cantidades que llegan al mismo son muy pequeñas. Sin embargo, durante el periodo de estratificación se observa una gran extinción de la luz a nivel de la quimioclina, debido a la densidad de las poblaciones de microorganismos que allí se encuentran, haciendo que la mayoría del hipolimnion anóxico se mantenga en condiciones de oscuridad total. Respecto a las aguas epilimnéticas, las variaciones no son muy importantes, aunque sí es importante la observación de que la máxima absorción se da en los meses finales de la primavera, en los cuales existe un desarrollo algal epilimnético más importante. Durante los meses de verano la absorción en el epilimnion es algo menor, lo que

permite una mayor disponibilidad luminosa para los microorganismos situados en la quimioclina, tanto por la menor absorción en las aguas epilimnéticas como por la mayor perpendicularidad y cantidad de luz incidente en superficie. La presencia en el epilimnion de crecimientos primaverales que decaen durante el verano es una característica que se ha encontrado en numerosos lagos (Marshall y Peters, 1989), explicándose en términos de disponibilidad de luz y nutrientes.

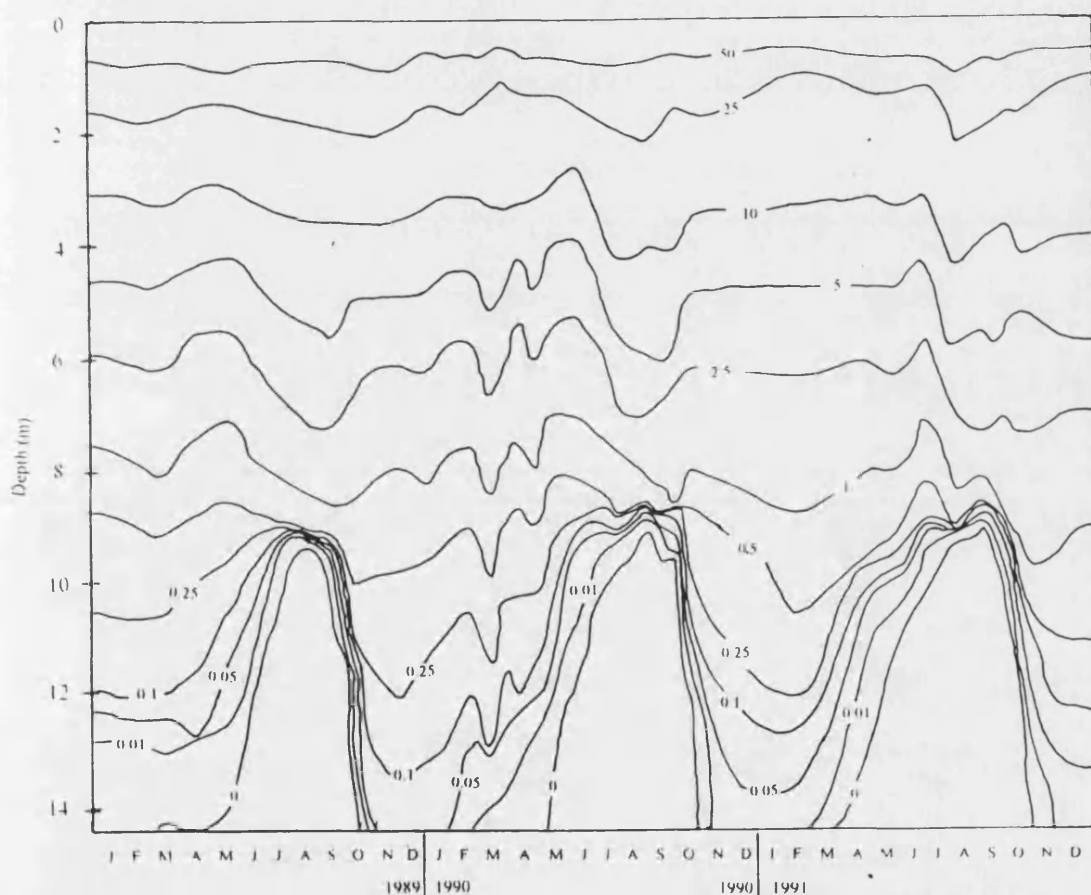


Figura 5.3 - Diagrama espacio-tiempo de la penetración de la luz en la Laguna de Arcas en el periodo 1989-1991, representando el porcentaje respecto a la luz incidente en superficie.

Figure 5.3.- Space-time diagram of light penetration in Lake Arcas from 1989 to 1991, percent values of surface incident light are shown.

Una información muy similar, en lo que se refiere a la penetración de la luz en las aguas superficiales, nos la suministra la medida de la profundidad de visión del disco de Secchi. Esta profundidad es una función de la atenuación de la luz, la cual depende tanto de las propiedades ópticas inherentes al agua como de la absorción o dispersión de la luz por las partículas (Tilzer, 1988). Durante el

otoño y el invierno, la profundidad de visión del disco oscila entre 4 y 4,5 metros, disminuyendo en primavera a valores que generalmente están en el rango de 2,7-3,4 metros, para volver a aumentar en verano, con valores normales entre 3,2 y 4,4 metros (tabla 5-4).

Tabla 5.4- Profundidad de visión del disco de Secchi (m) en algunos de los muestreos realizados en la Laguna de Arcas.

Table 5.4- Secchi depth (m) in some of the samplings done in Lake Arcas.

FECHA	SECCHI (m)	FECHA	SECCHI (m)
23-3-89	3,6	8-6-90	2,5
17-4-89	2,8	4-7-90	2,35
27-5-89	2,5	30-7-90	4,4
28-6-89	3,1	25-8-90	3,2
20-9-89	4,1	7-9-90	3,9
13-10-89	4,25	24-9-90	3,75
4-11-89	4,4	13-10-90	3,6
24-11-89	4,5	9-2-91	4,0
20-12-89	4,3	1-5-91	3,0
18-1-90	4	24-5-91	3,45
14-2-90	4	29-6-91	2,8
23-2-90	4,2	6-8-91	4,0
10-3-90	3,35	3-9-91	3,5
23-3-90	3,4	12-9-91	4,40
10-4-90	2,75	1-10-91	4,0
28-4-90	2,6	11-10-91	3,75
17-5-90	2,35	13-12-91	4,0

Al medir mediante un espectro-radiómetro la cualidad espectral de la luz que penetra en las distintas capas, los resultados obtenidos son reveladores (figura 5-4). La luz de longitudes de onda altas y bajas, esto es, en los rangos del rojo y el azul, es la primera que selectivamente va siendo absorbida, por el agua y los diversos componentes que se encuentran disueltos o en suspensión en la misma. En las aguas epilimnéticas, la máxima penetración de la luz tiene lugar en aquellos fotones en torno a los 570 nm, con un máximo relativo adicional alrededor de 650 nm. Sin embargo, al acercarnos hacia la quimioclina se observa inicialmente un empobrecimiento relativo de la luz que llega en la longitud de onda en torno a 620 nm, precisamente donde se encuentra el máximo de absorción de la ficocianina. No obstante, la variación más espectacular tiene lugar al alcanzarse las profundidades en las que se encuentran las máximas densidades poblacionales de Cromatiaceas y de *Oscillatoria ornata*, ya que en apenas 25 cm de profundidad se produce una absorción casi total de la luz de longitud de onda situada entre 500 y 600 nm, debido a la absorción específica en ese rango del espectro por los carotenos (okenona) de las Cromatiaceas y la ficoeritrina de las cianobacterias.

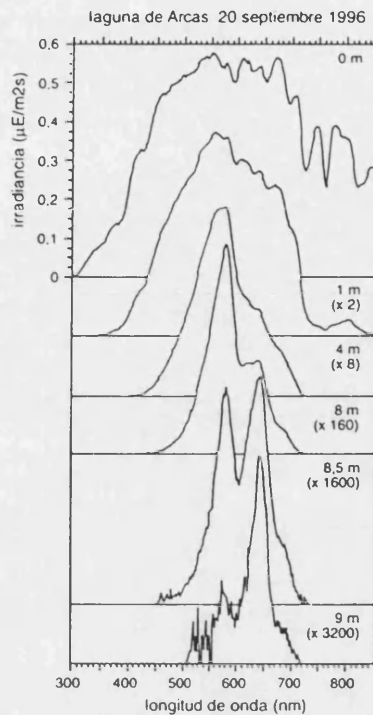


Figura 5.4- Composición espectral e intensidad para cada longitud de onda de la luz que penetra a distintas profundidades de la Laguna de Arcas, datos tomados el 20 de septiembre de 1996.

Figure 5.4- Spectral qualities and intensity of the different wavelengths of light reaching different depths of Lake Arcas on September 20, 1996

5.3.2.- PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

5.3.2.1.- Composición pigmentaria específica de las principales especies de organismos fotosintéticos

La composición específica de pigmentos fotosintéticos que posee cada uno de los organismos fotosintéticos aislados de las aguas de la laguna, resulta un factor determinante a la hora de entender sus posibilidades de crecimiento bajo las condiciones de luz reinantes en la quimioclina de la laguna. La composición específica de pigmentos fotosintéticos en cultivos axénicos de bacterias fotosintéticas del azufre está reflejada con mayor detalle en Rodrigo (1997), aunque aquí la resumiremos brevemente, haciendo un mayor hincapié en los aspectos que no se describen en ese trabajo, tales como la composición pigmentaria de las cianobacterias y la absorción *in vivo* de las muestras de aguas de la quimioclina.

En la figura 5-5 se muestra el espectro de absorción de un extracto acetónico de dos muestras de agua de la Laguna de Arcas tomadas en la época de estratificación, una muestra epilimnética y otra procedente de la quimioclina de la laguna. El espectro de absorción *in vivo* de una muestra de agua de dicha quimioclina (figura 5-6) pone de manifiesto la presencia de microorganismos con pigmentos fotosintéticos bastante eficientes en la captación de fotones situados en el rango espectral amarillo-verde, banda espectral en la que está enriquecida la luz que llega a esta zona en relación al resto de calidades espectrales. Son por tanto estos pigmentos los que facultan a los microorganismos allí presentes para captar eficientemente la luz mayoritariamente disponible, lo cual les permite desarrollar su actividad fotosintética. La absorción de la luz de longitud de onda comprendida entre 500 y 550 nm mediante la okenona en el caso de *Chromatium weissei* y la de 550-600 nm por parte de la ficoeritrina de *Oscillatoria ornata* hace que a las profundidades en las que estos microorganismos desarrollan sus máximos poblacionales se produzca una absorción completa de la luz del rango 500-600 nm, que es la mayor parte de la que llega a estas profundidades, con lo que por debajo esos máximos prácticamente no hay luz disponible.

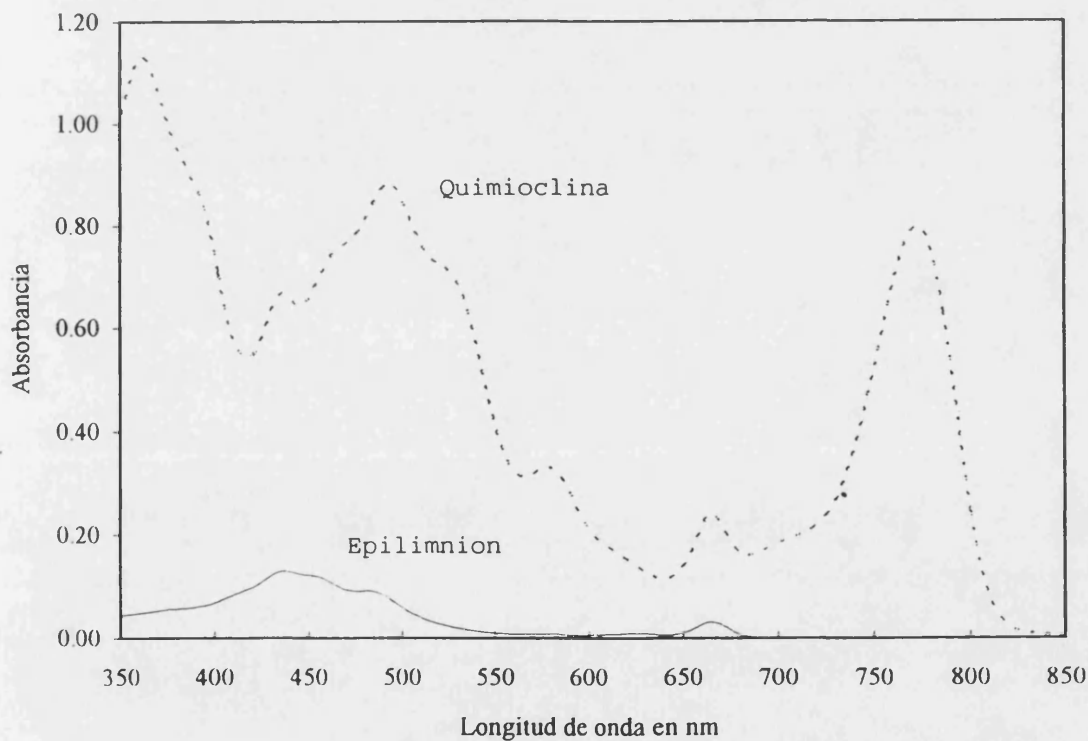


Figura 5.5.- Espectro de absorción en extracto acetónico de una muestra del epilimnion y otra de la quimioclina de la Laguna de Arcas, correspondientes al 12 de septiembre de 1991.

Figure 5.5.- Acetone extracted pigment absorption spectra of an epilimnetic and a chemocline water sample from Lake Arcas, sampled on September 12, 1991.

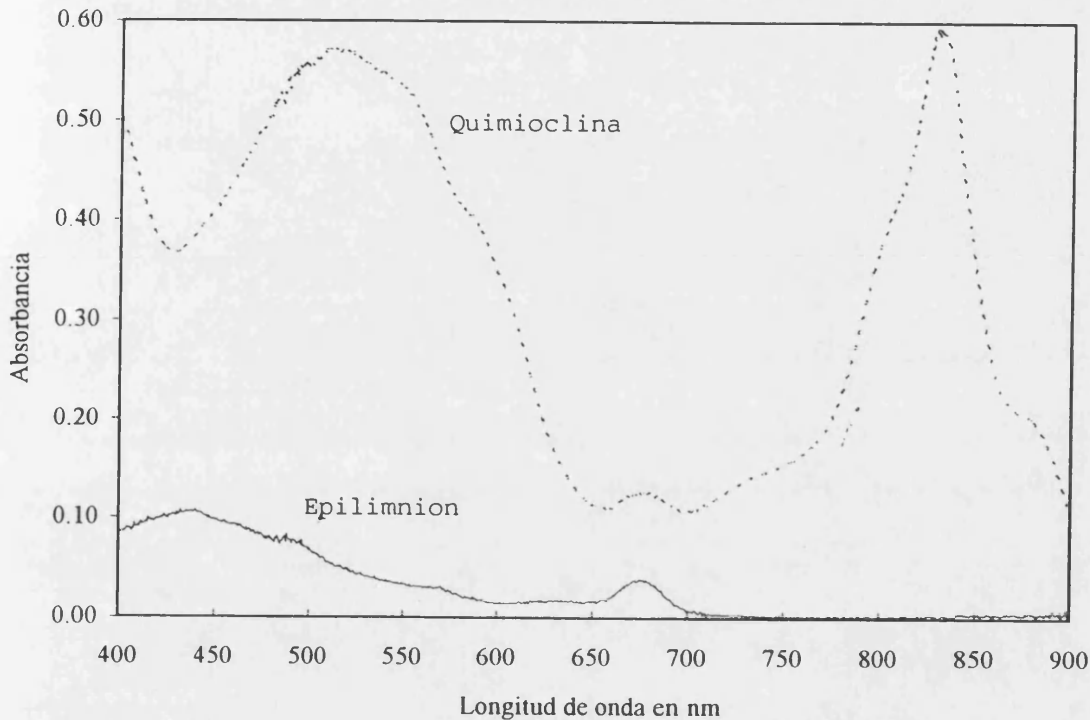


Figura 5.6.- Espectro de absorción *in vivo* de una muestra del epilimnion y otra de la quimioclina de la Laguna de Arcas tomadas el 12 de septiembre de 1991.

Figure 5.6.- *In vivo* absorption spectra of an epilimnetic and a chemocline water sample from Lake Arcas in September 12, 1991.

En la figura 5-7 se observa el espectro de absorción *in vivo* de las tres especies de cianobacterias filamentosas aisladas de las aguas de la Laguna de Arcas. De las tres especies estudiadas, únicamente *Oscillatoria ornata* posee ficoeritrina, lo que le faculta para absorber eficientemente la luz del rango espectral entre 550 y 580, que supone una parte mayoritaria de los fotones disponibles a la profundidad en la que esta cianobacteria forma densas poblaciones en la laguna. Las otras dos cianobacterias estudiadas, a pesar de que también presentan ficobiliproteínas, estas tienen sus máximos de absorción a longitudes de onda más desplazadas hacia el rojo, con lo que estos pigmentos no les serían de tanta utilidad en la captación de la luz que llega a la profundidad de la quimioclina. Esta presencia de ficoeritrina también queda puesta de manifiesto en la observación de la autofluorescencia (figura 5-8).

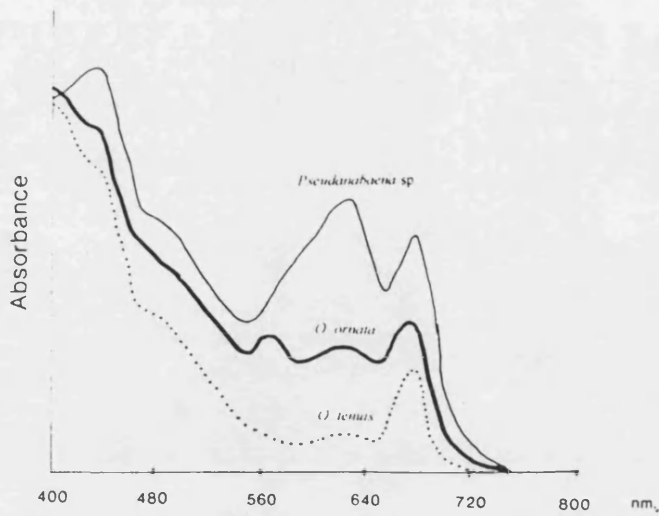


Figura 5.7.- Espectros de absorción *in vivo* de las tres especies de cianobacterias filamentosas aisladas de muestras de la Laguna de Arcas. Las tres especies presentan los picos característicos de la ficocianina (620 nm) y las clorofila *a* (680 nm), pero sólo *O. ornata* presenta el máximo de absorción característico de la ficoeritrina (570 nm).

Figure 5.7.- In vivo absorption spectra of the three cyanobacterial isolates from Lake Arcas. All species presents the specific peaks of phycocyanin (620 nm) and chlorophyll *a* (680 nm), but only *O. ornata* shows the specific absorption maximum characteristic of phycoerythrin (570 nm).



Figura 5.8- Autofluorescencia inducida con luz azul en un cultivo de *Oscillatoria ornata* aislada de la Laguna de Arcas, que produce una emisión amarilla por parte de los microorganismos que poseen ficoeritrina.

Figure 5.8- Blue-light induced autofluorescence in a *Oscillatoria ornata* culture isolated from Lake Arcas, which causes a yellow fluorescence in those microorganisms having phycoerythrin.

La determinación de la absorción, tanto de los extractos como de muestras de cultivos medidas *in vivo*, de las bacterias fotosintéticas del azufre (figura 5-9), pone de manifiesto sus posibilidades de captación de luz en las profundidades de la laguna en las que se encuentran. Como se ve en los espectros *in vivo*, las tres especies de Cromatiaceas tienen una elevada capacidad de absorción de fotones en el rango del espectro que va de 450 a 550 nm, lo que les permitiría aprovechar parte de la luz que llega a la quimioclina.

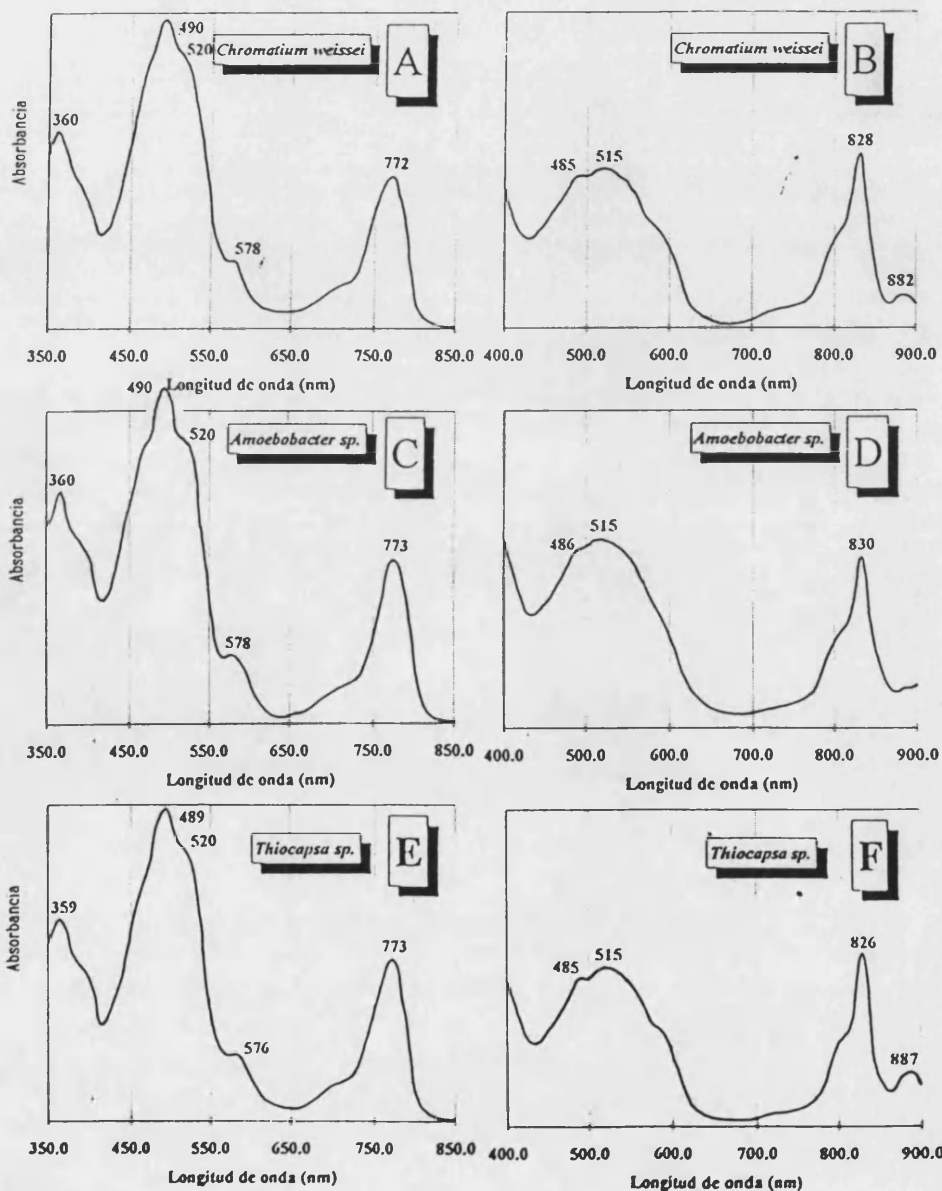


Figura 5.9.- Espectros de absorción *in vivo* (derecha) y en extracto acetónico (izquierda) de las especies de bacterias fotosintéticas púrpuras del azufre aisladas de muestras de la Laguna de Arcas Modificado a partir de Rodrigo, 1997.

Figure 5.9. - *In vivo* (right) and acetone extracted (left) absorption spectra of the Chromatiaceae isolated from Lake Arcas. Modified from Rodrigo, 1997.

El carotenoide principal de las tres especies de Cromatiaceas es la okenona (figura 5-10), siendo este el pigmento que les faculta para la absorción antes comentada, mientras que *Pelodictyon clathratiforme* presenta clorobacteno como carotenoide principal. En la determinación de los pigmentos fotosintéticos mediante HPLC, realizada en el periodo de estratificación de 1996 para confirmar estos resultados en muestras de la laguna, se detectó la presencia masiva de clorofila a, bacterioclorofila a y okenona, no apareciendo ni siquiera trazas de las bacterioclorofilas correspondientes a las bacterias verdes del azufre.

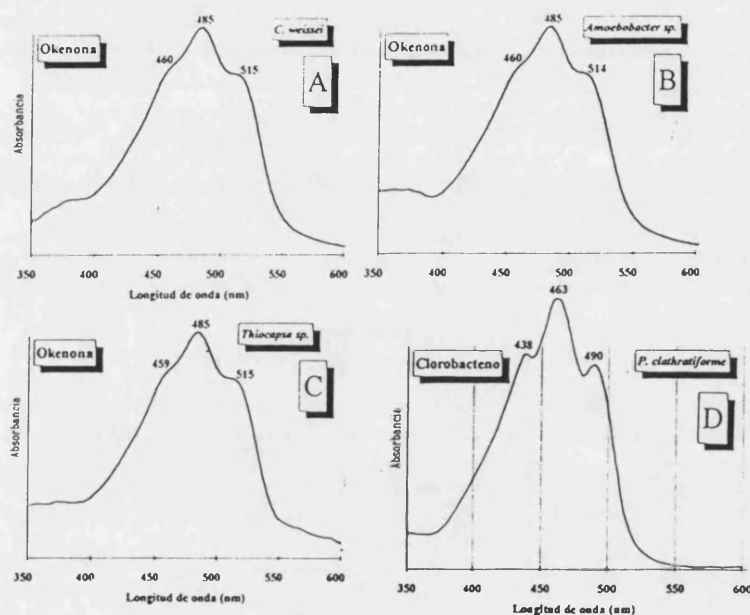


Figura 5.10.- Espectros de absorción del extracto en éter de petróleo de los carotenos de las especies de bacterias fotosintéticas del azufre aisladas de muestras de la Laguna de Arcas Modificado a partir de Rodrigo, 1997.

Figure 5.10. - Petroleum ether extracted absorption spectra of the carotenoids of the phototrophic sulfur bacteria isolated from Lake Arcas. Modified from Rodrigo, 1997.

5.3.2.2.- Evolución espacio-temporal de la concentración de los pigmentos clorofílicos en la Laguna de Arcas

La evolución de la concentración de clorofila *a* en la Laguna de Arcas en el periodo 1989-1991 se muestra en la figura 5-11. Durante el periodo de mezcla, la concentración de este pigmento en el agua está en torno a los $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, lo que denota la relativamente baja densidad de las poblaciones fitoplanctónicas. En el periodo de estratificación las concentraciones epilimnéticas sólo son ligeramente superiores, con valores que normalmente están entre 2 y $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, siendo algo más elevadas en primavera y más bajas en verano. Sin embargo, en la quimioclina, la

acumulación de organismos fotosintéticos, especialmente *Oscillatoria ornata* y *Cryptomonas* spp. hace que se alcancen concentraciones de clorofila *a* muy superiores, de manera que prácticamente durante todo el periodo de estratificación se superan en esta zona de la laguna los $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, llegándose a valores entre $100\text{-}150 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ e incluso superiores, de manera puntual, en la segunda mitad de este periodo. La presencia de gran cantidad de filamentos de *Oscillatoria ornata* en las aguas hipolimnéticas hace que las concentraciones de clorofila *a* sean normalmente mayores de $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, llegándose a valores en torno a los $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, durante el periodo final de la estratificación.

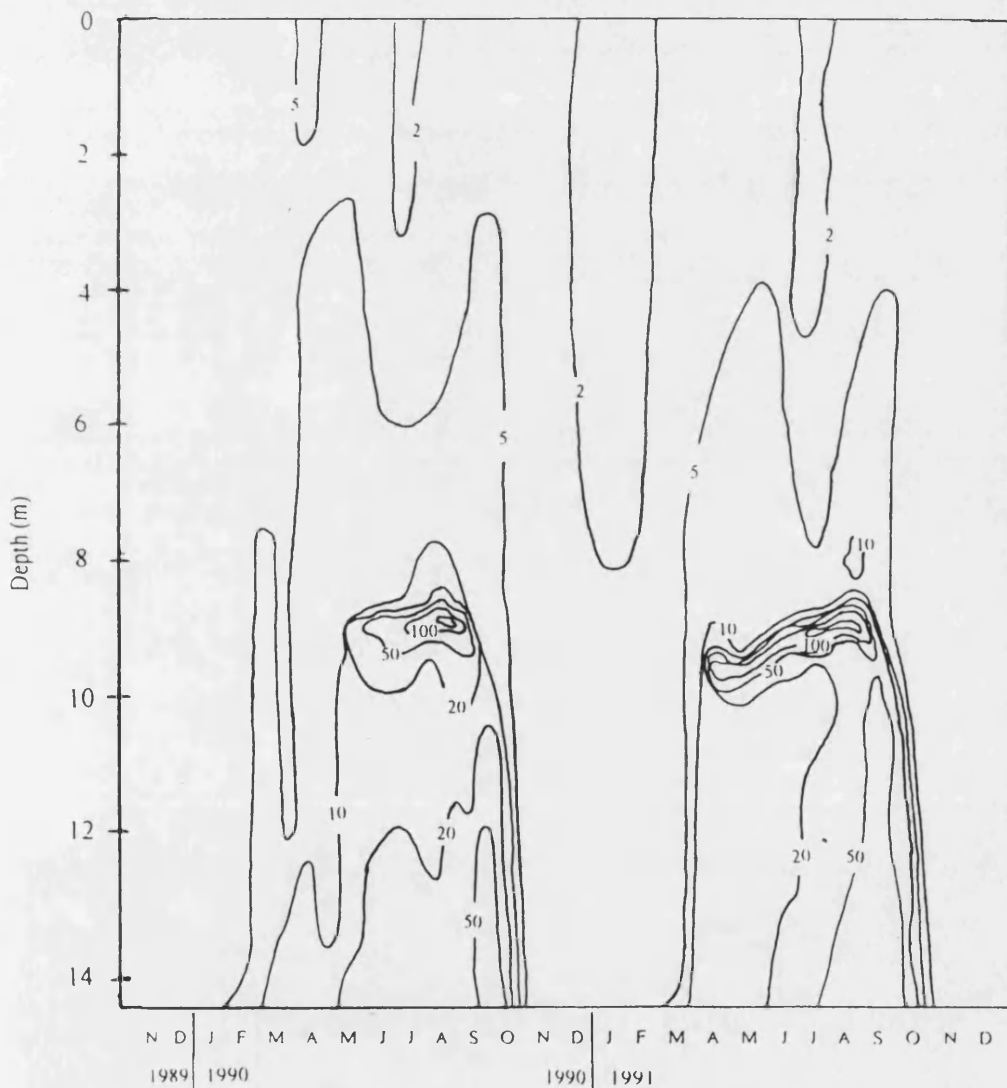


Figura 5.11.- Diagrama espacio-tiempo de la concentración de clorofila *a* en la Laguna de Arcas durante el periodo estudiado.

Figure 5.11.- Space-time diagram of chlorophyll *a* concentration in Lake Arcas during the period studied.

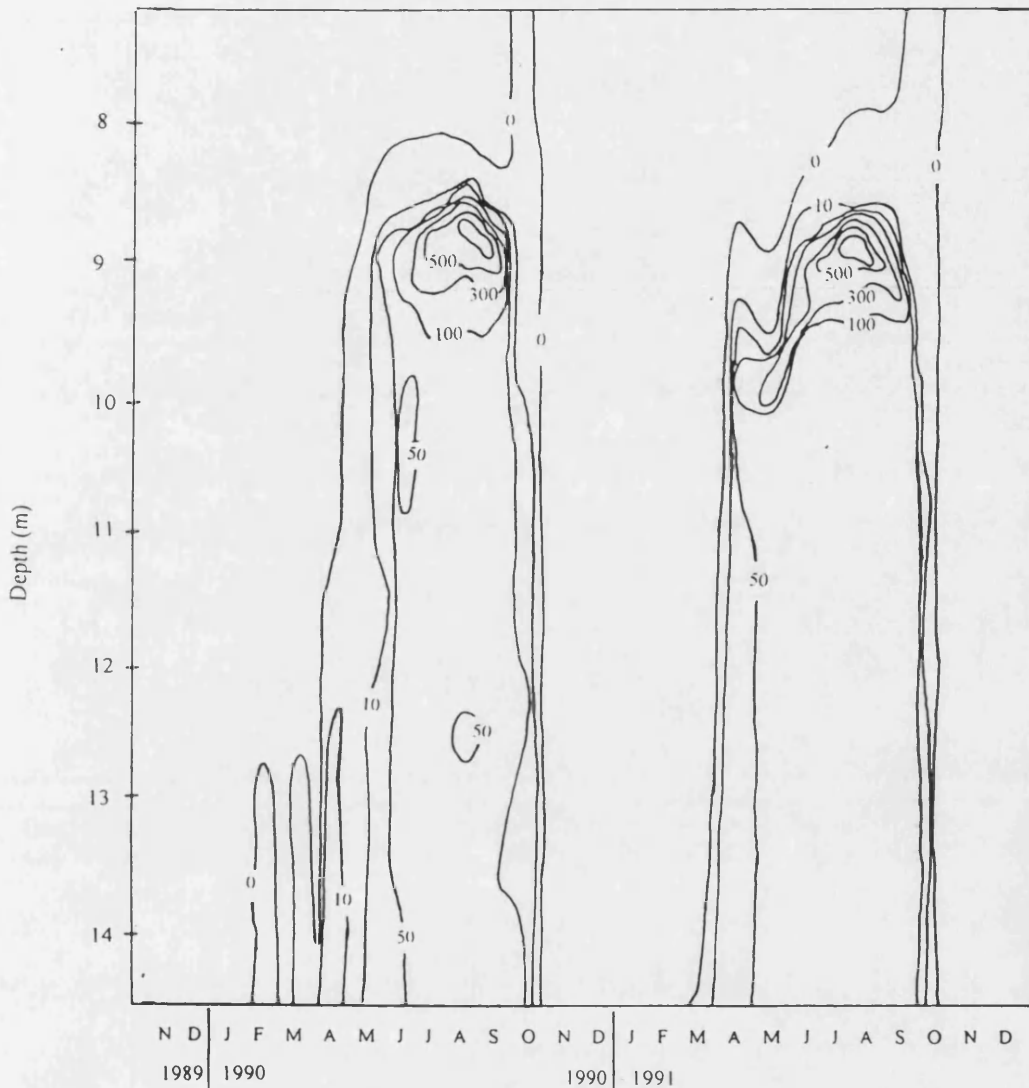


Figura 5.12.- Diagrama espacio-tiempo de la concentración de bacterioclorofila *a* en la Laguna de Arcas.

Figure 5.12.- Space-time diagram of bacteriochlorophyll *a* concentration in Lake Arcas.

Las concentraciones de bacterioclorofila *a*, lógicamente ausente en la columna de agua durante la época de mezcla debido a que el ambiente aerobio no permite el desarrollo de bacterias fotosintéticas del azufre, llegan a valores muy elevados, en torno a los 700 µg·l⁻¹ en la quimioclina durante pleno periodo de estratificación (figura 5-12). Estas elevadas concentraciones se encuentran en el primer metro por debajo de la interfase óxica-anóxica, donde se acumulan las Cromatiaceas (principalmente *C. weissii*), ya que por debajo prácticamente no hay disponibilidad de luz para estos u otros organismos fotosintéticos a

consecuencia del efecto de auto-sombra. En el resto del hipolimnion, debido a la sedimentación desde la zona de la quimioclina, las concentraciones de bacterioclorofila a aún son elevadas, estando comprendidas entre los 50 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Durante los cortos periodos de estratificación detectados a final del invierno de 1990 las concentraciones de bacterioclorofila a apenas llegaban a los 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, debido a que la brevedad de la permanencia de las aguas anóxicas en el fondo que no permite el desarrollo de poblaciones densas.

5.3.3.- ESTIMA DE LA PRODUCCIÓN PRIMARIA

Como ya se comentó en el apartado de material y métodos, el objetivo de estas experiencias no era realizar una estima de la producción primaria a lo largo del ciclo anual, sino más bien atender a aspectos concretos que permitieran determinar algunas de las líneas básicas del funcionamiento productivo de la laguna. Por ello, en este apartado se exponen por separado los resultados de cada uno de los principales experimentos, tal como se plantearon en el apartado 5.2.3. No obstante, puesto que para la valoración de estos experimentos es importante conocer la contribución de cada uno de los organismos a la población total de organismos fotosintéticos, se presenta previamente la tabla 5-5, en la que se recogen los biovolúmenes de cada uno de los organismos en cada muestra utilizada para los ensayos de fotoasimilación de carbono inorgánico, para seguir con la presentación de los resultados de los diferentes experimentos. Es reseñable que, si bien en la quimioclina las muestras incubadas eran muy próximas y los resultados representan de una manera fidedigna la situación real, en el epilimnion la distancia entre las muestras era mayor, con lo que probablemente no se hayan localizado exactamente los picos de actividad, aunque ya se trataba de elegir las profundidades de incubación en función de otros parámetros indicadores determinados previamente. Además de los experimentos expuestos se realizaron otros en los que se intento realizar un fraccionamiento en tamaños de la fotoasimilación de carbono inorgánico, pero la técnica de filtración usada no permitió realizar esta distinción, por lo que los resultados, por irrelevantes, no se presentan aquí.

- **Experiencia 1.-** Este ensayo, realizado los días 13 y 14 de octubre de 1989 corresponde a una situación en la que ya se ha iniciado el proceso de mezcla de la laguna, pero sin llegarse a completar. Ello supone que las poblaciones planctónicas han perdido gran parte de su estructura estratificada y se encuentran más dispersas en el perfil vertical que durante el periodo estival.

Tabla 5.5- Biovolúmenes de los principales microorganismos fotosintéticos presentes en las muestras utilizadas en los distintos experimentos de fotoasimilación de carbono inorgánico *in situ*.

Table 5.5- Biovolumes of the main phototrophic microorganisms in the samples incubated in the several *in situ* inorganic carbon photoassimilation experiments.

Prof. (m)	Biovolumen ($\mu\text{m}^3 \text{ml}^{-1}$)						
	<i>Chromatium weissei</i>	<i>Oscillatoria cf. ornata</i>	<i>Cryptomonas spp.</i>	<i>Amoebobacter sp.</i>	<i>Thiocapsa sp.</i>	<i>Cyclotella stelligera</i>	<i>Cyclotella distinguenda</i>
Oct. 14, 1989							
0,5	0	$2,27 \times 10^4$	$3,47 \times 10^3$	0	0	$1,02 \times 10^5$	$8,58 \times 10^4$
3	0	$2,75 \times 10^4$	$6,79 \times 10^3$	0	0	$1,29 \times 10^5$	$8,72 \times 10^4$
8	0	$1,67 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	0	0	$1,08 \times 10^5$	$8,19 \times 10^4$
10,8	$1,10 \times 10^6$	$1,36 \times 10^5$	$6,08 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$	$5,77 \times 10^4$	$3,50 \times 10^5$	$1,22 \times 10^5$
11,1	$1,13 \times 10^7$	$1,22 \times 10^7$	$4,17 \times 10^5$	$9,23 \times 10^5$	$1,44 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$	$8,22 \times 10^4$
11,5	$9,67 \times 10^6$	$1,46 \times 10^7$	$3,18 \times 10^4$	$7,77 \times 10^5$	$3,96 \times 10^4$	$4,12 \times 10^4$	$5,85 \times 10^4$
12	$1,27 \times 10^7$	$1,47 \times 10^7$	$2,23 \times 10^4$	$4,89 \times 10^5$	$7,56 \times 10^5$	$2,34 \times 10^4$	$4,03 \times 10^4$
12,9	$1,29 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7$	$1,91 \times 10^4$	$7,07 \times 10^5$	$1,69 \times 10^5$	$1,93 \times 10^4$	$1,43 \times 10^4$
Ene, 17, 1990							
0,1	0	$2,77 \times 10^3$	$2,22 \times 10^4$	0	0	$2,61 \times 10^4$	$1,46 \times 10^5$
0,5	0	$3,47 \times 10^3$	$2,76 \times 10^4$	0	0	$3,25 \times 10^4$	$1,71 \times 10^5$
3	0	$1,06 \times 10^3$	$2,29 \times 10^4$	0	0	$2,38 \times 10^4$	$1,27 \times 10^5$
7,5	0	$1,24 \times 10^3$	$2,10 \times 10^4$	0	0	$5,42 \times 10^4$	$3,29 \times 10^5$
12	0	$5,6 \times 10^2$	$3,66 \times 10^4$	0	0	$2,01 \times 10^4$	$1,31 \times 10^5$
Sept, 3, 1991							
0,5	0	$1,12 \times 10^3$	$2,47 \times 10^4$	0	0	$1,41 \times 10^5$	$6,89 \times 10^5$
7	0	$1,11 \times 10^3$	$2,58 \times 10^4$	0	0	$4,31 \times 10^5$	$1,08 \times 10^6$
8,5	$7,82 \times 10^4$	$5,65 \times 10^5$	$8,05 \times 10^5$	$3,22 \times 10^4$	$7,19 \times 10^4$	$1,40 \times 10^5$	$2,79 \times 10^5$
8,7	$1,29 \times 10^7$	$5,57 \times 10^6$	$4,21 \times 10^6$	$1,68 \times 10^5$	$1,15 \times 10^5$	$6,04 \times 10^4$	$1,56 \times 10^4$
8,9	$3,72 \times 10^7$	$5,54 \times 10^6$	$2,79 \times 10^6$	$2,71 \times 10^5$	$1,78 \times 10^4$	$3,05 \times 10^4$	$1,27 \times 10^4$
Sept, 30, 1991							
0,5	0	$6,41 \times 10^4$	$1,98 \times 10^4$	0	0	$2,72 \times 10^5$	$9,00 \times 10^5$
3	0	$5,80 \times 10^4$	$7,13 \times 10^4$	0	0	$2,98 \times 10^5$	$1,58 \times 10^6$
7	0	$8,83 \times 10^4$	$5,92 \times 10^4$	0	0	$3,33 \times 10^5$	$1,89 \times 10^6$
9,1	$1,22 \times 10^6$	$8,21 \times 10^5$	$3,69 \times 10^5$	$3,90 \times 10^4$	$1,79 \times 10^4$	$2,01 \times 10^5$	$7,18 \times 10^5$
9,2	$6,92 \times 10^6$	$7,75 \times 10^6$	$7,14 \times 10^6$	$9,15 \times 10^4$	$7,28 \times 10^3$	$1,32 \times 10^5$	$2,78 \times 10^5$
9,3	$6,09 \times 10^7$	$9,21 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$1,54 \times 10^5$	$1,72 \times 10^4$	$4,15 \times 10^4$	$2,31 \times 10^5$
9,4	$3,22 \times 10^7$	$9,91 \times 10^6$	$2,89 \times 10^5$	$2,43 \times 10^5$	$5,42 \times 10^4$	$1,22 \times 10^4$	$7,8 \times 10^4$
9,5	$1,78 \times 10^7$	$8,43 \times 10^6$	$5,28 \times 10^5$	$1,27 \times 10^5$	$2,16 \times 10^4$	$9,23 \times 10^3$	$3,69 \times 10^4$
9,8	$1,11 \times 10^7$	$7,56 \times 10^6$	$8,56 \times 10^5$	$1,28 \times 10^5$	$6,94 \times 10^3$	$2,33 \times 10^3$	$8,13 \times 10^3$
Oct, 1, 1991							
9,2	$8,39 \times 10^7$	$1,25 \times 10^7$	$8,40 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	$9,33 \times 10^3$	$6,28 \times 10^4$	$1,33 \times 10^5$

Como consecuencia de la dispersión del plancton no se obtienen unas diferencias tan grandes en el carbono inorgánico asimilado entre las incubaciones de muestras de diferentes profundidades como las que se podrían obtener en un periodo de máxima estratificación. Quizá lo más destacable es que la importancia relativa del carbono asimilado en la botella negra respecto al carbono asimilado total aumenta con la profundidad, alcanzando cerca de un 80 % del total en aquellas profundidades situadas por debajo de los restos de la lámina de máxima densidad de bacterias fotosintéticas (tabla 5-6).

En las muestras de la zona óxica (0,5; 3; 8 e incluso 10,8 metros), la fotoincorporación máxima no se alcanza en la capa más superficial, sino en una zona algo más profunda. Mientras tanto, en las muestras anóxicas el carbono asimilado total aumenta bastante, no sólo por lo fotoasimilado por las bacterias fotosintéticas del azufre y cianobacterias, sino por la mayor contribución de la asimilación oscura, a descontar cuando se pretender evaluar únicamente la fotoasimilación.

Tabla 5.6- Principales características de las muestras incubadas y resultados de asimilación de carbono inorgánico obtenidos en la Laguna de Arcas el 14 de octubre de 1989 (experimento 1).

Table 5.6.- Main features of water samples for incubation and results of inorganic ^{14}C uptake experiments performed in Lake Arcas, October 14, 1989 (experiment 1).

PROF. MUESTRA (m)	O ₂ MUESTRA (mg·l ⁻¹)	H ₂ S MUESTRA (μM)	Clor <i>a</i> (μg·l ⁻¹)	BClor <i>a</i> (μg·l ⁻¹)	MEDIA RADIACIÓN ZENITAL (μE·m ⁻² ·s ⁻¹)
0,5	5,6	0	3,4	0	477 ± 93
3	5,0	0	4,4	0	111,6 ± 21,2
8	4,3	0	3,55	0	10,75 ± 1,99
10,8	1,5	0	10,9	0	2,95 ± 0,48
11,1	0,1	30	112,6	68,86	1,281 ± 0,198
11,5	0	1,276	123,3	29,07	0,230 ± 0,036
12	0	1,567	121,0	36,9	0,0097 ± 0,0014
12,9	0	1,709	101,9	40,19	inapreciable

PROF. MUESTRA (m)	PROF. INCUB. (m)	C _{ASIMILADO} -BLANCA (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	C _{ASIMILADO} -NEGRA (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	FOTOASIMILACIÓN NETA (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	Relación % C _{ASIMILADO} -NEGRA/BLANCA
0,5	0,5	16,43	1,50	14,93	9,1
3	3	21,26	1,32	19,94	6,2
8	8	5,43	1,12	4,31	20,6
10,8	10,8	8,05	4,92	3,13	61,1
11,1	11,1	33,90	19,43	14,47	57,3
11,5	10,8	41,34	23,72	17,62	57,4
11,5	11,5	18,94	14,73	4,21	77,8
12	12	23,61	18,31	5,3	77,6
12,9	12,9	15,01	12,10	2,91	80,6

La incubación de la muestra en la que se mantenía la máxima densidad de bacterias fotosintéticas (11,5 m) a dos profundidades distintas (10,8 y 11,5 m) permite obtener interesantes resultados (tabla 5-6). Por un lado se observa que al situar la botella por encima de su propia profundidad (de 11,5 a 10,8 m), pasando la intensidad lumínica media de 0,230 a 2,95 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, la cantidad de carbono fotoasimilado aumenta hasta más del doble, mostrando una clara limitación de la fotoincorporación por la luz disponible. Esta limitación probablemente no sólo se debe a la cantidad de luz disponible, sino también a su composición espectral ya que los organismos fotosintéticos recolectan selectivamente la luz de algunas regiones del espectro, realizando un efecto de sombra sobre las poblaciones de mayores profundidades. Por otra parte, la cantidad de carbono incorporado en la botella negra aumenta bastante (un 38 %), por lo que no debemos olvidar que existe una diferencia de temperatura de 3,4°C entre las dos profundidades de incubación, que puede alterar la tasa metabólica. Esto debe considerarse también en el caso de las botellas blancas, aunque en aquellas el incremento en la incorporación de carbono era mucho mayor porcentualmente que en las negras.

- **Experiencia 2.-** Llevada a cabo el día 17 de enero de 1990, con el objeto de evaluar la importancia de la producción invernal. Se trata de un periodo en el cual la laguna se halla totalmente mezclada, en el que las poblaciones de fitoplancton son poco importantes y están homogéneamente distribuidas en la columna de agua, resumiéndose los resultados en la tabla 5-7.

Tabla 5.7- Principales características de las muestras incubadas y resultados de asimilación de carbono inorgánico obtenidos en la Laguna de Arcas el 17 de enero de 1990 (experimento 2).

Table 5.7- Main features of water samples for incubation and results of inorganic ^{14}C uptake experiments performed in Lake Arcas, January 17, 1990 (experiment 2)

PROF. MUESTRA (m)	O ₂ (mg·l ⁻¹)	Clor <i>a</i> (μg·l ⁻¹)	BClor <i>a</i> (μg·l ⁻¹)	MEDIA RADIACIÓN ZENITAL (μE·m ⁻² ·s ⁻¹)
0,1	9,5	3,20	0	580 ± 227
0,5	9,2	3,15	0	237 ± 101
3	9,1	3,45	0	53,3 ± 24,3
7,5	9,0	2,93	0	5,57 ± 2,73
12	8,9	3,28	0	0,82 ± 0,42

PROF. MUESTRA (m)	PROF. INCUB. (m)	C _{ASIMILADO} BLANCA (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	C _{ASIMILADO} NEGRA (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	Relación % C _{ASIMILADO} NEGRA/BLANCA
0,1	0,1	0,1757	0,0423	24,1
0,5	0,5	2,557	0,589	23,0
3	3	0,8642	0,0263	24,6
7,5	7,5	2,335	0,875	37,2
12	12	0,214	0,0746	34,9

Los resultados, como era de esperar, indican que la contribución de la producción invernal a la producción primaria total es muy pequeña. En ello influye tanto la baja densidad de la población de fitoplancton como la disminución de la actividad fotosintética como consecuencia de las bajas temperaturas, ya que durante el periodo de estratificación (más cálido) para densidades poblacionales similares en muestras epilimnéticas se obtuvieron unas mayores tasas de fotoincorporación de carbono. Cabe destacar que existe un marcado efecto de fotoinhibición en las muestras más superficiales, como denota el hecho de que la muestra de 0,1 metros sea en la que se da una menor incorporación de carbono.

- **Experiencia 3.-** Realizada en el periodo de máxima estratificación en el cual las poblaciones de microorganismos de la interfase óxico-anóxica presentan su mayor desarrollo. Además se incluye en esta experiencia una incubación potencial.

En este ensayo se efectuaron incubaciones de muestras de la zona bien oxigenada (0,5; y 7 m) y de la zona de la interfase óxico-anóxica (8,5; 8,7; y 8,9 m), cuyos resultados se resumen en la tabla 5-8. De las muestras de las dos primeras profundidades, la mayor densidad algal se encuentra en la segunda, cuyas poblaciones resultan mucho más eficientes en cuanto a la asimilación fotosintética que las de la superficie. A 7 metros, con una densidad algal que triplica a la de 0,5 metros, la fotoincorporación de carbono cuadruplica a la superficial, lo cual es especialmente destacable si tenemos en cuenta que la luz disponible en la más profunda no llega al 5 % de la superior, aunque debe tenerse en cuenta que las altas intensidades superficiales (cercanas a $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) podrían resultar inhibitorias (fotoinhibición).

En las muestras de la interfase se obtienen interesantes resultados. En la muestra superior, a 8,5 m, donde las condiciones todavía son microaerobias, la actividad fotosintética es casi únicamente oxigénica. En la profundidad correspondiente a la máxima densidad poblacional de *Oscillatoria ornata* (8,7 m), donde las bacterias fotosintéticas purpúreas también son abundantes, la fotosíntesis oxigénica sigue siendo muy mayoritaria (84 % de la actividad fotosintética total), pese a que se trata de una zona anóxica con presencia de sulfhídrico. En la muestra más profunda (8,9 m), donde se alcanza la máxima densidad de *Chromatium weissii* pero también existe una importante población de *Oscillatoria ornata*, la única actividad fotosintética detectada corresponde a la fotosíntesis anoxigénica. Al incubar esa misma muestra a una profundidad menor (8,6 m), por encima de la densa capa de procariotas fotosintéticos asentados en la redoxclina, se evita el efecto de sombra de estas poblaciones y la luz disponible no sólo aumenta en cantidad sino que su composición espectral cambia. En este caso, la fotosíntesis oxigénica (PSII), antes indetectable, supone ya un 35 % de la actividad fotosintética total, lo que demuestra que es la carencia de luz adecuada, y no el sulfhídrico, lo que está inhibiendo la fotosíntesis oxigénica de

Oscillatoria ornata. También se observa un incremento considerable en la fotosíntesis anoxigénica (que podría atribuirse no sólo a las bacterias fotosintéticas del azufre sino también a *Oscillatoria ornata*), demostrando que esta actividad está así mismo limitada por la luz disponible. Sin embargo, el rendimiento cuántico relativo, esto es, la cantidad de carbono inorgánico fijado por mol de fotones que llegan a esa profundidad, es mayor cuando se incubaba la muestra a su propia profundidad, indicando que el aparato fotosintético de los organismos presentes en la muestra está mejor preparado para el clima lumínico reinante en la profundidad que ocupan. Por último, deben reseñarse los elevados valores de asimilación oscura obtenidos para las dos muestras más profundas.

Tabla 5.8- Principales características de las muestras incubadas y resultados de asimilación de carbono inorgánico obtenidos en la Laguna de Arcas el 3 de septiembre de 1991 (experimento 3).
Table 5.8- Main features of water samples for incubation and results of inorganic ^{14}C uptake experiments performed in Lake Arcas, September 3, 1991 (experiment 3).

PROF. MUESTRA (m)	O ₂ (mg·l ⁻¹)	H ₂ S (μM)	Clor <i>a</i> (μg·l ⁻¹)	BClor <i>a</i> (μg·l ⁻¹)	MEDIA RADIACIÓN ZENITAL (μE·m ⁻² ·s ⁻¹)
0,5	8,2	0	3,28	0	744 ± 665
7	7,3	0	9,87	0	43,2 ± 28,0
8,5	0,7	0	17,34	4,26	10,64 ± 6,76
8,6	-	-	-	-	6,81 ± 4,3
8,7	0	70	179,39	302,79	4,62 ± 2,36
8,9	0	102	138,82	357,95	1,90 ± 0,91

PROF. MUESTRA (m)	PROF. INCUB. (m)	C _{ASIMILADO} ·BLANCA (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	C _{ASIMILADO} ·BLANCA DCMU (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	C _{ASIMILADO} ·NEGRA (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	Relación % C _{ASIMILADO} ·NEGRA/BLANCA
0,5	0,5	4,29	-	0,77	17,9
7	7	14,42	-	0,84	5,8
8,5	8,5	9,72	0	0,85	8,7
8,7	8,7	170,87	128,07	119,93	70,2
8,9	8,9	153,51	153,65	106,11	69,2
8,9	8,6	381,78	286,33	109,81	28,8

PROF. MUESTRA (m)	PROF. INCUB. (m)	C _{FOTOASIMILADO} ·NETO·BLANCA-NEGRA (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	C _{FOTOASIMILADO} ·NETO·OXIGENICO (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)	C _{FOTOASIMILADO} ·NETO·ANOXIGENICO (mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹)
0,5	0,5	3,52	3,52	0
7	7	13,57	13,57	0
8,5	8,5	8,87	8,87	0
8,7	8,7	50,94	42,80	8,14
8,9	8,9	47,54	0	47,54
8,9	8,6	271,97	95,45	176,52

- **Experiencia 4.-** La suavización del gradiente térmico, previa a la mezcla que tiene lugar al final del periodo estival, permitió realizar un ensayo en el cual se minimizara el efecto de la diferencia de temperatura sobre la tasa metabólica, factor que como se demostró en anteriores experimentos podía tener una importancia considerable en la cantidad de carbono inorgánico fotoasimilado.

Como en los casos anteriores, resulta conveniente comentar por separado los resultados correspondientes a las muestras de la zona óxica de los que pertenecen a la interfase, resumidos en la tabla 5-9. En los primeros, al igual que ocurría en anteriores ensayos, el máximo de fotoasimilación de carbono inorgánico no se encontraba en la superficie, a pesar de que las densidades algales eran bastante parecidas. De las tres profundidades incubadas, la más superficial (0,5 m) parece confirmar un cierto efecto de fotoinhibición en las capas superficiales de la laguna ($596 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), en la profundidad intermedia (3 m, a $183 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se obtenía el valor más alto de fotoasimilación, mientras que en la más profunda (7 m) ya se notaba una cierta limitación de la fotoasimilación por la cantidad de luz disponible ($34,6 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), reduciéndose la cantidad de carbono asimilado.

En cuanto a las muestras de la quimioclina, los resultados venían en gran parte a confirmar los de anteriores ensayos. La primera profundidad ensayada (9,1 m) todavía se encontraba en la zona aerobia y en ella prácticamente tan sólo encontrábamos fotosíntesis oxigénica. La muestra de 9,2 m, donde los tres microorganismos fotosintéticos dominantes (*C. weissei*, *O. ornata* y *Cryptomonas* spp.) aportaban un biovolumen muy similar, presentaba mayoritariamente fotosíntesis oxigénica (86 %), aunque ya se detectaba fotosíntesis anoxigénica. A 9,3 m, donde casi se mantenía la presencia de *Oscillatoria ornata* y aparecía la densidad poblacional más elevada de *Chromatium weissei*, se encontró que prácticamente toda la actividad fotosintética era anoxigénica, detectándose una fotosíntesis oxigénica residual, lo que se mantenía en las siguientes profundidades (9,4 y 9,5). Los valores de fotoasimilación más elevados se obtenían con mucha diferencia coincidiendo con las máximas densidades de organismos, a 9,2 y 9,3 metros, pero la reducción en la fotoasimilación no era proporcional a la densidad de estos, sino que se veía totalmente determinada por la atenuación de la luz por la sombra que producía capa de organismos inmediatamente superior. De esta manera, tan sólo la capa superior más densa, tanto de *Oscillatoria ornata* como de *Chromatium weissei*, tenía una alta actividad fotoasimiladora, mientras que niveles inmediatamente inferiores de estos organismos están severamente limitados por la absorción selectiva de las calidades espectrales que les son necesarias por parte de sus congéneres de las capas superiores. En la muestra correspondiente a 9,8 metros la actividad fotosintética total era muy escasa, pese a presentar todavía poblaciones importantes, aunque con niveles de radiación luminosa total bajos, pero aún aprovechables si su calidad espectral fuera la adecuada.

Tabla 5.9.- Principales características de las muestras incubadas y resultados de asimilación de carbono obtenidos en la Laguna de Arcas el 30 de septiembre de 1991 (experimento 4).

Table 5.9.- Main features of water samples for incubation and results of ^{14}C uptake experiments performed in Lake Arcas, September 30, 1991 (experiment 4).

PROF. MUESTRA (m)	O_2 MUESTRA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	H_2S (μM)	Clor <i>a</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	BClor <i>a</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	MEDIA RADIACIÓN ZENITAL ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
0,5	7,2	0	2,62	0	596 ± 22
3	7,1	0	3,28	0	182,7 ± 6,7
7	7,0	0	3,6	0	34,6 ± 1,2
9,1	2,0	0	7,84	5,99	7,31 ± 0,27
9,2	0	80	119,08	62,94	3,85 ± 0,14
9,3	0	98	107,00	381,28	1,92 ± 0,07
9,4	0	140	59,59	205,97	0,98 ± 0,04
9,5	0	220	35,39	130,69	0,52 ± 0,02
9,8	0	830	19,35	68,85	0,183 ± 0,006

PROF. MUESTRA (m)	PROF. INCUB. (m)	$\text{C}_{\text{ASIMILADO-BLANCA}}$ ($\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	$\text{C}_{\text{ASIMILADO-DCMU}}$ ($\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	$\text{C}_{\text{ASIMILADO-NEGRA}}$ ($\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	$\text{C}_{\text{ASIMILADO-NEGRA con Nserve}}$ ($\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	Relación % $\text{C}_{\text{ASIMILADO-NEG/BL.}}$
0,5	0,5	5,23	-	0,57	-	10,9
3	3	10,73	-	0,37	-	3,4
7	7	7,12	-	0,56	-	7,9
9,1	9,1	10,58	0	1,38	1,42	13,0
9,2	9,2	148,41	34,68	15,87	13,30	10,7
9,3	9,3	247,54	240,75	49,91	34,63	20,2
9,4	9,4	103,73	103,41	88,70	55,01	85,51
9,5	9,5	70,51	61,79	56,31	27,38	79,9
9,8	9,8	10,83	-	8,43	3,73	77,9

PROF. MUESTRA (m)	PROF. INCUB. (m)	$\text{C}_{\text{FOTOASIMILADO NETO BLANCA-NEGRA}}$ ($\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	$\text{C}_{\text{FOTOASIMILADO NETO OXIGENICO}}$ ($\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)	$\text{C}_{\text{FOTOASIMILADO NETO ANOXIGENICO}}$ ($\text{mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$)
0,5	0,5	4,66	4,66	0
3	3	10,36	10,36	0
7	7	6,56	6,56	0
9,1	9,1	9,20	9,20	0
9,2	9,2	132,54	113,73	18,81
9,3	9,3	197,63	6,79	190,84
9,4	9,4	15,03	0,32	14,70
9,5	9,5	14,20	1,72	12,48
9,8	9,8	2,39	-	-

En lo que respecta a la asimilación oscura, su importancia respecto a la asimilación total era menor en las capas fotosintéticamente más activas (hasta 9,3 m) que la detectada en anteriores ensayos (menos de un 20 %), aunque inmediatamente por debajo de estas capas ya adquiría los valores típicos de las anteriores experiencias (por encima del 70 % de la asimilación total). La

incubación de botellas negras con concentraciones de nitrapirina (N-Serve) suficientes para inhibir la nitrificación se hizo para intentar distinguir la contribución de las bacterias nitrificantes a la asimilación oscura total. La importancia relativa de esta actividad aumentaba con la profundidad, aunque en términos absolutos esta actividad era mayor en las profundidades inmediatamente inferiores (9,4 y 9,5 m) a las de la máxima actividad fotosintética. Sin embargo, la veracidad de estos resultados está cuestionada, ya que las bacterias oxidadoras del amonio son aerobias estrictas y por lo tanto no debería haberse detectado esta actividad por debajo de la quimioclina.

- **Experiencia 5.-** Realizada también al final de la estratificación, de manera que se pudiera evitar el efecto de la temperatura sobre la tasa metabólica, siendo la luz el parámetro que fundamentalmente controla la fotoasimilación en estas condiciones. La muestra correspondiente a la profundidad donde se alcanzaba la máxima densidad de *Chromatium weissii* y *O. ornata* (9,2 metros), con concentraciones de clorofila *a* y bacterioclorofila *a* de 288 y 727 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ respectivamente, se incubó a distintas profundidades del lago, tanto botellas blancas como negras, con lo que se podían determinar las diferencias en la fotoincorporación de carbono inorgánico en función de la radiación luminosa incidente sobre la muestra (tabla 5-10).

Tabla 5.10.- Principales resultados de la experiencia de fotoasimilación potencial realizada en la Laguna de Arcas el día 1 de octubre de 1991 (experimento 5).

Table 5.10.- Main results of the potential photoassimilation experiment performed in Lake Arcas, October 1, 1991 (experiment 5).

PROF. INCUB. (m)	C _{ASIMILADO} BLANCA (mg C m ⁻³ ·h ⁻¹)	C _{ASIMILADO} NEGRA (mg C m ⁻³ ·h ⁻¹)	RENDIMIENTO NETO FOTOSINTÉTICO (B-N) (mg C m ⁻³ ·h ⁻¹)	% LUZ INCIDENTE EN PROF. INCUB.	MEDIA RADIACIÓN ZENITAL ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
2,5	885,73	126,38	759,35	16,00	173 ± 64,8
5	769,78	125,46	644,32	5,33	57,8 ± 21,6
7	642,08	123,87	518,21	2,40	26,0 ± 9,7
8,5	549,83	126,96	422,87	1,33	14,5 ± 5,4
8,8	590,96	169,13	421,33	1,16	12,6 ± 4,7
9	513,82	124,48	389,54	1,03	11,1 ± 4,2
9,2	441,81	108,81	333,00	0,40	4,3 ± 1,6
9,4	131,70	98,01	33,69	0,068	0,74 ± 0,28
9,6	129,69	98,90	30,79	0,024	0,25 ± 0,11
9,8	130,63	100,73	29,90	0,012	0,14 ± 0,05

A la hora de valorar los resultados obtenidos en este ensayo se debe ser cauteloso, ya que las intensidades de luz medidas corresponden a una integración de todas las longitudes de onda del espectro visible, pero de hecho la contribución de las diferentes calidades espectrales cambia con la profundidad en función de la absorción selectiva por parte de los organismos fotosintéticos,

enriqueciéndose en luz verde en profundidad. No obstante, aún teniendo esto en cuenta, se obtuvieron interesantes resultados. El carbono fotoasimilado es mayor cuanto menor es la profundidad y por tanto mayor la luz disponible, siguiendo una cinética de saturación (figura 5-13). Sin embargo, la intensa absorción de la luz por parte de la densa capa de procariotas fotótrofos situada a 9,2 m hace que por debajo de esta profundidad la fotoasimilación este muy mermada. Al incubar por encima de esta profundidad, si bien se incrementa el carbono fotoasimilado, dicho aumento es relativamente inferior al que se experimenta en la luz disponible. El cálculo del rendimiento cuántico relativo revela que este es máximo exactamente en la profundidad de incubación que corresponde a la de procedencia de la muestra, de manera que un incremento de la luz disponible (al incubar a menores profundidades) supone un aumento del carbono fotoasimilado pero una disminución de la eficiencia fotoasimiladora. Este resultado viene a corroborar el obtenido en la experiencia 3, confirmando que la composición pigmentaria de los organismos fotótrofos presentes en la interfase es la óptima para obtener el máximo rendimiento bajo el clima lumínico reinante y su adaptación a otras condiciones lumínicas requiere tiempos mucho más largos que los empleados durante las incubaciones para llevar a cabo los cambios pigmentarios pertinentes.

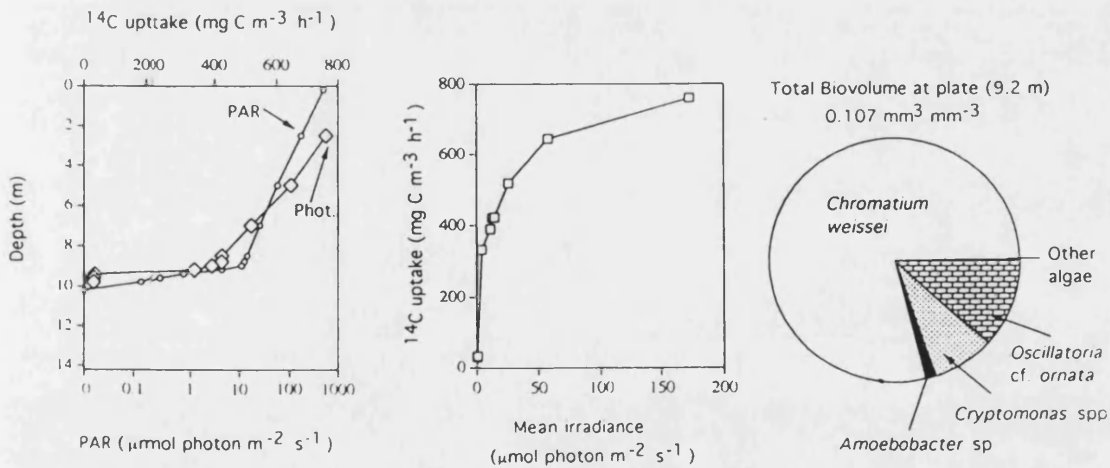


Figura 5.13.-- Perfil vertical de fotoasimilación de carbono inorgánico (Phot.) y de penetración luminosa (P/AR), curva fotosíntesis/luz y biovolumen de los microorganismos presentes en la muestra incubada en el experimento 5.

Figure 5.13 -- Vertical profile of inorganic carbon photoassimilation (Phot.) and light penetration, photosynthesis vs irradiance curve, and biovolume of microorganisms in the sample used in experiment 5.

El tratamiento de las curvas de fotosíntesis-luz en el sentido clásico utilizado para las poblaciones fitoplanctónicas, con cálculos de diversos parámetros característicos no es directamente utilizable en el caso de poblaciones tan estratificadas como las de la quimioclina de la Laguna de Arcas, ya que por ejemplo, la existencia de mezclas de pigmentos clorofílicos en los que los microorganismos difieren en cuanto a contenidos específicos y la distinta absorción específica de esos pigmentos en las diversas capas de agua de la laguna requeriría una serie de trabajos adicionales que no se han incluido en nuestro trabajo.

- **Fotoasimilación integrada.** La cubicación del volumen de las distintas capas de agua, basada en la batimetría de la laguna mostrada en el capítulo 2, permite fraccionar la fotoasimilación total en dos partes, la que tiene lugar en la parte mezclada de la laguna, y la que se realiza en la quimioclina, ya que en el hipolimnion profundo la fotoasimilación es nula debido a la ausencia de luz. En la tabla 5-11 se reflejan los resultados de estas integraciones para los dos fechas en las que los experimentos fueron más completos, esto es, el 3 y el 30 de septiembre de 1991, en los que se separa también la fotosíntesis oxigénica de la anoxigénica. Los cálculos efectuados abarcan el total de la laguna

A pesar de las elevadas tasas de fotoasimilación que durante la estratificación encontramos en la quimioclina, la contribución de la producción fotosintética de estas capas de la laguna se encuentra entre un 16-17 % de la fotoasimilación total en los momentos estudiados (de la cual una tercera parte es oxigénica, la mayoría en presencia de sulfhídrico), mientras que el resto tiene lugar en las capas mezcladas o de la termoclina de la laguna. Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta que en condiciones normales de estratificación la zona óxica supone un volumen aproximado de agua en torno a 2700 m³, mientras que la fracción fotosintéticamente activa de las aguas de la quimioclina sólo comporta una pequeña parte de los 300 m³ de agua que constituyen todo el hipolimnion de la laguna. Además debe tenerse en cuenta la limitación de la luz en estas zonas, de la que más tarde hablaremos, aunque los microorganismos que viven en ella presentan importantes adaptaciones a la vida en esas condiciones luminosas.

Durante el periodo de mezcla la fotoasimilación de carbono inorgánico en las aguas de la Laguna de Arcas es baja, con valores muy bajos que vienen determinados por las condiciones desfavorables para el desarrollo fitoplanctónico, con temperatura baja del agua y menor iluminación que durante el periodo de estratificación. No obstante durante la parte de la primavera previa a la estratificación los valores de fotoasimilación pueden probablemente ser más altos que los medidos por nosotros durante el mes de enero, en pleno periodo invernal, ya que las condiciones se hacen algo más favorables.

Tabla 5.11.- Fotoasimilación integrada en todo el volumen de agua correspondiente a la zona de mezcla y termoclina, y a la quimioclina de la Laguna de Arcas.

Table 5.11.- Integrated photoassimilation corresponding to the total volume of mixed and thermocline waters, as well as that corresponding to the chemocline waters in the whole Lake Arcas.

FECHA		FOTOSÍNTESIS NETA (g C h ⁻¹)	FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA (g C h ⁻¹)	FOTOSÍNTESIS ANOXIGÉNICA (g C h ⁻¹)
3/09/91	ZONA DE MEZCLA Y TERMOCLINA	20,68	20,68	0
	QUIMIOCLINA	4,02	1,26	2,76
30/09/91	ZONA DE MEZCLA Y TERMOCLINA	21,54	21,54	0
	QUIMIOCLINA	4,41	1,50	2,91

5.4.- DISCUSIÓN

5.4.1.- PENETRACIÓN DE LA LUZ Y PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

La atenuación de la luz y la modificación de sus características espectrales con la profundidad son características importantes de las masas de agua, las cuales se ven determinadas por la misma naturaleza del agua, los organismos fotosintéticos, otros elementos particulados y los compuestos solubles (Kirk, 1983, Gibson y Jewson, 1984). La penetración de la luz a las capas profundas de la laguna viene determinada por el desarrollo de densas poblaciones de microorganismos fotosintéticos en la quimioclina de la laguna. Durante el periodo de estratificación, la luz, que llegaba en el periodo de mezcla hasta el fondo de la laguna, resulta totalmente absorbida por las poblaciones de la interfase óxico-anóxica.

Las características espectrales de la luz que llega a la quimioclina son tales que sólo los organismos capaces de captar de forma eficiente la luz de 500-600 nm tienen garantizado un suministro de energía solar que les permita desarrollar su actividad fotosintética, siendo estas características espectrales un hecho relativamente común en sistemas lacustres estratificados (tabla 5-12). Esto supone que solo los microorganismos fotosintéticos adaptados para captar estas calidades cromáticas pueden formar importantes poblaciones en estas

condiciones, ya que cada pigmento fotosintético tiene una particular capacidad de captación de luz (figura 5-14).

Tabla 5.12.- Penetración de la luz en diversos lagos y sistemas sedimentarios que albergan microorganismos fotosintéticos (modificado de Van Gernerden y Mas, 1995).

Table 5.12.- Penetration of light in lakes and sediments inhabited by phototrophic microorganisms (modified from Van Gernerden and Mas, 1995)

Sistema	Profund.	Irradiancia (% de superf.)	Longitud de onda		Referencia
			max. (nm)	rango	
Lago Fidler (Tasmania)	2,6m	-	638	565-710	Croome & Tyler 1984b.
Fayetteville Green Lake (USA)	16,0m	882	460-510	404-630	Culver & Brunskill 1969.
	18,0m	36,5	460-520	404-630	
	18,5m	2,4	583	545-630	
Lago Mahoney (Canada)	superficie	100	675	400-700	Overmann <i>et al.</i> , 1991b.
	6,0m	8,8	584	513-626	
Lago Kinneret (Israel)	10,0m	0,75	550	450-650	Dubinsky & Berman 1979.
	16,5m	0,02	550	500-600	
Lago Vechten (Holanda)	2,0m	-	584	433-720	Steenbergen <i>et al.</i> , 1989.
	6,0m	-	586	483-706	
Lago Banyoles (España)	5,0m	23	540	440-630	Montesinos <i>et al.</i> , 1983.
	plate	0,6	540	480-580	
Lago Vilar (España)	3,0m	3,7	538	440-630	Montesinos <i>et al.</i> , 1983.
	5,5m	0,1	538	480-580	
Sedimento Bahía de San Francisco (USA)	0,7mm	4,7	>1000 ^(c)	725-1000	Jørgensen & Des Marais 1986.
Sedimento Guerrero Negro (Méjico)	1,2mm	4,3	>1000 ^(c)	875-1000	Jørgensen & Des Marais 1986.
Sedimento Limfjorden, Tapete Diatomeas (Dinamarca)	0,8mm	21,5	767	680-880	Lassen <i>et al.</i> , 1993.
Sedimento Limfjorden, Tapete Oscillatoria (Dinamarca)	0,5mm	42,8	761	700-860	Lassen <i>et al.</i> , 1993.

Es importante aquí distinguir dos conceptos que habitualmente se confunden, como es la adaptación, que supone un proceso evolutivo, de la aclimatación, esto es, la respuesta fisiológica a las condiciones cambiantes (Falkowski y LaRoche, 1991). Los organismos fotosintéticos pueden realizar respuestas fisiológicas a los cambios en las condiciones luminosas, tanto en cuanto a su concentración y tipo de pigmentos como en su ultraestructura (Imhoff, 1992), pero la capacidad de síntesis de los pigmentos fotosintéticos deriva de un proceso de adaptación. Estos

pigmentos que les permiten la captación de la luz disponible en la quimioclina de la Laguna de Arcas son la okenona en el caso de las cromatiaceas y la ficoeritrina en el de *Oscillatoria ornata*. También las criptofíceas tiene ficobilinas, aunque en su caso parecen estar más relacionadas con un papel como reserva de nitrógeno (Ojala, 1993b). El resto de las longitudes de onda del espectro visible ya han sido absorbidas en capas superiores, tanto por las poblaciones fitoplanctónicas, que aunque poco densas se extienden por un perfil vertical de agua de más de ocho metros, como por la materia en suspensión inerte y las propias moléculas del agua. Parkin y Brock (1980a) postularon que la calidad de la luz es el principal factor que determina la composición de las comunidades de bacterias fotosintéticas, si bien Borrego y colaboradores (1993) vieron que también la intensidad de la luz que llega podía ser un factor que determinara la aparición de unas u otras especies, como en el Lago de Banyoles, en el que las Cromatiaceas solo se empezaban a desarrollar cuando la luz que llegaba a la quimioclina superaba los $20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sin embargo, esta elevada intensidad luminosa rara vez se da en la Laguna de Arcas, donde dominan las Cromatiaceas, por lo que nuestros resultados difieren de los de estos últimos autores.

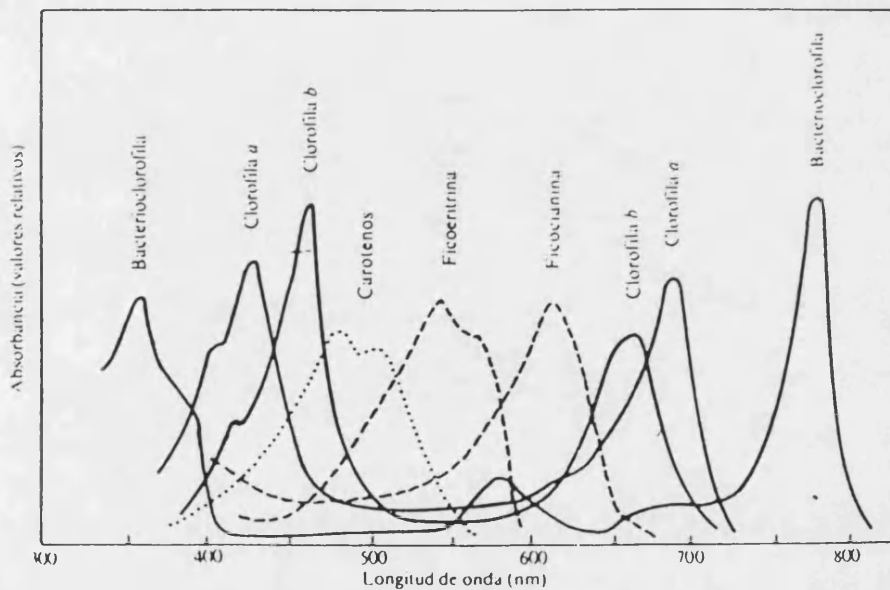


Figura 5.14.- Absorción *in vivo* de algunos pigmentos de organismos fotosintéticos.

Figure 5.14.- *In vivo* absorption spectra of different photosynthetic organisms pigments.

Por regla general, las poblaciones de Cromatiaceas que forman importantes poblaciones en los lagos presentan okenona como carotenoide principal (Guerrero *et al.*, 1987a, Van Gemerden y Mas, 1995). El caso de la Laguna de Arcas no es una excepción, estando basado en ese caroteno el sistema de captación de la luz de estas bacterias fotótrofas. Al compararse con los carotenos de otras Cromatiaceas, como la espiriloxantina, la okenona presenta una

estructura más parecida a la de los carotenos de las Clorobiaceas, clorobacteno e isorrenierateno, cuya estructura molecular les hace más eficientes en la captación de luz (Imhoff, 1992). Respecto a la concentración de bacterioclorofila, los valores máximos encontrados son bastante altos, en comparación con los descritos por Van Gemerden y Mas (1995), resumidos en la tabla 4-8, sin llegar a ser tan altos como los descritos en algunos lagos meromícticos canadienses (Hammer, 1994), aunque también la abundancia de Cromatiaceas está en la misma línea al ser una población bastante densa. En ese sentido es necesario prevenir sobre el uso de las concentraciones de pigmentos como medida de biomasa, ya que las concentraciones relativas de estos pueden cambiar en función del ciclo celular o de las condiciones ambientales, como la intensidad luminosa, banda espectral, etc. (Wilhem y Manns, 1991).

Pedrés-Alió y colaboradores (1983), al estudiar los factores que afectaban los cambios en la abundancia de pigmentos fotosintéticos en el Lago Cisó, concluyeron, por medio de análisis estadísticos, que la cantidad de luz era un factor esencial a este respecto para las Cromatiaceas, sin embargo, la cantidad de pigmentos presentes en las Clorobiaceas estaba determinada por la calidad espectral de la luz que les llegaba, que dependía a su vez de la población de Cromatiaceas que se encontraba por encima de ellas, lo que confirmaba los trabajos previos de Abellà y colaboradores (1980). Ese análisis estadístico señalaba también la temperatura y la biomasa de *Chromatium* como factores importantes en una mayor concentración de bacterioclorofila *a*, lo cual es fácilmente explicable si se tiene en cuenta que el *Chromatium* es más abundante en verano y que la cantidad de pigmentos, obviamente, tiene una relación con la cantidad de células.

La existencia de densas poblaciones de microorganismos en la quimioclina de la Laguna de Arcas, concretamente de *Cryptomonas* spp., *Oscillatoria ornata* y *Chromatium weissii* prácticamente hace inviable la existencia de poblaciones muy densas de Clorobiaceas, ya que esa múltiple capa de organismos actúa como una capa ópticamente densa y reflectiva, que absorbe o dispersa la radiación que le llega (Bowling y Tyler, 1986), y no deja pasar las calidades lumínicas que podrían ser captadas por estas bacterias. No obstante, aunque su tamaño poblacional no era muy grande, si se aprecia la presencia en aguas reductoras más profundas de *Pelodictyon clathratiforme*. Su aclimatación a las intensidades luminosas tan bajas que le llegan podría basarse no solo en la síntesis de una mayor cantidad de pigmentos antena, sino también en un mecanismo de alquilación que daría lugar a distintos homólogos de estos pigmentos, que optimizarían la eficiencia del complejo antena, lo cual fue recientemente descrito para las clorobiaceas (Borrego y García-Gil, 1994b, Borrego, 1996). Realmente, si hay un organismo fototrófico capaz de captar los últimos fotones que llegan por debajo de las densas poblaciones de la quimioclina, este organismo debe ser una Clorobiacea (Ormerod, 1992)

5.4.2.- FOTOASIMILACIÓN DE CARBONO EN EL PERFIL VERTICAL DE LA LAGUNA DE ARCAS.

Los experimentos realizados han tratado de dilucidar la importancia de la contribución de las poblaciones de la quimioclina al total de la producción fotosintética del lago en las fechas de estudio. Dado que la temperatura es un factor importante en el control de la producción, ya sea autotrófica o heterotrófica, en ecosistemas acuáticos (Lovell y Konopka, 1985a, Tilzer, 1989), así como en cultivos de bacterias fotosintéticas (Takahashi y Ichimura, 1970), es importante evitar ese efecto de la temperatura si queremos valorar el efecto sobre la fotoasimilación de carbono de los cambios de la intensidad y calidad de la luz en la columna de agua. En consecuencia, los experimentos realizados durante el periodo de estratificación se realizaron a final del verano o principio del otoño, periodo en el cual se mantiene la estratificación vertical de los microorganismos pero el gradiente de temperatura es muy reducido.

En la fecha en la que se realizó la primera experiencia, la laguna estaba a punto de mezclarse, por lo cual las poblaciones de organismos fotosintéticos habían perdido en gran parte su estructura estratificada. En este ensayo (tabla 5-6, figura 5-15), la máxima fotoasimilación medida en el epilimnion alcanzaba valores similares a los de la máxima asimilación a nivel de la quimioclina, donde la estratificación de las poblaciones fotosintéticas ya se encontraba muy alterada. A pesar de ello, cuando se incubaba una muestra de la parte intermedia del "plate" bacteriano (11,5 m) por encima de la interfase óxica-anóxica (10,8 m), con lo que se evitaba el efecto de sombra de los microorganismos acumulados en la misma, la fotoasimilación aumentaba considerablemente, pasando de una asimilación de $4,21 \text{ a } 17,62 \text{ mg}\cdot\text{C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, mientras que la luz que llegaba a la profundidad de incubación pasaba de $0,23 \text{ a } 2,95 \text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Esto demuestra que incluso en condiciones de débil estratificación de las comunidades fotosintéticas de la interfase, estas están fuertemente limitadas por la luz.

Cuando las incubaciones se realizaban durante el invierno (experimento 2), la fotoasimilación, tal como esperábamos, era muy baja, con lo que se confirma la hipótesis inicial de que la producción fotosintética durante el periodo invernal es prácticamente despreciable si la comparamos con la del periodo de estratificación (tabla 5-7, figura 5-16).

Durante el periodo de estratificación, la fotoasimilación se concentra principalmente a nivel de la quimioclina. Por regla general, las algas epilimnéticas eran menos abundantes en la parte superior de la zona óxica, lo que repercutía en una menor fotoasimilación en las aguas superficiales. Además, la fotoinhibición puede inhibir la fotosíntesis en las capas superiores de la laguna (Megard *et al.*, 1984, Meffert y Overbeck, 1985, Bower *et al.*, 1987). Las algas que crecen en las aguas epilimnéticas se sitúan a la profundidad en la que las

condiciones de luz son óptimas para su eficiencia fotosintética, lo que normalmente sucede varios metros por debajo de la superficie, precisamente donde encontramos las mayores tasas de fotoasimilación de toda la zona mezclada del lago.

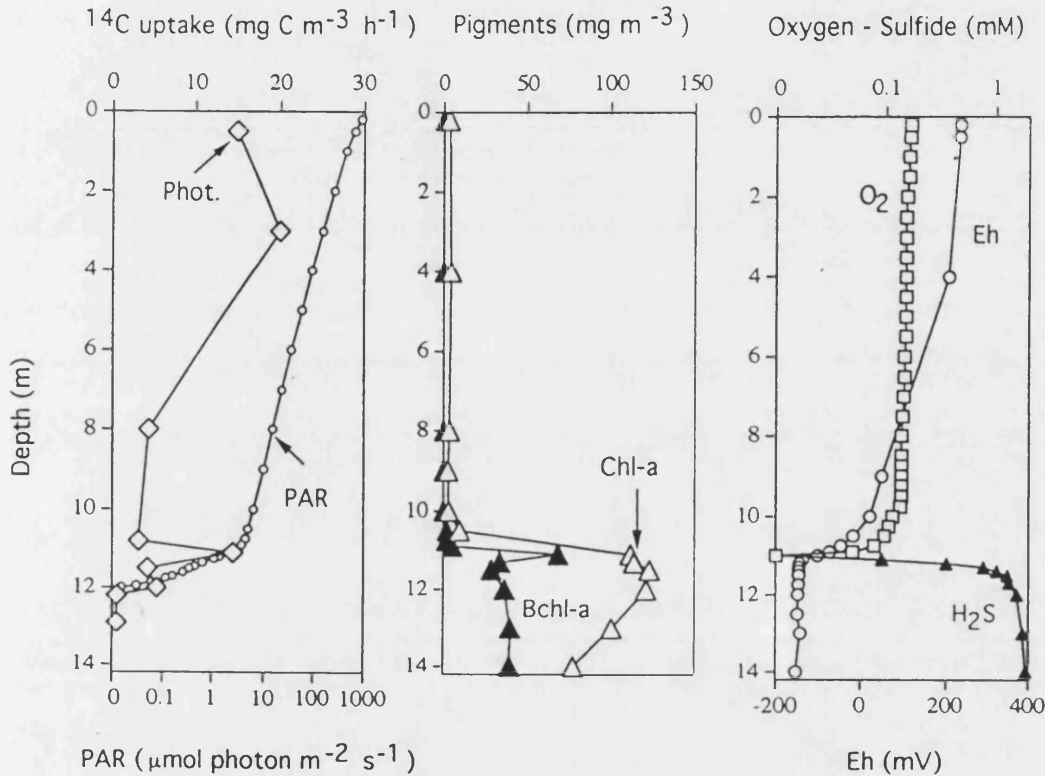


Figura 5.15.- Representación de los resultados de los experimentos de fotoasimilación (Phot.= fotoasimilación) realizados el 14 de octubre de 1989 (experimento 1), cuando la Laguna de Arcas tendía a su desestabilización.

Figure 5.15.- Results of the photoassimilation (Phot.= Photoassimilation) experiments performed on October 14, 1989 (experiment 1), when Lake Arcas was near to become mixed.

La inclusión de las incubaciones con DCMU en los experimentos permitió disociar la contribución de la fotoasimilación oxigénica de la anoxigénica a nivel de la quimioclina (Steenbergen y Van den Hoven, 1990). Así, el 3 de septiembre de 1991 (experimento 3, tablas 5-8 y 5-13), se encontró que en el ambiente microaerobio de la parte superior de la quimioclina sólo se daba fotosíntesis oxigénica, pero los valores de fotoasimilación eran relativamente bajos dado que las poblaciones de organismos fototróficos en esta profundidad no eran muy densas. En las primeras capas con presencia de sulfhídrico (8,7 m), donde el biovolumen de *Chromatium weissii* era muy similar a la suma de los biovolúmenes de *Oscillatoria ornata* y *Cryptomonas* spp., la fotosíntesis oxigénica (tabla 5-13) daba lugar a un 84 % del carbono fotoasimilado, lo que

deja bien claro que la fotosíntesis oxigénica sigue funcionando en esta profundidad en presencia de sulfhídrico (menos de 0,1 mM). Cuando se incubaba una muestra del "plate" de *Chromatium* (8.9 m) sólo se encontraba fotosíntesis anoxigénica, a pesar de la abundancia de *Oscillatoria ornata* y *Cryptomonas* spp. Sin embargo, cuando una muestra de la misma profundidad se incubaba en la parte superior de la quimioclina reaparecía la fotosíntesis oxigénica, que aportaba un 35 % del total del carbono fotoasimilado total, el cual se veía además muy incrementado pasando de $47,54 \text{ mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ a $271,97 \text{ mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, aunque a ello contribuía también el efecto de incremento de la temperatura. Asumiendo los resultados expuestos en el capítulo 6, según los cuales *O. ornata* es capaz de realizar eficientemente fotosíntesis oxigénica en aguas con sulfhídrico (Camacho *et al.*, 1996), la limitación de luz es una razón que explica mejor que la presencia de sulfhídrico la inhibición del PSII de las cianobacterias y, por ende, la ausencia de fotosíntesis oxigénica a 8,9 metros.

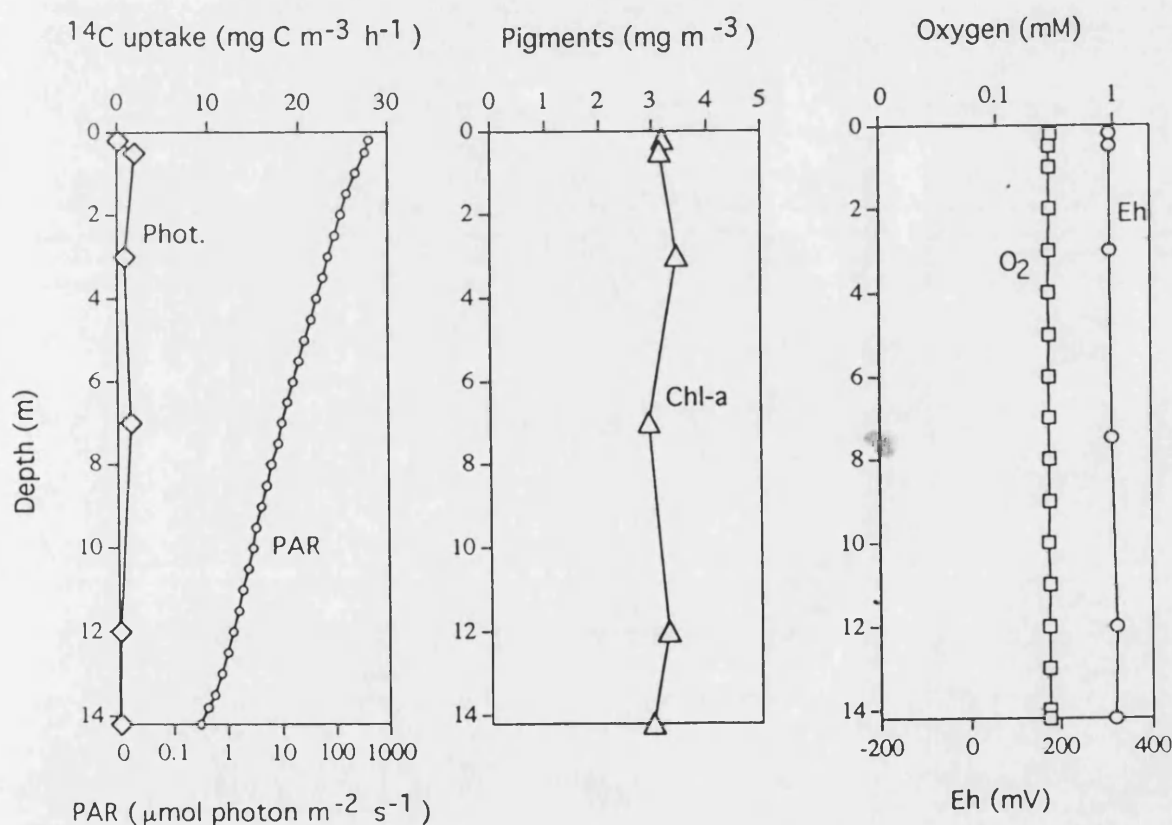


Figura 5.16.- Representación de los resultados de los experimentos de fotoasimilación (Phot. = fotoasimilación) realizados el 17 de enero de 1990 (experimento 2), durante el periodo de mezcla.
Figure 5.16.- Results of the photoassimilation (Phot = Photassimilation) experiments performed on January 17, 1990, during the mixing period.

Tabla 5.13.- Resultados de los experimentos de fotoasimilación realizados el 3 de septiembre de 1991 (experimento 3).

Table 5.13.- Results of the photoassimilation experiments performed on September 3, 1991 (experiment 3).

Sample Depth (m)	Incubation Depth (m)	Oxygen mg l ⁻¹	Sulfide mM	Chl <i>a</i> (mg m ⁻³)	Bchl <i>a</i> (mg m ⁻³)	Mean Irradiance at depth (μmol photon m ⁻² s ⁻¹)	¹⁴ C Oxygenic Photoassimilation (mg C m ⁻³ h ⁻¹)	¹⁴ C Anoxygenic Photoassimilation (mg C m ⁻³ h ⁻¹)
0.5	0.5	8.2	0	3.2	0	744 ± 665	3.52	0
7	7	7.3	0	9.9	0	43.2 ± 28.0	13.57	0
8.5	8.5	0.7	0	17.3	4.3	10.64 ± 6.76	8.87	0
8.7	8.7	0	0.07	179.4	202.8	4.62 ± 2.36	42.8	8.14
8.9	8.9	0	0.102	138.9	358.0	1.90 ± 0.91	0	47.54
8.9	8.6	0	0.102	138.9	358.0	6.81 ± 4.30	95.45	176.52

Los resultados de la experiencia 4 (tabla 5-9, figura 5-17), de esquema en parte similar al anterior, pero realizado a final del mes de septiembre, resultan especialmente interesantes dado que en ellos se puede descartar el efecto de la temperatura sobre la tasa fotosintética, puesto que el gradiente vertical de temperatura se hallaba muy debilitado, aunque la microestratificación de la comunidad fotosintética se mantenía en su máxima expresión.

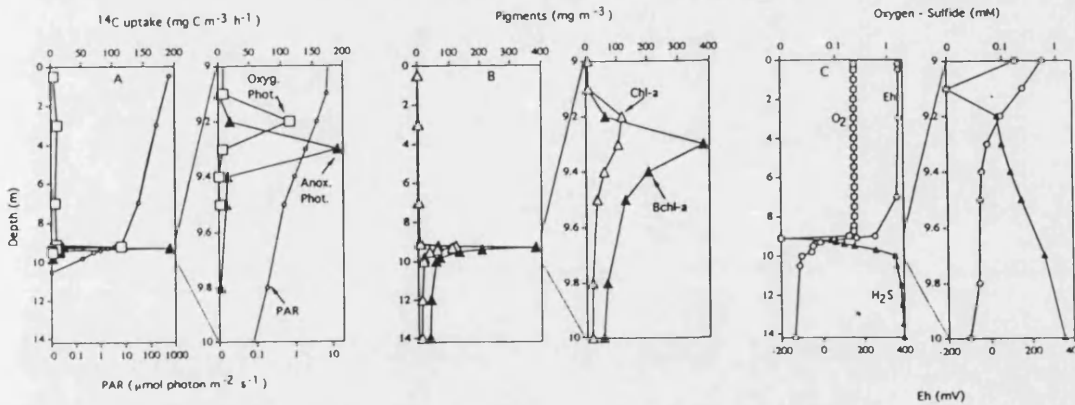


Figura 5.17.- Representación de los resultados de los experimentos de fotoasimilación realizados el 30 de septiembre de 1991 (experimento 4). La gráfica de la derecha de cada pareja amplía la escala de su gráfica contigua limitada a la zona de la quimioclina y circundante.

Figure 5.17.- Results of the photoassimilation experiments performed on September 30, 1991 (experimento 4) Right graph of each couple gives a detail of the chemocline zone and its surroundings.

En el experimento 4, los resultados obtenidos mostraban una baja tasa de fotoasimilación en la zona óxica de la laguna. (máximo de 10,36 mg C·m⁻³·h⁻¹ a 3 metros de profundidad). En la quimioclina se encontraba una fina capa (9,2-9,3

m) en la cual las tasas de fotoasimilación eran muy altas. A 9,2 m, con una contribución referida a biovolumen similar por parte de los tres microorganismos fotosintéticos principales (*Chromatium weissei*, *Oscillatoria ornata* y *Cryptomonas* spp.), el 86 % de la actividad fotosintética era oxigénica, mientras que a 9,3 m, donde el 84 % del biovolumen de organismos fotosintéticos se debía a *C. weissei*, el 96 % de la actividad fotosintética era anoxigénica. Por debajo de estas profundidades, a pesar de que se seguía detectando luz hasta los 10,1 m, la fotoasimilación medida era muy baja. Estos resultados confirman la limitación a la que se ven sometidos estos organismos en cuanto a la disponibilidad de luz, lo que se vio refrendado por el experimento 5, que se comenta más adelante.

5.4.3.- FOTOASIMILACIÓN INTEGRADA EN LAS DIFERENTES CAPAS DE LA LAGUNA E IMPORTANCIA DE LA FOTOSÍNTESIS EN LA QUIMIOCLINA.

Generalmente, las condiciones de anoxia se establecen en la Laguna de Arcas durante el periodo de estratificación entre los 8-9 metros de profundidad y el fondo de la laguna. Eso supone que la mayoría del volumen de agua del lago (en torno al 90 %) contiene permanentemente oxígeno disuelto, siendo las aguas microaerobias o anóxicas, en las que se concentran los organismos fotosintéticos, una pequeña parte del volumen de la laguna. Además, la fotoasimilación de carbono en estas zonas de la laguna sólo tiene lugar en la parte superior de la zona anóxica, debido a la fuerte atenuación y absorción selectiva de la luz por parte de las poblaciones fotosintéticas de la quimioclina, que deja en la oscuridad las aguas hipolimnéticas. Si bien la fotoasimilación medida por unidad de volumen en las aguas de la zona óxica es baja, las mismas constituyen la mayor parte del volumen de agua de la laguna. Por el contrario, aunque las tasas de fijación fotosintética de carbono son muy elevadas en las muestras de la interfase, dicha fotosíntesis se produce en un margen muy estrecho de profundidad, abarcando un volumen muy reducido de la laguna. En consecuencia, la fotoasimilación a nivel de la oxiclina, a pesar de las altas tasas puntuales, tiene una contribución relativamente baja a la productividad fotosintética total.

En la Laguna de Arcas, al integrar los valores de fotoasimilación obtenidos en las distintas profundidades durante el periodo de estratificación, la contribución de la zona de aguas óxicas de la laguna era de un 83-84 %. En la quimioclina, sólo tenía lugar un 16-17 % de la asimilación fotosintética, siendo de esta un 31-34 % oxigénica y la restante anoxigénica. Cabe destacar que la mayoría de la fotoasimilación oxigénica de la zona de la quimioclina tenía lugar en aguas sulfhídricas, lo que pone de manifiesto que al menos uno, o ambos, de los fotótrofos oxigénicos presentes en estas aguas no tiene su fotosistema II inhibido totalmente por el sulfhídrico. De nuevo hemos de remitirnos a lo expuesto en el capítulo 6, donde resulta evidente que en cultivos de laboratorio *O. ornata* es capaz de realizar de manera eficiente un proceso fotosintético oxigénico a las

concentraciones de sulfhídrico que se alcanzan en las capas superiores del hipolimnion de la Laguna de Arcas, por lo que sin duda también es capaz de hacerlo en la propia laguna. Además, la presencia de esta cianobacteria ocupando todo el hipolimnion anóxico, incluso migrando de las capas profundas del mismo hacia la quimioclina ((capítulo 6) sugiere que su viabilidad no se ve afectada por el sulfhídrico. Sin embargo, cuando se estudió la supervivencia de *Cryptomonas* spp. en muestras ricas en sulfhídrico, las células se inactivaban en un corto periodo de tiempo, lo que resulta un indicio de que su resistencia al sulfhídrico era menor que la de *O. ornata*. No por ello hemos de despreciar la importancia de la contribución de *Cryptomonas* spp a la fotoasimilación en la quimioclina, dado que estas algas normalmente alcanzan sus mayores densidades poblacionales en la parte superior de la quimioclina, donde por regla general las concentraciones de sulfhídrico, de estar presente este compuesto, son muy bajas. En algunos casos se ha demostrado que la aportación fotosintética de poblaciones de *Cryptomonas* spp. en condiciones microaerobias o anóxicas puede ser importante. Por ejemplo, en el Lago Haruna, poblaciones de este tipo contribuían aproximadamente con un 5 % a la producción primaria total del lago (Takahashi y Ichimura, 1969). En el Lago Buchensee (Overmann y Tilzer, 1989) entre el 3 y el 9 % de la producción primaria se debía a fotótrofos oxigénicos (*Cryptomonas ovata*, *Oscillatoria tenuis*, *Lynngbya limnetica* y cianobacterias unicelulares) que alcanzaban sus máximas densidades poblacionales en aguas microaerobias. En el Lago Cisó, *Cryptomonas phaseolus* alcanza un máximo metalimnético en la oxiclina (Gasol *et al.*, 1992b), migrando incluso hacia el hipolimnion rico en sulfhídrico durante la noche, donde la fijación de carbono es inhibida por este compuesto pero no otros procesos como la metabolización en la oscuridad de los carbohidratos acumulados (Gasol *et al.*, 1993). En este lago, *Cryptomonas phaseolus* aporta entre un 20 y un 40 % de la fijación total del carbono en la laguna, con valores máximos de un 63 % (Gasol *et al.*, 1990), aunque en el Cisó *Cryptomonas phaseolus* alcanza densidades poblacionales más altas que las encontradas para *Cryptomonas* spp en la Laguna de Arcas. Gervais (1997), basándose en estudios de laboratorio sobre la autoecología de varias especies de criptomonadales, sugirió que la adaptación a un medio con bajas intensidades luminosas es un factor importante en la dominancia de algunas especies de *Cryptomonas* en la quimioclina de lagos estratificados, aunque la osmotrofia podría ser una herramienta importante para el mantenimiento en la oscuridad de las poblaciones de estas criptofitas

Como también se ha podido demostrar en este trabajo (capítulo 6), en experimentos de laboratorio la cepa de *O. ornata* aislada de la Laguna de Arcas es capaz de realizar fotosíntesis anoxigénica con sulfhídrico como dador de electrones. Por tanto, no podemos descartar de antemano que esta cianobacteria contribuya *in situ* a la fotosíntesis anoxigénica realizada en la quimioclina. Sin embargo, *O. ornata* presenta importantes cantidades de ficoeritrina, pigmento que probablemente actúa como colector principal de la luz para este organismo en la quimioclina de la laguna, ya que la luz que llega es principalmente de la longitud

de onda que puede ser absorbida por esta ficobiliproteína. Dado que en las cianobacterias la luz captada por el complejo de ficobilinas se canaliza hacia el fotosistema II (Oren *et al.*, 1977) la contribución de *O. ornata* a la fotoasimilación a nivel de la quimioclina debe ser principalmente vía fotosíntesis oxigénica. También se ha demostrado en *Oscillatoria limnetica* aislada del Solar Lake (Cohen *et al.*, 1975b) que se requiere unas mínimas intensidades luminosas para realizar fotosíntesis anoxigénica, bastante más altas que las que alcanzan la quimioclina de la Laguna de Arcas.

Incluso admitiendo que la mayoría de la fijación fotosintética de carbono tiene lugar en la zona óxica, la fotoasimilación de carbono que tiene lugar a nivel de la quimioclina resulta importante en el mantenimiento de la cadena trófica de la parte anóxica de la laguna (Van Gernerden *et al.*, 1985). Por ejemplo, algunos ciliados pueden encontrar en *Chromatium weissii* y *Cryptomonas erosa* una fuente de alimento en la laguna (Finlay *et al.*, 1991, Guhl *et al.*, 1996). Además de esta fuente de carbono particulada, una parte del carbono fijado es excretado al medio, siendo una importante fuente de materia orgánica utilizable por microorganismos heterótrofos.

La extrapolación de valores de fotoasimilación obtenidos en incubaciones cortas a estimaciones de producción primaria diaria o incluso anual es en muchos casos una fuente de error (Talling, 1984, Harris, 1984). Además, a lo largo del día se producen variaciones en la productividad planctónica (Van Gernerden *et al.*, 1985, Prézelin, 1992). Estos motivos nos han disuadido de extrapolar nuestros valores, obtenidos en incubaciones cortas, que evitaban problemas metodológicos como el agotamiento de nutrientes o del sulfhídrico, a datos de producción primaria diaria o anual. Esto supone un problema a la hora de comparar nuestros resultados con los de la mayoría de los autores, que sí realizan este tipo de extrapolaciones, aunque la comparación de tasas por hora y de porcentajes queda como recurso final.

A pesar del evidente interés de los procesos de fijación fotosintética en la quimioclina de los lagos estratificados, el número de estudios realizados al respecto no es demasiado grande. En las tablas 5-14 y 5-15 se resumen algunos estudios de este tipo que se han encontrado en la literatura consultada en la elaboración de esta memoria, algunos de los cuales comentaremos con cierta extensión.

En los lagos japoneses estudiados por Takahashi e Ichimura (1968), la fotoasimilación en la zona reductora aportaba el 3-13 % de la producción primaria diaria. En el lago meromíctico norteamericano Fayetteville Green, las densas poblaciones de *Chlorobium phaeobacteroides* encontradas en zonas profundas del lago eran responsables de 83 % de la producción fotosintética anual (Culver y Brunskill, 1969). En el Solar Lake, en el que se encuentran densas poblaciones de Cromatiaceas, Clorobiaceas, y cianobacterias

filamentosas, hasta el 91 % de la producción fotosintética diaria se realizaba en el metalimnion y el hipolimnion (Cohen *et al.*, 1977a). En 1979, Biebl y Pfennig revisaron los estudios realizados hasta la fecha sobre la fijación anaerobia de carbono en 16 lagos, la mayoría de los cuales eran permanentemente estratificados (tabla 5-14). Sólo dos de ellos, Solar Lake y Smith Hole, ambos holomícticos a diferencia de la mayoría, presentaban tasas máximas de fotoasimilación superiores a las que encontramos en la quimioclina de la Laguna de Arcas. Ambos lagos presentaban un "plate" de *Chromatium* a una profundidad mucho menor (1-2 m) que el de nuestra laguna (8,5-9,5 m), teniendo una mayor disponibilidad de luz. En ellos, la contribución de los procariotas fotosintéticos a la producción primaria llega a ser de hasta un 91 %, porcentaje que excede ampliamente la contribución de la fotoasimilación de los microorganismos fotosintéticos de la quimioclina de la Laguna de Arcas.

Tabla 5.14.- Producción primaria atribuible a las bacterias fotosintéticas del azufre en diferentes lagos, determinada en el periodo de máxima actividad (modificado de Biebl y Pfennig, 1979)

Table 5.14.- Primary production of phototrophic sulfur bacteria in several lakes, measured during the period of maximum activity (modified from Biebl and Pfennig, 1979)

Regimen de estratificación	Lago	Producción de las bacterias fotosintéticas en la profundidad de máxima fotoasimilación.		Referencia
		mg C·m ⁻³ ·d ⁻¹	mg C·m ⁻³ ·h ⁻¹	
Holomíctico capa en el fondo	Haruna	50	4.2	Takahashi & Ichimura 1968
	Muliczne	90	7.5	Czeczuga 1968b
Holomíctico "plate"	Plußsee	35	2.9	Biebl 1973
	Wadolek	20	1.7	Czeczuga 1968b
		160	13	
	Smith Hole	5700	475	Wetzel 1973
Meromíctico, "plate"				
De agua dulce	Valle de San Juan	190	16	Romanenko <i>et al.</i> , 1976
	Belovod	50	4	Sorokin 1970
		300	25	Lyalikova 1957
	Fayetteville Green	1600	133	Culver & Brunskill 1969
De agua salada	Lago Faro	60	5	Sorokin & Donato 1975
	Suigetsu	65	5.5	Takahashi & Ichimura 1968
	Kisaratsu Reservoir	1000	83	Takahashi & Ichimura 1968
	Pomyaretskoe	85	7	Gorlenko <i>et al.</i> , 1974a
	Veisove	360	30	Gorlenko <i>et al.</i> , 1974b
	Repnoe	160	13	Gorlenko <i>et al.</i> , 1973
Medicine L.	2000	166	Hayden 1972	
Monomíctico, "plate"	Solar Lake	5000	416	Cohen <i>et al.</i> , 1977a

Tabla 5.15.- Producción primaria anual de las bacterias fotosintéticas del azufre en diversos lagos.

Table 5.15.- Annual productivity of phototrophic sulfur bacteria in various lakes.

Sistema	Organismo (s)	Productividad		Referencia
		(g C·m ⁻² ·y ⁻¹)	(% total)	
Fayetteville Green (USA)	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	239	83	Culver & Brunskill 1969.
Smith Hole (USA)	<i>Chromatium</i> sp.	35	50	Wetzel 1973.
Waldsea (Canada)	<i>Chlorobium</i> sp.	32	46	Lawrence <i>et al.</i> , 1978. Parker <i>et al.</i> , 1983.
Deadmoose Lake (Canada)	<i>Lamprocystis roseopersicina</i>	14	17	Parker <i>et al.</i> , 1983. Parker & Hammer 1983.
Big Soda Lake (USA)	<i>Ectothiorhodospira vacuolata</i>	50	10	Cloern <i>et al.</i> , 1983.
Knaack Lake (USA)	<i>Pelodictyon</i> sp. <i>Clathrochloris</i> sp.	17	5	Parkin & Brock 1981a.
Mittlerer Buchensee (Alemania)	<i>Amoebobacter purpureus</i> <i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i>	-	4	Overmann & Tilzer 1989.
Lake Vechten (Holanda)	<i>Chloronema</i> sp. <i>Thiopedia</i> sp. <i>Chromatium</i> sp.	6	3,6	Steenbergen 1982. Steenbergen & Korthals, 1982
Valle San Juan (Cuba)	<i>Amoebobacter roseus</i> <i>Pelodictyon phaeum</i>	14	3	Romanenko <i>et al.</i> , 1976.
Lago Cisó (España)	<i>Amoebobacter</i> sp. <i>Chromatium minus</i>	56	25	Garcia-Cantizano 1992.

Posteriormente a la revisión de Biebl y Pfennig se hicieron algunos estudios en el mismo sentido. Parkin y Brock (1981a) estimaron que el 95 % de la producción del lago meromítico Knaack era algal, a pesar de las elevadas poblaciones de Clorobiaceas (hasta 800 mg·m⁻³ de bacterioclorofila *d*) presentes en la quimioclina, aunque era destacable que la mayoría del carbono fijado por las algas era remineralizado antes de llegar a los sedimentos, estando constituida la fracción particulada que llegaba a los mismos en un 20 % por materia fijada por las Clorobiaceas. Esto es importante, puesto que la descomposición en ambiente anaerobio y reductor es más lenta e incompleta que en la zona aerobia del lago, por lo que la relevancia de la asimilación de carbono a nivel de las interfases óxico-anóxicas de los lagos deberá tenerse en cuenta como un factor importante para el mantenimiento de la estructura trófica de las aguas anaerobias. Estos mismos autores (Parkin y Brock, 1980b) midiendo la producción primaria en 6 lagos de Norteamérica que presentaban poblaciones de bacterias fotosintéticas, en los que éstas aportaban entre 0,26-6,3 % de la producción primaria diaria, concluyeron que la producción bacteriana venía determinada por la intensidad luminosa, independientemente de las concentraciones de sulfhídrico. Mirror Lake

fue uno de los lagos incluidos en su estudio, y en el encontraron densas poblaciones metalimnéticas de *Oscillatoria* en aguas microaerobias (nunca con sulfhídrico), pero tanto la fotoasimilación total en el "plate" bacteriano como la fotosíntesis de esta cianobacteria alcanzaron valores muy inferiores a los medidos en la Laguna de Arcas. En el lago Vechten se encontraron también tasas de fotosíntesis anoxigénica relativamente bajas ($12.3 \text{ mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$), aportando las bacterias fotosintéticas del azufre entre 3,9-17,5 de la producción primaria diaria y un 3,6 % de la anual (Steenbergen y Korthals, 1982). La población de *Amoebobacter purpureus* del Lago Mahoney, en Canadá, la más densa jamás descrita hasta la fecha (Overmann *et al.*, 1991b), aportaba un 40 % de la producción fotosintética, si bien las máximas tasas de fotoasimilación que se citan en ese lago (Hall y Northcote, 1990) son inferiores a las medidas en la Laguna de Arcas. El lago Zaca, un lago templado monomítico de California, presenta una población de *Thiopedia rosea* distribuida en todo el hipolimnion, con concentraciones máximas de bacterioclorofila *a* comprendidas entre 83 y 203 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$, pero únicamente la parte superior de la población, a la que llega menos del 1 % de la radiación incidente está fotosintéticamente activa, con valores máximos de fijación de carbono de $7,20 \text{ mg}\cdot\text{C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ que suponen una contribución de la producción hipolimnética de solo un 8 % de la producción total, a pesar de que el hipolimnion anóxico puede llegar a ocupar el 52 % del volumen del lago (Fiolt *et al.*, 1989). En Deadmoose Lake (Parker y Hammer, 1983), *Lamprocystis roseopersicina* era el principal componente de la comunidad fotosintética bacteriana, aportando un 17,1 % de la producción primaria total, que era también muy inferior a la de Arcas. Lindholm y Weppling (1987) encontraron valores máximos de fotoasimilación de $180 \text{ mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, en las aguas de color púrpura de la quimioclina del Lago Holmsjön, que son sólo ligeramente inferiores a las máximas tasas medidas por nosotros. En el Buchensee, un lago alemán poco productivo, la contribución de las bacterias fotosintéticas del azufre (Cromatiaceas y Clorobiaceas) era tan sólo de un 4 %, debido a la poca disponibilidad de luz en las capas en las que se encuentran (Overmann y Tilzer, 1989). Aun menor es la contribución de las bacterias fotosintéticas a la producción primaria del Lago Kinneret, donde *Chlorobium phaeobacteroides* apenas aporta el 1 % de la producción primaria total (Butow y Bergstein-Ben Dan, 1992). En el Lago Cisó, las bacterias fotótrofas aportan un 33 % de la fijación de carbono total en invierno (cuando toda la laguna permanece anóxica) y un 21 % en verano (Gasol *et al.*, 1990), aunque los valores absolutos de fotoincorporación de carbono eran inferiores a los encontrados en la Laguna de Arcas. Van Gemerden y Mas (1995) recopilaron los estudios sobre fotoasimilación por parte de las bacterias fotosintéticas en la naturaleza, encontrando una buena correlación entre la luz que llegaba a estas poblaciones y la fotoasimilación de carbono, y corroborando las conclusiones obtenidas previamente por Parkin y Brock (1980b)

En conclusión, cuando se compara los valores de fotoasimilación de la Laguna de Arcas con los recogidos en la bibliografía parece claro que las tasas de

fotoasimilación en la quimioclina de Arcas se encuentran entre las más altas medidas hasta la fecha. Las altas densidades poblacionales de microorganismos fotosintéticos en la quimioclina, su gran eficiencia en la captación de luz y la importante contribución de la fotosíntesis oxigénica en presencia de sulfhídrico son algunas de las razones que explican estas elevadas tasas. Sin embargo, la contribución de la fotoasimilación que tiene lugar en la quimioclina respecto a la fotoasimilación total en el lago no es muy grande, debido principalmente al estrechísimo rango de profundidades en el que tiene lugar, en comparación con un volumen mucho mayor de aguas ricas en oxígeno, aunque las tasas de fotoasimilación en esa amplia zona sean mucho más bajas.

5.4.4.- LA INTENSIDAD Y CALIDAD DE LUZ COMO FACTOR LIMITANTE DE LA FOTOSÍNTESIS

La luz es generalmente aceptada como el principal factor que controla la fotoasimilación en las poblaciones metalimnéticas (Parkin y Brock, 1980b, Van Gemerden *et al.*, 1985), así como la composición y estratificación en las comunidades fotosintéticas en capas profundas de los lagos estratificados (Vila *et al.*, 1996). En la Laguna de Arcas, esta limitación resulta clara tras el experimento consistente en incubar una muestra procedente del "plate" a distintas profundidades. Los lagos en los que la contribución de las bacterias fotosintéticas del azufre a la fotoasimilación total es grande tienen en común que presentan una alta disponibilidad de luz en la quimioclina (al menos 5-10 % de la luz incidente en superficie), estando en muchos casos estas poblaciones en la proximidad de la superficie (Montesinos y Esteve, 1984). En la Laguna de Arcas, a diferencia de lo comentado, la luz que llega a la quimioclina suele estar entre el 0,5 y el 1 % de la que llega a la superficie.

En las curvas de fotosíntesis y profundidad respecto a la intensidad luminosa aparecen dos pendientes diferentes (figura 5-13). A partir de la quimioclina las pendientes de las curvas de penetración de la luz y de fotoasimilación se hacen más abruptas, debido a la fuerte atenuación de la luz por las densas capas de microorganismos fotosintéticos presentes. Esta absorción no era sólo importante en cantidad, sino también en calidad, ya que la mayoría de la radiación fotosintéticamente activa era absorbida en la quimioclina por los complejos pigmentarios captadores de luz de los microorganismos (principalmente por la okenona de las Cromatiaceas y la ficoeritrina de *O. ornata*), de manera que los fotones que quedaban tras atravesar esas capas apenas eran utilizables para la fotosíntesis. Como consecuencia, las altas tasas de fotoasimilación sólo aparecían en los 20-30 cm superiores de la quimioclina, reduciéndose extremadamente en las capas inferiores.

Cuando la luz resulta un factor limitante, la coexistencia de poblaciones de diferentes microorganismos en un mismo ambiente puede darse si estos son

capaces de utilizar diferencialmente la luz de las distintas calidades cromáticas disponibles (Abellà *et al.*, 1980). La absorción de la luz por parte de la okenona, carotenoide principal de *Chromatium weissii*, y por la ficoeritrina de *O. ornata*, es máxima en el rango amarillo-verde del espectro lumínico (Vila y Abellà, 1994, Vila *et al.*, 1996). En este rango se encuentran la mayoría de los fotones que alcanzan la quimioclina, dada la absorción del resto de bandas espectrales por el agua, las partículas inorgánicas y sobre todo por las poblaciones algales en las capas superiores de la laguna. Por debajo de las poblaciones fotosintéticas de la quimioclina, la ventana espectral de la luz es todavía más restringida, llegando además una menor cantidad de fotones, lo que da como consecuencia un gran descenso en la fotoasimilación de carbono, a pesar de las densas poblaciones que todavía se pueden encontrar. En estas condiciones, incluso el aumento de la síntesis de bacterioclorofilas, que fue propuesto como una solución alternativa en poblaciones naturales de *Chromatium okenii* (Fischer *et al.*, 1996), no sería suficiente para mantener una alta tasa de fotosíntesis dada la baja disponibilidad de luz, que probablemente no satisface los requerimientos mínimos de *Chromatium*. (Van Gemerdèn, 1980), puesto que en los lagos la estrategia de captación de luz está basada principalmente en los carotenos (Imhoff, 1992).

La absorción específica de la luz por parte de los complejos pigmentarios explica no sólo el descenso en la fotoasimilación total de carbono bajo el “plate” bacteriano, sino también la activación de la fotosíntesis oxigénica cuando una muestra del “plate” se incubaba en la parte superior de la quimioclina. A la profundidad en la que se encuentra la máxima densidad poblacional de *Chromatium weissii*, y en la que la población de *O. ornata* también es muy importante, la mayoría de la luz que puede ser captada por la ficoeritrina ha sido absorbida por las poblaciones de *O. ornata* y *Cryptomonas* spp. situadas más arriba, lo que no ocurre cuando ésta muestra se incubaba por encima de dichas poblaciones. En consecuencia, cuando situamos la muestra del “plate” bacteriano, que también contiene muchas cianobacterias, por encima de la oxiclina, la disponibilidad de luz que puede ser captada por la ficoeritrina es mucho mayor. Como ya se comentó anteriormente, la luz captada por las ficobilinas se canaliza a través del fotosistema II (Oren *et al.*, 1977, Sagert y Schubert, 1995), con lo que al aumentar mucho la luz susceptible de ser captada por estos pigmentos se activa la fotosíntesis oxigénica, resistente al sulfhídrico en *O. ornata* (ver capítulo 6), ya que la captación por parte de la clorofila resulta ineficiente a esas intensidades de luz. Además, la fotosíntesis anoxigénica, que se debe mayoritariamente (o probablemente en su totalidad) a las bacterias fotosintéticas del azufre, también se ve muy potenciada con la nueva ubicación de la muestra, lo que confirma que en la profundidad de máxima concentración de bacterias fotosintéticas, es la luz, y no el sulfhídrico, el factor limitante de la fotoasimilación anoxigénica de carbono, resultados similares a los previamente obtenidos en el Lago Cisó (Guerrero *et al.*, 1985a; Montesinos, 1987), aunque en otros casos, como en el Lago Mahoney, la fotosíntesis de las bacterias

fotosintéticas (*Amoebobacter purpureus*) puede llegar a estar limitada por el sulfhídrico en la época estival (Overmann *et al.*, 1994).

La cinética de saturación que se desprende de la curva fotosíntesis-luz confirma que existe una limitación lumínica severa que afecta a los microorganismos fotosintéticos de la quimioclina de la Laguna de Arcas (figura 5-13). Sin embargo, al comparar la fotoasimilación máxima alcanzada en condiciones de óptima iluminación con la que tiene lugar *in situ* en la profundidad del máximo bacteriano, vemos que esta última representa un 44 % de la capacidad fotosintética máxima, mientras que la disponibilidad de luz en el máximo poblacional de la quimioclina sólo es de un 2.5 % de la intensidad máxima ensayada. Este hecho pone de manifiesto que las poblaciones de microorganismos que se sitúan en la quimioclina están muy bien adaptadas a la luz que llega a la profundidad en la que viven.

Por último, debe reseñarse que los microorganismos aquí estudiados no se hallan anclados en las profundidades en las que nosotros los encontramos, sino que todos ellos disponen de algún mecanismo que les permite una cierta movilidad en la columna de agua. Así, tanto *C. weissei* como *Cryptomonas* spp. poseen flagelos que les permiten nadar libremente. Por su parte, *O. ornata*, siguiendo una estrategia muy ventajosa que se da en otras poblaciones metalimnéticas de cianobacterias (Utkilen *et al.*, 1985a), es capaz de formar vacuolas de gas, lo que juntamente con la capacidad de acumular sustancias polisacarídicas que actúan como lastre, controla su flotabilidad (Kromkamp y Konopka, 1986). Ambos mecanismos les sirven a estos microorganismos para optimizar su posición en la columna de agua, de manera que puedan encontrar las mejores condiciones para el crecimiento, ya que estas pueden cambiar incluso en cuestión de horas a la altura de la quimioclina de un lago estratificado. Esto les puede suponer a estos organismos buscar lugares en la columna de agua en los que no exista una excesiva descompensación en los factores ecológicos que determinan el desarrollo de sus poblaciones, sacrificando las condiciones óptimas de algunos de ellos en aras a conseguir unos niveles mínimamente aceptables de otros factores.

5.4.5.- ASIMILACIÓN OSCURA.

La asimilación de carbono en condiciones de oscuridad alcanza valores muy importantes en las medidas efectuadas en la quimioclina. En ellas, los valores de asimilación de carbono marcado en las botellas oscuras alcanzan en ocasiones valores comprendidos entre el 60 y el 80 % de los valores de obtenidos en las botellas blancas, lo que supone que a estas profundidades la asimilación quimioautotrofa puede llegar a ser tan importante como la fotosintética.

Sin embargo, al realizar un perfil detallado de fotoasimilación, como el realizado el 30 de septiembre, cuando las condiciones para los microorganismos

fotosintéticos de la interfase aún son buenas, observamos que en las capas fotosintéticamente activas la importancia de la asimilación oscura respecto a la total es mucho menor (alrededor del 20 %), siendo por debajo de estas capas donde aumenta mucho su importancia relativa hasta alcanzar los valores antedichos, ya que la fotoasimilación prácticamente se hace cero y la actividad quimioautotrofa se mantiene.

Tabla 5.16.- Contribución de la asimilación oscura de carbono inorgánico respecto a la asimilación total, el día 30 de septiembre de 1991 (experimento 4).

Table 5.16.- Contribution of dark inorganic carbon uptake to the total assimilation at the different depths, September 30, 1991, (experiment 4).

PROF. MUESTRA (m)	MEDIA RADIACIÓN ZENITAL ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	C _{ASIMILADO-NEGRA/BLANCA} %
0,5	596 ± 22	10,9
3	182,7 ± 6,7	3,4
7	34,6 ± 1,2	7,9
9,1	7,31 ± 0,27	13,0
9,2	3,85 ± 0,14	10,7
9,3	1,92 ± 0,07	20,2
9,4	0,98 ± 0,04	85,5
9,5	0,52 ± 0,02	79,9
9,8	0,183 ± 0,006	77,9

El uso de inhibidores de la nitrificación, como la nitrapirina (Hall, 1984, Hall y Jeffries, 1984)), pone de manifiesto que esta actividad podría ser responsable de una buena parte de la asimilación oscura a nivel de la quimioclina. Sin embargo, los resultados obtenidos nos hacen dudar de si este inhibidor no podría actuar sobre otros procesos como la oxidación anaerobia del azufre, ya que la nitrificación es un proceso aerobio, y en base a nuestros resultados, la inhibición de la asimilación oscura por la nitrapirina se da también en aguas anóxicas. Por tanto, esta actividad concreta debería evaluarse con otros métodos, como la medición de los balances de nitrato y amonio.

La actividad quimiosintética aparece en ocasiones asociada a las zonas de transición con elevados gradientes de potencial de óxido-reducción. Quizá el caso mejor estudiado sea el del Mar Negro, donde este tipo de actividad resultaba muy importante en la zona del gradiente redox, siendo casi inapreciable por debajo (Sorokin *et al.*, 1995). En el Solar Lake (Jørgensen *et al.*, 1979a), la fijación oscura era máxima en la quimioclina, en la zona de coexistencia del oxígeno con el sulfhídrico y el tiosulfato, por lo que estos autores lo atribuían a microorganismos del ciclo del azufre, en concreto *Thiobacillus* termófilos. Børshheim y colaboradores (1985) también encontraron un máximo de asimilación oscura de carbono en la quimioclina del un lago meromítico noruego. En la

Laguna de Arcas, la asimilación de carbono en las botellas negras (tabla 5-9) también resultaba máxima en la zona de la quimioclina, reduciéndose considerablemente en las aguas más profundas. Este hecho resulta de gran relevancia, ya que por un lado permite considerar la importancia del carbono asimilado no fotosintéticamente en la interfase, pero también aclara que la principal contribución de este proceso tiene lugar en un reducido volumen de agua como es la zona circundante de la interfase óxica-anóxica, siendo mucho más reducida, en términos relativos, la aportación del resto del hipolimnion. En nuestro caso podría también pensarse en microorganismos quimiolitotrofos anaerobios como el oxidador del azufre *Thiobacillus denitrificans*, como responsables de parte de esa asimilación oscura de carbono, aunque esto sería principalmente a nivel de la redoxclina y no en los redox tan bajos del hipolimnion. En el Lago Cisó, a diferencia de los anteriores, no se encontró un patrón claro en la distribución vertical de esa asimilación oscura, cuyos valores máximos eran de $50 \text{ mg C}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, que podían suponer un 50-60 % de la asimilación total de carbono (Gasol *et al.*, 1990). En el caso de la Laguna de Arcas, la contribución de la asimilación fotosintética, que demostró alcanzar los máximos valores en la quimioclina, es aún más elevada en términos absolutos, aunque su importancia relativa es menor que en el Cisó.

CAPÍTULO 6

ECOFISIOLOGIA DE LAS CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS DE LA LAGUNA DE ARCAS

6.1.- INTRODUCCIÓN

El sulfhídrico es un compuesto fuertemente reductor que resulta tóxico para la mayoría de los organismos fotosintéticos oxigénicos, dado que inhibe el fotosistema II (Oren *et al.*, 1979). Sin embargo, algunas cianobacterias proliferan en ambientes que presentan una elevada concentración de esta sustancia (Castenholz, 1977, Cohen *et al.*, 1977a). Nakamura (1938) fue el primero en observar el crecimiento de *Oscillatoria* a la concentración de 1 mM de sulfhídrico, sin producción de oxígeno y con la deposición extracelular de gránulos de azufre, sugiriendo un posible uso fotosintético del sulfhídrico por este organismo, lo que fue apoyado por Stewart y Pearson (1970) y Castenholz (1973). En cianobacterias, la fotosíntesis anoxigénica usando sulfhídrico como dador electrónico fue demostrada por primera vez en *Oscillatoria limnetica*, aislada del Solar Lake, en la península del Sinaí (Cohen *et al.*, 1975a,b). Esta capacidad se vio refrendada en estudios con cultivos de cianobacterias procedentes de otros ambientes como fuentes termales (Castenholz, 1976, Castenholz, 1977), medios hipersalinos (Jørgensen *et al.*, 1986), y tapetes microbianos costeros (De Wit y Van Gemerden, 1987a, De Wit *et al.*, 1988). Con el mismo tipo de experiencias se pudo incluso demostrar que existían grandes diferencias en la adaptación al sulfhídrico entre diferentes cepas de *Oscillatoria amphigranulata* aisladas en manantiales termales, en función del contenido en sulfhídrico de la fuente de la que provenían (García-Pichel y Castenholz, 1990). Cohen y colaboradores (1986) revisaron los mecanismos utilizados por las cianobacterias para tolerar la presencia de sulfhídrico, cuyas posibilidades van desde una relativa insensibilidad del PSII al sulfhídrico, hasta la fotosíntesis anoxigénica utilizando este compuesto como dador electrónico del PSI, o incluso la operación simultánea o alternativa de ambos tipos de fotosíntesis.

Como ya se expuso en un capítulo anterior, durante el periodo de estratificación térmica, la cianobacteria *Oscillatoria ornata* forma densas poblaciones en las aguas hipolimnéticas ricas en sulfhídrico de la Laguna de Arcas. Además de esta especie, se aislaron otras dos cianobacterias filamentosas que aparecen de forma ocasional, con muy bajas densidades poblacionales, en las aguas de la laguna. Estas dos cianobacterias fueron identificadas como *Oscillatoria tenuis* y *Pseudanabaena* sp. respectivamente, la primera aparecía exclusivamente en el epilimnion y la segunda a veces también en aguas anóxicas.

En este capítulo se expone el estudio de las adaptaciones de la actividad fotosintética de estos microorganismos a la vida en aguas anóxicas ricas en sulfhídrico, estudiando la respuesta de su actividad fotosintética a distintas concentraciones de este compuesto. Los resultados de este capítulo, unidos al resto del trabajo de la tesis, permiten aventurarnos a construir un modelo conceptual del modo de vida de *Oscillatoria ornata* en la Laguna de Arcas, apoyándonos además en resultados de otros investigadores en estudios sobre las capacidades metabólicas de cianobacterias procedentes de ambientes sulfurosos.

6.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1.- MOVILIDAD Y FLOTACIÓN DE *Oscillatoria ornata*

El uso de trampas de sedimentación en la Laguna de Arcas permitió poner de manifiesto un interesante comportamiento de las poblaciones de *Oscillatoria ornata*. Las trampas utilizadas fueron diseñadas de acuerdo con lo descrito por Pedrós-Alió y colaboradores (1989), mostrándose su diseño en las figuras 6-1 y 6-2.

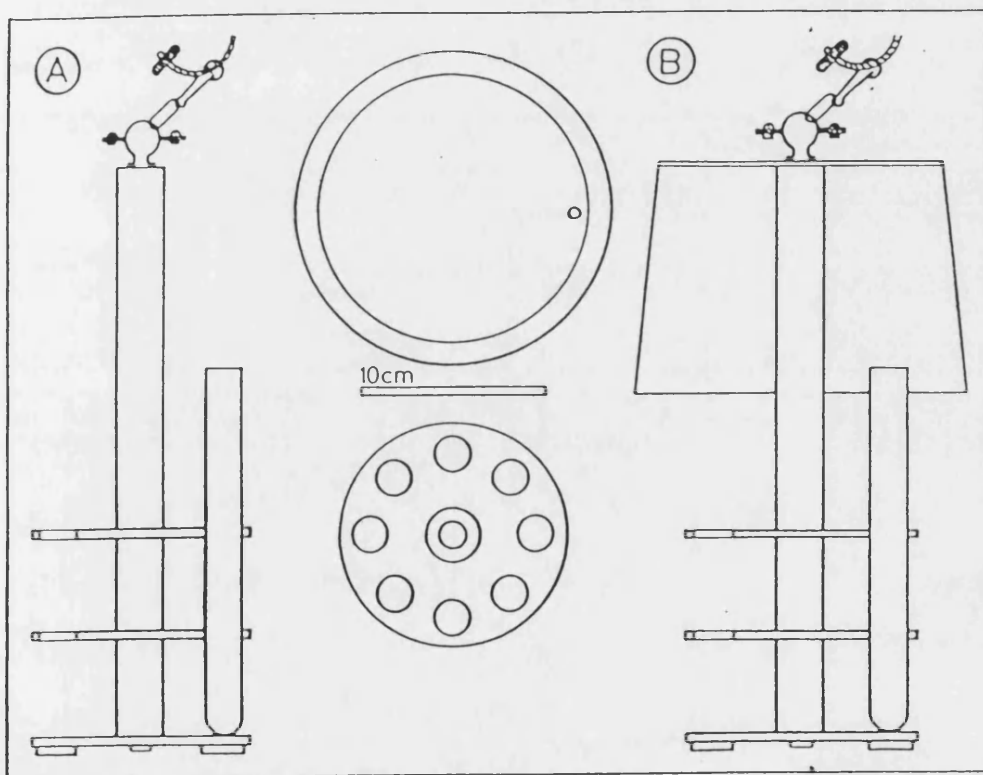


Figura 6.1.- Esquema del diseño de las trampas de sedimentación. A) Trampa sin cubierta B) Trampa con cubierta (Tomado de Pedrós-Alió *et al.*, 1989).

Figure 6.1.- Design of sedimentation traps. A) Uncovered trap B) Covered trap. (From Pedrós-Alió *et al.*, 1989).

Algunas de las trampas de sedimentación colocadas en la laguna eran cubiertas en su parte superior, a nivel del final de los tubos, por una cubierta de plástico, a modo de sombrero, de manera que evitaba que en los tubos cayera el material sedimentado directamente de las capas superiores, entrando sólo aquel material que era impulsado por flujos de agua en circulación turbulenta. Además, aquellos organismos que tenían tendencia a migrar hacia capas superiores quedaban retenidos por dicha cubierta. Esta cobertura plástica tenía unos pequeños orificios

para permitir la salida de aire al sumergir las trampas, las cuales se situaban a diversas profundidades por debajo de la interfase óxico-anóxica.

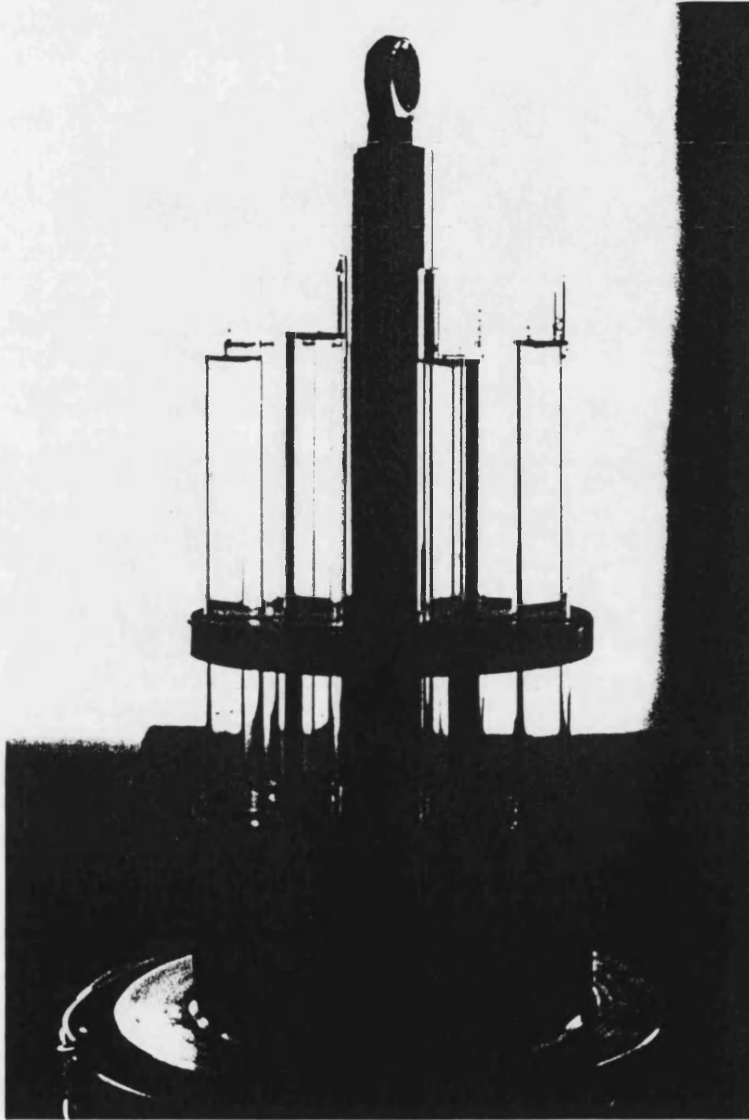


Figura 6.2.- Fotografía de una trampa de sedimentación sin cubierta superior

Figure 6.2.- Photograph of an uncovered sedimentation trap

6.2.2.- FOTOSÍNTESIS EN PRESENCIA DE SULFHÍDRICO

Para entender la presencia de densas poblaciones de cianobacterias filamentosas en zonas anóxicas ricas en sulfhídrico del lago de Arcas era necesario estudiar las posibles adaptaciones metabólicas de estos organismos, especialmente aquellas que le permiten realizar la función fotosintética en presencia de sulfhídrico. Para dilucidar dichas capacidades, se plantearon una serie de experiencias, usando las tres cepas de cianobacterias filamentosas aisladas de la Laguna de Arcas, tales

que evaluaran tanto la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica con sulfhídrico como dador de electrones, como la resistencia del fotosistema II a este compuesto de manera que pueda seguir realizándose fotosíntesis oxigénica en su presencia, evaluando además la concentración de sulfhídrico y demás condiciones que controlan el proceso.

Se plantearon dos tipos distintos de experiencias, cuya metodología coincide en parte, realizándose con las tres cepas aisladas. Por un lado se evaluaba la evolución de la capacidad fotosintética (oxigénica y anoxigénica) a lo largo de un tiempo de incubación a una concentración fija de sulfhídrico. Por otra parte se estimaba la tolerancia de la actividad fotosintética a distintas concentraciones de sulfhídrico.

Como comentamos arriba, existen una serie de características comunes a ambos tipos de experiencias, que son relatadas a continuación. Todos los experimentos de fotoincorporación se realizaron en el laboratorio, a una temperatura de 23°C y a una intensidad luminosa de 120 $\mu\text{mol foton}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, suministrada por una combinación de lámparas de luz fluorescente (Sylvania). Las soluciones de sulfhídrico se preparaban y valoraban tal como se indica en el apartado de determinación de sulfhídrico del capítulo 3, partiéndose de una solución madre de 10 mM para alcanzar la concentración deseada en los tubos de incubación. El DCMU, usado como inhibidor del fotosistema II (ver capítulo 5), se añadió para alcanzar una concentración final de 10 μM . Como inhibidor de la síntesis proteica se usó cloramfenicol, preparando una solución acuosa madre (2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) y usándose a una concentración final de 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. La clorofila *a* se determinó en este caso por extracción en metanol saturado con carbonato magnésico, midiendo la absorbencia del extracto clarificado por filtración a 665 nm y usando un coeficiente de absorción $\alpha_{(1\text{cm})} = 75 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$ (Lenz and Zeitzschel, 1968). El $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (New England Nuclear) se añadía a cada tubo para alcanzar una actividad específica de 0,05 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$. Previamente a la incubación se burbujeaba N_2 estéril (o una mezcla de 1 % CO_2 y 99 % de N_2) a la suspensión de cianobacterias durante 5 minutos previamente a la adición del sulfhídrico y del bicarbonato marcado, para evitar la oxidación no biológica del sulfhídrico.

Todas las suspensiones de cianobacterias para la experimentación se preparaban en medio BG-11 tamponado con HEPES (a 10 mM de concentración final) a $\text{pH}=7,4$. Se partía de cultivos exponenciales de las respectivas cepas, que se recogían por filtración y se lavaban dos veces con medio estéril de manera que la contaminación de bacterias heterótrofas, que ya era inicialmente muy baja (0,1 - 0,01 % en términos de biomasa) se reducía a niveles ínfimos que no afectaban a los resultados del experimento de fotoasimilación. Finalmente se obtenía la suspensión que se homogeneizaba por medio de un homogenizador de tejidos previamente esterilizado para evitar los agregados y asegurar una distribución uniforme de las cianobacterias. Durante el transcurso de las incubaciones (cada cinco minutos) y, en cualquier caso, antes de la toma de muestras, los viales se

agitaban vigorosamente para evitar interferencias debidas a la sedimentación de los organismos.

6.2.2.1.- Evolución temporal de la capacidad fotosintética en incubaciones con una concentración fija de sulfhídrico.

Este tipo de experimentos se realizaron en viales de vidrio de 25 ml de capacidad con un tapón de plástico blando. En cada tapón se clavaban dos agujas de jeringa, una de las cuales llevaba acoplado un tubo de polietileno que se extendía hasta el fondo del vial para poder tomar las muestras durante la incubación. La otra servía para insuflar N_2 estéril simultáneamente a la toma de muestra. Un volumen suficiente de la suspensión del cultivo de la correspondiente cepa se dividía en dos partes. A una de ellas se añadía sulfhídrico hasta una concentración inicial de 0.5 mM y se dejaba durante 4 horas en la luz para que se produjera una preadaptación al sulfhídrico si esta era necesaria, tras lo cual los filamentos se transferían a medio fresco. La otra parte se mantenía en las mismas condiciones y se manipulaba de igual manera, pero sin adición de sulfhídrico (no preadaptada). Estos tratamientos no suponían ninguna merma en la viabilidad de los cultivos, como se comprobó en experiencias previas. De estos dos subcultivos se añadían 20 ml a cada uno de los viales de ensayo. Se incubaban dos viales (uno iluminado y uno en la oscuridad) de cada una de las suspensiones en cada una de las siguientes condiciones:

- Control de fotosíntesis (oxigénica) sin adiciones.
- Incubación a una concentración de 0.5 mM de sulfhídrico (con el que se evaluaba la fotosíntesis oxigénica y anoxigénica en estas concentraciones)
- Incubación con DCMU a una concentración final de 10 μ M (con lo que se inhibía el PSII y por tanto la fotosíntesis oxigénica).
- Incubación a una concentración de 0.5 mM de sulfhídrico y 10 μ M de DCMU, (añadido 10 minutos antes de la incubación), en el cual sólo era posible fotosíntesis anoxigénica).
- Incubación a una concentración de 0.5 mM de sulfhídrico, de 10 μ M de DCMU y 50 $mg \cdot l^{-1}$ de cloramfenicol (donde de producirse fotosíntesis, esta debía ser anoxigénica y realizarse sin nueva síntesis proteica).

Como ya se ha señalado, todas las condiciones anteriores incluían la incubación tanto en iluminación como en la oscuridad, restándose los resultados de estas últimas a los de sus correspondientes incubaciones iluminadas (normalmente las incubaciones en oscuridad daban menos del 1 % de la incorporación de carbono inorgánico en las iluminadas).

De cada tubo se tomaban muestras duplicadas (tras agitarlo para homogeneizar) una vez transcurridos 30 minutos y 1, 2, 3 y 4 horas para evaluar la cantidad de carbono inorgánico incorporado, calculándose con los valores medios las tasas fotosintéticas por mg de clorofila *a*. Estas muestras se colocaban en un vial de 2 ml de capacidad, que contenía la cantidad suficiente de formol para inactivar los organismos presentes en la muestra, con lo que la incorporación de carbono quedaba detenida. Durante la incubación se controlaba la cantidad de sulfhídrico, de manera que su concentración se mantuviera en el nivel deseado (la concentración mínima alcanzada fue de 0.42 mM) realizando adiciones si fuera necesario.

6.2.2.2.- Tolerancia a distintas concentraciones de sulfhídrico de las distintas cepas en relación a su actividad fotosintética.

Estas experiencias se basaban en la incubación de las distintas cepas a diferentes concentraciones de sulfhídrico para determinar la influencia de la concentración de esta sustancia sobre la actividad fotosintética de las tres cepas de cianobacterias aisladas de la Laguna de Arcas. Al igual que en la otra serie de experiencias, la suspensión homogeneizada de cada cepa se dividía en dos partes y una de ellas se preadaptaba en presencia de sulfhídrico a una concentración inicial de 0.5 mM, pero en este caso durante toda la noche (aproximadamente 8 horas). En este caso se utilizaron tubos de hemocultivo (Vacutainer) para realizar las incubaciones, dado que no se extraían muestras a lo largo de la incubación (excepto las necesarias para controlar la concentración de sulfhídrico), por lo que el volumen a incubar podía ser más reducido (10 ml). La experiencia se llevo a cabo durante 90 minutos preparándose tubos con diversas concentraciones de sulfhídrico (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,8 y 1,2 mM), con y sin DCMU (concentración final 10 μ M), y con la incubación de tubos en iluminación y en oscuridad para cada una de las condiciones. En los tubos iluminados en los que se añadía DCMU tan sólo era posible la fotosíntesis anoxigénica, pudiendo calcularse la oxigénica por diferencia con los tubos a los que no se añadía el inhibidor. Transcurridos los 90 minutos se inyectaba en cada tubo 1 ml de formol (35-40 %) para dar por terminado el proceso de fijación de carbono. Se hicieron replicas de todos los tubos y se obtuvieron valores medios de los resultados. También, como en el caso anterior, se controló la concentración de sulfhídrico, aunque las mermas durante la incubación fueron mínimas.

6.3.- RESULTADOS

6.3.1.- MOVILIDAD Y FLOTACIÓN DE *Oscillatoria ornata*

El resultado más interesante obtenido tras la colocación de las trampas de sedimentación fue consecuencia de una observación directa. Al retirar las trampas que tenían colocada la cubierta se observó que en la parte interior de la misma se había producido una gran acumulación de filamentos de *Oscillatoria ornata*, los cuales, al ser depositados en un recipiente, se concentraban en la capa más superficial del agua (figura 6-3) Al ser observados microscópicamente se vio que los filamentos estaban muy vacuolados, debiéndose su alta flotabilidad a esa vacuolación (figura 6-4).

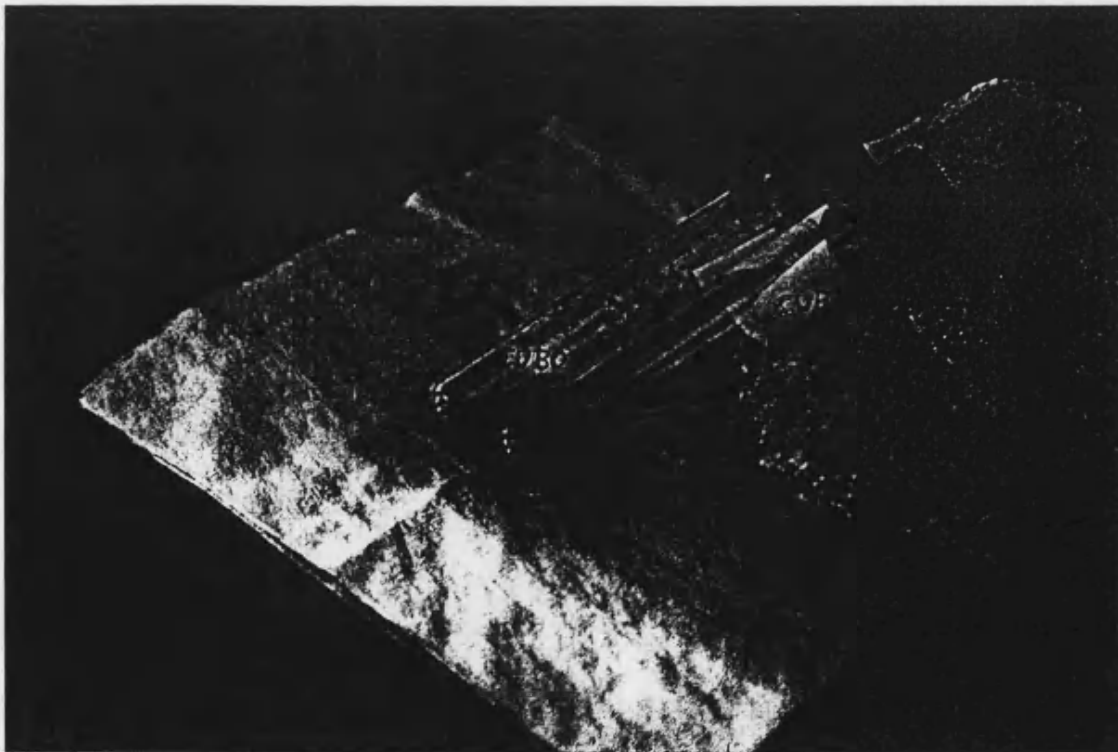


Figura 6.3 - Detalle del material recogido en el interior de los tubos de sedimentación y en la cara interior de la cubierta de la trampa de sedimentación, el 1 de octubre de 1991, en la Laguna de Arcas.

Figure 6.3 - Material collected with the covered sedimentation trap, inside the tubes and inside the upper plastic cover, from Lake Arcas on October 1, 1991.

Así mismo, los filamentos procedentes de las capas superiores de la población, ya en aguas sulfhídricas del lago, tendían a sedimentar, revelando su observación microscópica una ausencia casi total de vesículas gaseosas. Sin embargo, si una muestra de agua de estas profundidades se mantenía durante unos días en análogas condiciones pero en la oscuridad, se producía una acumulación de filamentos muy vacuolados de *Oscillatoria ornata* en la parte superior del recipiente, lo que suponía que en el curso de unos días en la oscuridad en aguas sulfhídricas había cambiado la flotabilidad de este microorganismo. Estas observaciones fueron de gran utilidad para la elaboración de un modelo conceptual sobre el comportamiento de la población de *Oscillatoria ornata* en las zonas microaerobias y anaerobias de la Laguna de Arcas.

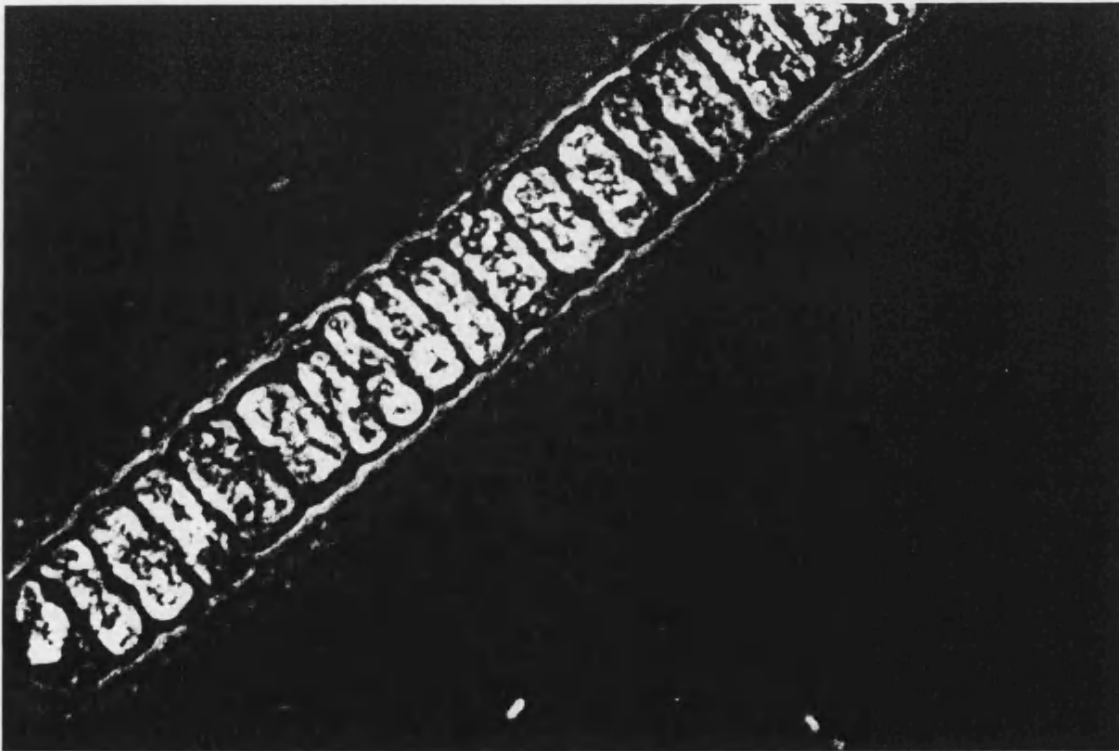


Figura 6.4 - Microfotografía *in vivo* al microscopio óptico de contraste de fases de un filamento muy vacuolado de *Oscillatoria ornata* atrapado en la cara interior de la cubierta de la trampa de sedimentación el 1 de octubre de 1991, (x2000)

Figure 6.4 - *In vivo* phase contrast microphotograph showing a highly vacuolated filament of *Oscillatoria ornata* trapped inside the trap cover on October 1, 1991, (2000x)

6.3.2.- FOTOSÍNTESIS DE LAS CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS DE LA LAGUNA DE ARCAS EN PRESENCIA DE SULFHÍDRICO

6.3.2.1.- Evolución temporal de la capacidad fotosintética de las cianobacterias filamentosas de la Laguna de Arcas en incubaciones con una concentración fija de sulfhídrico.

Los resultados de estas experiencias muestran el grado de inhibición de la fotosíntesis oxigénica y la inducción de fotosíntesis anoxigénica al incubar las distintas cepas a una concentración de 0,5 mM de sulfhídrico durante 4 horas, a lo largo de las cuales se tomaban muestras de los viales de incubación. Estos resultados se comparaban con la actividad fotosintética medida en ausencia de sulfhídrico.

En *Oscillatoria ornata*, al incubar un cultivo no preadaptado en presencia de una concentración 0,5 mM de sulfhídrico (figura 6-5-A) la actividad fotosintética total se reduce bastante, ya sea con o sin DCMU o con cloramfenicol, aunque no es inhibida totalmente. En este caso, la mayor parte de la actividad fotosintética en presencia de la citada concentración de sulfhídrico es anoxigénica, viéndose muy poco afectada por la adición de un inhibidor de la síntesis proteica como el cloramfenicol, por lo que probablemente no sea necesaria la síntesis de nuevas proteínas para su inducción. En los cultivos preadaptados en presencia de sulfhídrico (figura 6-5-B), la reducción de la tasa fotosintética es menor, siendo bastante importantes ambos tipos de procesos fotosintéticos, si bien la fotosíntesis anoxigénica sigue siendo cuantitativamente mayor que la oxigénica pero siempre menor que la actividad total en ausencia de sulfhídrico.

En los cultivos no preadaptados de *Oscillatoria tenuis* (figura 6-5-C), la actividad fotosintética es totalmente inhibida por la adición de sulfhídrico a la concentración citada, en cualquiera de las condiciones ensayadas. En el caso del cultivo preadaptado (figura 6-5-D), si bien se detecta cierta actividad fotosintética, mayoritariamente anoxigénica, cuando se incuba con sulfhídrico, ésta es mucho menor que la obtenida en los controles incubados sin sulfhídrico. En ambos casos, la adición de cloramfenicol inhibe totalmente la actividad fotosintética en presencia de sulfhídrico.

En *Pseudanabaena* sp., la inducción de la fotosíntesis anoxigénica precisa de un periodo de entre una y dos horas en los cultivos no preadaptados, como se observa en la figura 6-5-E donde la actividad fotosintética anoxigénica en presencia de sulfhídrico (0,5 mM) sólo comienza a ser significativa a partir de ese tiempo, mientras que en la incubación con cloramfenicol no se presenta dicha actividad. En los cultivos preadaptados (figura 6-5-F), la actividad fotosintética anoxigénica que se producía era muy importante, resultando al cabo de un cierto tiempo parcialmente inhibida por el cloramfenicol. La actividad fotosintética

oxigénica resultaba totalmente inhibida tanto en los cultivos preadaptados como en los no preadaptados.

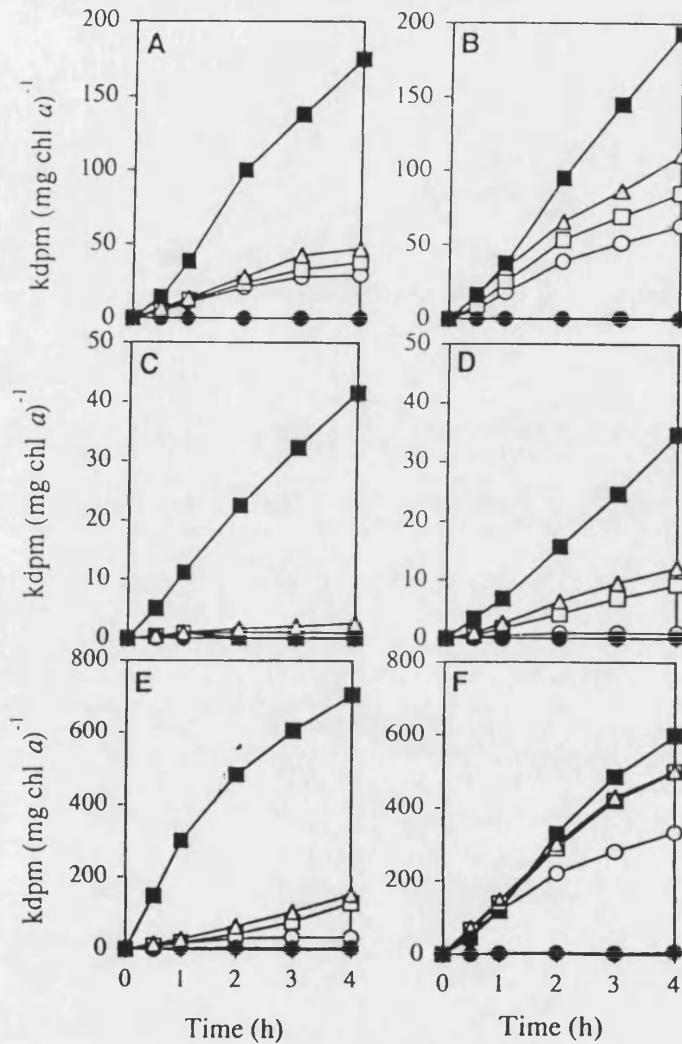


Figura 6.5.- Evolución temporal de la fotoasimilación de ¹⁴C inorgánico por las diferentes cepas de cianobacterias aisladas de la Laguna de Arcas, incubadas en las siguientes condiciones: 1-(■) Control. 2-(Δ) 0,5 mM sulfhídrico. 3-(●) 10 μM DCMU. 4-(□) 0,5 mM sulfhídrico + 10 μM DCMU. 5-(○) 0,5 mM sulfhídrico + 10 μM DCMU + 50 mg·l⁻¹ cloramfenicol. (A) *Oscillatoria ornata*, no preadaptada. (B) *Oscillatoria ornata*, preadaptada. (C) *Oscillatoria tenuis*, no preadaptada. (D) *Oscillatoria tenuis*, preadaptada. (E) *Pseudanabaena* sp., no preadaptada. (F) *Pseudanabaena* sp., preadaptada.

Figure 6.5.- Time course of inorganic ¹⁴C photoassimilation by the different cyanobacterial isolates from Lake Arcas, incubated under the following conditions: 1-(■) Control. 2-(Δ) 0,5 mM sulfide. 3-(●) 10 μM DCMU. 4-(□) 0,5 mM sulfide + 10 μM DCMU. 5-(○) 0,5 mM sulfide + 10 μM DCMU + 50 mg·l⁻¹ chloramphenicol. (A) *Oscillatoria ornata*, unadapted. (B) *Oscillatoria ornata*, preadapted. (C) *Oscillatoria tenuis*, unadapted. (D) *Oscillatoria tenuis*, preadapted. (E) *Pseudanabaena* sp., unadapted. (F) *Pseudanabaena* sp., preadapted.

6.3.2.2.- Tolerancia de la actividad fotosintética en las distintas cianobacterias filamentosas de la Laguna de Arcas a distintas concentraciones de sulfhídrico

El efecto de las distintas concentraciones de sulfhídrico ensayadas sobre la actividad fotosintética de las distintas cianobacterias de la Laguna de Arcas es claramente diferente.

La capacidad de *O. ornata* para realizar fotosíntesis anoxigénica se incrementa rápidamente con la concentración de sulfhídrico, mostrando una cinética de saturación con una K_m aparente de aproximadamente 0,1 mM, alcanzándose entre el 63 % (no preadaptadas) y el 92 % de la actividad fotosintética de los controles incubados sin sulfhídrico (figura 6-6-A). El incremento inicial de la fotosíntesis anoxigénica al aumentar la concentración de sulfhídrico es similar en para los cultivos preadaptados que para los no preadaptados, sin embargo en los no preadaptados esta actividad alcanza un máximo a 0,25 mM y se reduce ligeramente a concentraciones mayores, lo que no ocurre en los preadaptados, cuya evolución tiende a una asíntota hacia 0,8 mM de sulfhídrico. Respecto a la fotosíntesis oxigénica, este proceso resulta bastante resistente al sulfhídrico, especialmente en los cultivos preadaptados, en los que al comparar con el control sin sulfhídrico se supera el 40 % de actividad fotosintética oxigénica a una concentración de sulfhídrico de 0,5 mM e incluso el 20 % a 1,2 mM, respecto a los mencionados controles incubados sin sulfhídrico

Como se vio anteriormente, la inducción de la fotosíntesis anoxigénica en *O. tenuis* requiere varias horas de preadaptación (figura 6-5-C-D), pero incluso en este caso, la actividad fotosintética se reduce a menos de un 25 % de la que presentan los controles en ausencia de sulfhídrico (figura 6-6-B). Por otro lado, la preincubación con sulfhídrico suponía ya por sí sola una gran merma de la capacidad fotosintética oxigénica en esta cepa (67 % en estas experiencias) respecto a los controles incubados sin sulfhídrico, mientras que el resto de la fotosíntesis oxigénica desaparece ya desde la concentración más baja ensayada (0,1 mM). Por tanto, la fotosíntesis oxigénica en *O. tenuis* se ve totalmente inhibida por el sulfhídrico, mientras que su capacidad de realizar alternativamente fotosíntesis anoxigénica es muy limitada.

En *Pseudanabaena* sp. (figura 6-6-C), la fotosíntesis oxigénica es fuertemente inhibida por el sulfhídrico, si bien en las concentraciones más bajas todavía se mantiene parte de esta actividad, siendo totalmente inhibida por concentraciones superiores a 0,5 mM, todo ello independientemente de que hayan sido o no preadaptadas. La preadaptación favorece mucho la fotosíntesis anoxigénica en esta cepa, llegando a alcanzarse valores superiores a los de los propios controles incubados en ausencia de sulfhídrico. (hasta un 170 % respecto a ellos), mientras

que en los cultivos no preadaptados esta actividad sigue siendo importante pero bastante menor, lo que se explica bien en función de los resultados del anterior experimento, que revelaba como necesario un periodo de adaptación en esta cianobacteria para la inducción de la fotosíntesis anoxygenica. El máximo rendimiento de la fotosíntesis anoxygenica se da a concentraciones entre 0,6 y 0,8 mM de sulfhídrico, situándose la K_m entre 0,1-0,2 mM.

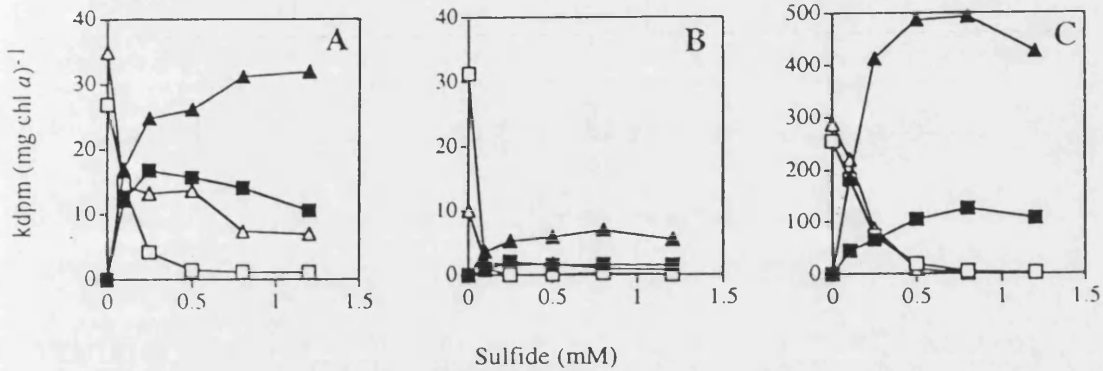


Figura 6.6.- Fotoasimilación de ^{14}C inorgánico en presencia de diferentes concentraciones de sulfhídrico. 1.- (□) Cultivo no preadaptado - fotosíntesis oxigénica. 2.- (■) Cultivo no preadaptado - fotosíntesis anoxygenica. 3.- (△) Cultivo preadaptado - fotosíntesis oxigénica. 4.- (▲) Cultivo preadaptado - fotosíntesis anoxygenica. (A) *Oscillatoria ornata*. (B) *Oscillatoria tenuis* (C) *Pseudanabaena* sp.

Figure 6.6.- Inorganic ^{14}C photoassimilation at different sulfide concentrations. 1.- (□) Unadapted culture - oxygenic photosynthesis. 2.- (■) Unadapted culture - anoxygenic photosynthesis. 3.- (△) Preadapted culture - oxygenic photosynthesis. 4.- (▲) Preadapted culture - anoxygenic photosynthesis. (A) *Oscillatoria ornata*. (B) *Oscillatoria tenuis* (C) *Pseudanabaena* sp.

6.4.- DISCUSIÓN

6.4.1.- ADAPTACIONES DE LAS CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS A LAS CONDICIONES DE LA QUIMIOCLINA DE LA LAGUNA DE ARCAS

La concentración de sulfhídrico es un factor importante en la ecofisiología de las cianobacterias que habitan aguas ricas en este compuesto reductor (Cohen *et al.*, 1975a,b), que puede resultar inhibitorio de la actividad fotosintética oxigénica (Oren *et al.*, 1979), pero también puede inducir la fotosíntesis anoxygenica al ser utilizado como dador electrónico (Padan y Cohen, 1982; Padan, 1989). En los experimentos realizados hemos observado diferentes tipos de respuesta de la actividad fotosintética al sulfhídrico en cada una de las cianobacterias

filamentosas presentes en la Laguna de Arcas, las cuales podemos asimilar a alguno de los tipos de adaptación fotosintética al sulfhídrico propuestos por Cohen y colaboradores (1986), recogidos en la tabla 6-1. La adaptación presentada por *O. ornata*, presenta un patrón similar al denominado tipo III de la tabla 6-1, caracterizada por la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica usando sulfhídrico como dador electrónico, además de una elevada resistencia del fotosistema II a esta sustancia, en cuya presencia, hasta una cierta concentración, puede continuar la fotosíntesis oxigénica. Como consecuencia, esta cianobacteria tiene la capacidad de tener operativos, simultánea o alternativamente, ambos tipos de fotosíntesis. Este tipo de respuestas han sido puestas de manifiesto anteriormente en *Oscillatoria* cf. *amphigranulata* (Castenholz y Utkilen, 1984), en la que la capacidad para realizar fotosíntesis anoxigénica era diferente en función del contenido en sulfhídrico de la fuente termal de la que fueron aisladas las diferentes cepas (García-Pichel y Castenholz, 1990). La operatividad de ambos fotosistemas en presencia de sulfhídrico también ha sido descrita en *Microcoleus chthonoplastes* (Cohen *et al.*, 1986; De Wit y Van Gemerden, 1987).

Cohen y colaboradores (1986) postulaban que la mayoría de las cianobacterias, especialmente las planctónicas, pertenecerían al tipo I de adaptaciones al sulfhídrico, esto es, las que ven totalmente inhibida su actividad fotosintética por el sulfhídrico. Sin embargo nuestro trabajo demuestra que *O. ornata*, una cianobacteria planctónica que se encuentra en las aguas ricas en sulfhídrico de la Laguna de Arcas, presenta adaptaciones a esta sustancia similares a las englobadas en la modalidad de adaptación de tipo III, las cuales le permiten vivir en estas aguas.

Tabla 6.1.- Tipología de las adaptaciones fotosintéticas al sulfhídrico en cianobacterias (Cohen *et al.*, 1986).

Table 6.1.- Patterns of photosynthetic adaptation to sulfide among cyanobacteria (Cohen *et al.*, 1986)

Tipo	Fotosíntesis oxigénica con sulfhídrico	Fotosíntesis anoxigénica con sulfhídrico
I	Inhibida totalmente por bajas concentraciones de sulfhídrico	No realiza
II	Potenciada por el sulfhídrico, lo que protege de fotooxidación	No realiza
III	Continúa hasta una determinada concentración de sulfhídrico	Inducida por sulfhídrico
IV	Inhibida por sulfhídrico	Reemplaza a la oxigénica en presencia de sulfhídrico

Dando por sentado que el DCMU no tiene ningún efecto sobre la asimilación de carbono vía fotosíntesis anoxigénica (Oren *et al.*, 1977), nuestros experimentos

demuestran que el PSII de *O. ornata* presenta una elevada resistencia al sulfhídrico. También se observó que no es necesario un periodo de inducción para el inicio de la fotosíntesis anoxigénica, ya que los resultados de las incubaciones con cloramfenicol ponen de manifiesto que esta capacidad no precisa de una síntesis *de novo* de proteínas, por lo que probablemente la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica es constitutiva en la cepa de *O. ornata* aislada de la Laguna de Arcas. En cultivos de *Oscillatoria limnetica* crecidos anaerobicamente se encontró una sulfhídrico-quinona reductasa ligada a la membrana tilacoidal (Arieli *et al.*, 1991), que unido a otras características del aparato fotosintético representa un sistema de alta afinidad por el sulfhídrico (Slooten *et al.*, 1989), lo que había sido sugerido previamente por Shahak y colaboradores (1987) en base a estudios realizados con tilacoides aislados. Sin embargo, cuando estos cultivos se realizaban en condiciones aeróbicas este sistema no aparecía, mientras que en ambos casos aparecían unas vías no específicas de transferencia de los electrones desde el sulfhídrico al fotosistema I, que presentaba una baja afinidad por el sulfhídrico. Dado que esta cianobacteria precisa de un periodo de inducción para comenzar su actividad fotosintética anoxigénica (Oren y Padan, 1978), probablemente este periodo sea necesario para la síntesis de esa proteína de alta afinidad por el sulfhídrico, aunque los resultados de Belkin y Padan (1983), según los cuales este tiempo se acorta en condiciones de bajo potencial de oxido-reducción, puedan presentar cierta discrepancia con esta hipótesis. En la cepa de *Oscillatoria ornata* aislada de la Laguna de Arcas la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica no precisa de ese periodo de inducción, pero su rendimiento fotosintético es más reducido que cuando realiza únicamente fotosíntesis oxigénica en ausencia de sulfhídrico (figuras 6-5 y 6-6), lo cual sería más coherente con la existencia en esta cianobacteria de un sistema de baja afinidad por el sulfhídrico. No obstante, la existencia de una cierta potenciación de la actividad fotosintética anoxigénica tras el periodo de adaptación podría también significar la inducción de un sistema de mayor afinidad, pero esto es bastante improbable puesto que esta mayor afinidad al preadaptar podría suponer una mayor inhibición del PSII, lo cual no sucede.

El crecimiento masivo de *O. ornata* se produce en la zona anóxica de la laguna, en la cual las concentraciones de sulfhídrico llegan a ser muy elevadas (hasta 3 mM). Sin embargo, su actividad fotosintética sólo tiene lugar en la parte más superficial de esta zona, donde la concentración de sulfhídrico suele ser inferior a 0,3 mM, dado que es esta la única parte de la quimioclina y el hipolimnion en la que las condiciones de luz reinantes permiten dicha actividad. En estas condiciones, y de acuerdo con los experimentos de fotoasimilación hechos con cultivos, *O. ornata* podría ser capaz de realizar tanto fotosíntesis oxigénica como anoxigénica, al menos si sólo nos fijáramos en su respuesta fotosintética en aguas con sulfhídrico. La presencia de un pico secundario de oxígeno que aparece a lo largo del día a la altura de la quimioclina (figura 6-7) confirma que en esa profundidad está teniendo lugar un proceso fotosintético con producción de

oxígeno. En el Solar Lake, las cianobacterias que se acumulan en la quimioclina (*Oscillatoria* sp y *Microcoleus* sp.) realizan principalmente fotosíntesis anoxigénica por la mañana, para pasar a una actividad fotosintética oxigénica alrededor del mediodía (Jørgensen *et al.*, 1979a), de manera que primero tiene lugar un consumo de sulfhídrico que hace bajar las concentraciones hasta niveles no inhibitorios del PSII, con lo cual se inicia la fotosíntesis oxigénica. En la Laguna de Arcas, ya sea por el consumo de sulfhídrico por parte de las Cromatiaceas, como por una hipotética oxidación fotosintética (si la hubiera) por parte de *O. ornata*, se produce un consumo de sulfhídrico en la quimioclina, con lo que la concentración se va rebajando a lo largo del día, disminuyendo su efecto parcialmente inhibitorio sobre la fotosíntesis oxigénica de *O. ornata*.

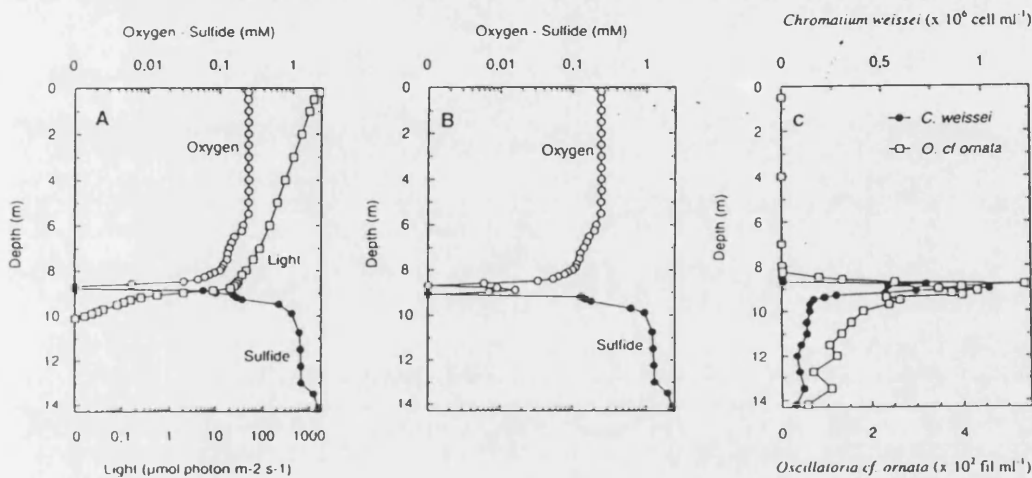


Figura 6.7.- Perfiles de oxígeno y sulfhídrico, representativos del periodo de estratificación estival, medidos a diferentes horas del día en la Laguna de Arcas (A) 7.30 a.m. (B) 4.00 p.m. La penetración de la luz medida a las 11.30 a.m. se muestra en el gráfico (A). En el gráfico (C) se representa la distribución de *Chromatium weissei* y *Oscillatoria ornata*. Los datos fueron tomados el día 12 de septiembre de 1991.

Figure 6.7.- Typical oxygen and sulfide profiles from Lake Arcas during the summer stratification period, measured at (A) 7.30 a.m., (B) 4.00 p.m. Light penetration profile, measured at 11.30 a.m., is drawn in (A). Graphic (C) shows the distribution in the vertical profile of *Chromatium weissei* and *Oscillatoria ornata*. Data were obtained on September 12, 1991.

Pseudanabaena sp., a diferencia de *O. ornata*, no alcanza grandes densidades poblacionales en el hipolimnion de la laguna. Sin embargo, su potencial para la realización de fotosíntesis anoxigénica ha quedado bien demostrado, así como la alta sensibilidad de su PSII al sulfhídrico. Además, de acuerdo con los resultados obtenidos de las incubaciones con cloramfenicol, para empezar a realizar fotosíntesis anoxigénica, este organismo precisaría de una síntesis *de novo* de proteínas, realizada en un periodo de adaptación previo de al menos una hora.

La tercera cianobacteria filamentosa aislada de la laguna, que sólo aparecía en aguas epilimnéticas a densidades poblacionales muy bajas (menos de 10

filamentos por 100 ml), ve muy limitada su capacidad fotosintética por la presencia de sulfhídrico. No sólo su capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica es muy limitada, sino que la mera presencia de bajas concentraciones de sulfhídrico inhibe totalmente su fotosistema II. Estas limitaciones hacen suponer que su presencia en las aguas anóxicas se vería altamente condicionada por la presencia de sulfhídrico.

De lo anteriormente expuesto se desprende una diferente respuesta fotosintética al sulfhídrico en las tres especies de cianobacterias filamentosas aisladas de la Laguna de Arcas (figura 6-8), que puede compararse con algunos ejemplos de otras especies recogidos en la tabla 6-2. Sin embargo, la distribución y abundancia de las cianobacterias en la columna de agua no puede explicarse únicamente en función de sus adaptaciones fisiológicas al sulfhídrico. Por ejemplo, no hay razón para creer que *O. ornata* está más adaptada a medrar en aguas sulfhídricas que *Pseudanabaena* sp. Si nos fijamos en su capacidad fotosintética, *Pseudanabaena* sp. presenta una fotosíntesis anoxigénica mucho más activa que *O. ornata*, luego sería una buena candidata a ocupar el hipolimnion anóxico de la laguna. En consecuencia, debemos buscar una razón adicional para explicar la diferente distribución y abundancia de estas dos especies en la Laguna de Arcas.

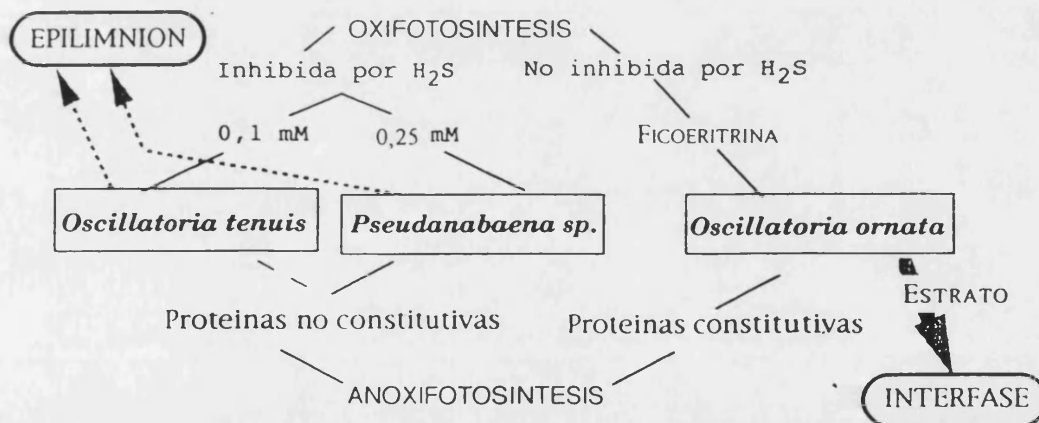


Figura 6.8- Representación esquemática de las adaptaciones al sulfhídrico que presentan las tres cepas de cianobacterias filamentosas aisladas de las aguas de la Laguna de Arcas.

Figure 6.8- Adaptive responses to sulfide of the three filamentous cyanobacterial isolates from Lake Arcas.

O. ornata, a diferencia de *Pseudanabaena* sp. es capaz de producir ficoeritrina en condiciones de baja intensidad luminosa, o con un campo de luz en el que dominen las calidades espectrales que son absorbidas característicamente por este pigmento, y esto nos lleva a enlazar con algunos aspectos ya comentados en el capítulo 5. Dado que la luz que alcanza la quimioclina, a partir de donde

empiezan a acumularse las cianobacterias, es predominantemente de una longitud de onda comprendida entre 500 y 600 nm (figura 5-4) y puesto que su intensidad es baja; la posesión de ficoeritrina (máximo de absorción a 570 nm) resulta determinante para poder captar eficientemente esos fotones. Puesto que la luz captada por las ficobiliproteínas es canalizada a través del fotosistema II (Cohen *et al.*, 1975b; Oren *et al.*, 1979, Jørgensen *et al.*, 1987), esta sólo puede ser aprovechada para un proceso fotosintético oxigénico, por lo que una cianobacteria que como *O. ornata* posea un PSII altamente resistente al sulfhídrico resultaría seleccionada frente a otra que, como *Pseudanabaena* sp., presentara una elevada capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica pero su fotosíntesis oxigénica se viera extremadamente inhibida por el sulfhídrico. Los picos vespertinos de oxígeno detectados repetidamente en la zona de la quimioclina por debajo de la profundidad de la primera extinción del oxígeno podrían deberse a la actividad fotosintética oxigénica de *O. ornata*.

Además de estas consideraciones, cabría apuntar soluciones adicionales a las aquí demostradas. Por ejemplo, De Wit y colaboradores (De Wit y Van Gemerden, 1987a, De Wit *et al.*, 1988) demostraron que en *Microcoleus chthonoplastes*, a pesar de su alta capacidad de realización de fotosíntesis anoxigénica, pulsos periódicos de oxígeno eran necesarios para el crecimiento, al estar implicado en procesos metabólicos esenciales, lo cual ya había sido apuntado anteriormente por Padan (1979b), que comentaba la necesidad del oxígeno en el metabolismo de los ácidos grasos de diversas cianobacterias. Aunque esto no se ha podido demostrar en la cepa de *O. ornata* aislada de la Laguna de Arcas, lo cierto es que todos nuestros intentos para crecer esta cianobacteria en condiciones anaerobias estrictas han sido vanos. Si *O. ornata* presentara la misma dependencia del oxígeno que la demostrada en *Microcoleus chthonoplastes*, su capacidad de producir oxígeno en aguas anóxicas que contengan sulfhídrico podría ser una ventaja adicional.

La capacidad de *O. ornata* de continuar su fotosíntesis oxigénica en presencia de sulfhídrico supone también una ventaja adicional, puesto que le permite evitar la competencia por el sulfhídrico con *Chromatium weissii*, ya que en caso de poder realizar únicamente fotosíntesis anoxigénica en presencia de sulfhídrico, este compuesto podría resultar limitante en las capas superiores de la quimioclina (Guerrero *et al.*, 1985a). Como se demostró con cultivos de bacterias fotosintéticas del azufre y cianobacterias procedentes de tapetes microbianos, el rendimiento y la tasa de crecimiento de las Cromatiaceas en aguas con sulfhídrico es mucho mayor que el de las cianobacterias. Si el PSII de *O. ornata* fuese inactivo en presencia de sulfhídrico, sus posibilidades de coexistir con *Chromatium weissii* en las aguas anóxicas de la laguna serían muy bajas, dada su menor afinidad por el sulfhídrico (Van Gemerden, 1984; De Wit y Van Gemerden, 1987a). Sin embargo, esta competencia desfavorable para *O. ornata* se evita con su capacidad de usar un sustrato adicional (H_2O) como dador de electrones, con lo que, como se ha demostrado en estudios teóricos y

experimentales (Taylor y Williams, 1975, Tilman, 1977, Gottschal *et al.*, 1979, Gottschal y Thingstad, 1982) se evita la exclusión competitiva de *O. ornata*.

Tabla 6.2.- Sinopsis de las adaptaciones fotosintéticas al sulfhídrico presentadas por algunas especies de cianobacterias.

Table 6.2.- Photosynthetic adaptations to sulfide shown by several cyanobacterial species

Cianobacteria (tipo de adaptación al sulfhídrico)	Aislada de:	Fotosíntesis oxigénica en presencia de sulfhídrico	Fotosíntesis anoxigénica en presencia de sulfhídrico	Referencia
<i>Mastigocladus laminosus</i> (Tipo I)	Manantiales termales N. Zelanda e Islandia	Inhibida por sulfhídrico	No realiza	Castenholz, 1976
Varias especies (Tipo I)		Inhibida por sulfhídrico	No realiza	Garlick <i>et al.</i> , 1977
<i>Dactylococcopsis salina</i> (Tipo I)	Solar Lake, Sinai	Inhibida por sulfhídrico	Muy reducida	Van Rijn & Cohen, 1983 Walsby <i>et al.</i> , 1983a
<i>Microcoleus lyngbyaceus</i> (Tipo I)	Rio Medway, Inglaterra	Inhibida por sulfhídrico	No realiza	Pentecost, 1984
<i>Oscillatoria</i> sp (Tipo II)	Wilbur Hot Spring	Potenciada por el sulfhídrico, sigue hasta 2,2 mM	No realiza	Cohen, 1984 Cohen <i>et al.</i> , 1986
<i>Oscillatoria amphigranulata</i> (Tipo III)	Manantial sulfuroso, N.Zelanda	Inhibida - 1,5 mM 21 % total - 1,0 mM 42 % total - 0,3 mM	Inducida por [Sulfh.]=0,3-1,5 mM	Castenholz & Utkilen, 1984
<i>Microcoleus chthonoplastes</i> (Tipo III)	Solar Lake, Sinai	Domina a [Sulfh.]= 0,1-0,3 mM	Domina a [Sulfh.]>0,5 mM	Jørgensen <i>et al.</i> , 1986
<i>Microcoleus chthonoplastes</i> st. II (Tipo III)	Tapete microbiano, Isla Mellum Alemania	Hasta [Sulfh.]<1,3 mM	Oxidado a tiosulfato. Crecimiento con sulfhídrico mayoritario desde 0,35 mM	De Wit & Van Gemerden, 1987 De Wit <i>et al.</i> , 1988
<i>Oscillatoria boryana</i> (Tipo III)	Manantial termal, N.Zelanda	Inhibida - 0,7 - 1 mM domina por debajo de 0,05 mM	a partir de [Sulfh.]=0,05 mM	Castenholz <i>et al.</i> , 1991
<i>Phormidium</i> sp. (Tipo III)	Salinas, Francia	Continua a bajas concentraciones sulfh.	Inducida	Caumette <i>et al.</i> , 1994
<i>Oscillatoria limnetica</i> (Tipo IV)	Solar Lake, Sinai	inhibida - 0,1 mM, se recupera al desaparecer el sulfhídrico	Inducida por [Sulfh.]=0,3-4 mM, óptima a [Sulfh.]=0,7	Cohen <i>et al.</i> , 1975a,b Garlick <i>et al.</i> , 1977
<i>Aphanothece halophytica</i> (Tipo IV)	Solar Lake, Sinai	inhibida - 0,1 mM,	Inducida por sulfhídrico, óptima a [Sulfh.]=0,7	Garlick <i>et al.</i> , 1977

Durante todo el periodo de estratificación, las densidades poblacionales más elevadas de *O. ornata* se encontraron a nivel de la quimioclina, en la que aparecen agudos gradientes químicos entre los que se encuentran los correspondientes a las concentraciones de oxígeno y sulfhídrico. La fotosíntesis anoxigénica a nivel de quimioclina, ya sea la de las bacterias fotosintéticas del azufre (Parkin y Brock, 1981b) como una hipotética y poco probable contribución de *O. ornata* a la mismas, supone un consumo de sulfhídrico a nivel de la esta zona. Además, el oxígeno producido vía fotosíntesis oxigénica puede oxidar abióticamente el sulfhídrico, aunque esta oxidación química es un proceso algo más lento (Imhoff, 1992). Por tanto, ambos tipos de fotosíntesis, actuando en la parte superior del hipolimnion, pueden actuar como un proceso “detoxificador” contribuyendo a reducir la concentración de sulfhídrico durante el día (Van Gemerden y De Wit, 1986), con lo que además se favorece la colonización de las capas inmediatamente superiores por otros microorganismos fotosintéticos como *Cryptomonas* spp.

El efecto inhibitorio del sulfhídrico sobre la fotosíntesis oxigénica es un proceso dependiente, entre otros, del pH (Howsley y Pearson, 1979). Esto se debe a que cuanto más bajo es el pH, mayor es la proporción de la forma doblemente protonada (H_2S), que es la más tóxica para la célula, debido principalmente a que es la forma que penetra con mayor facilidad a través de la membrana celular. Así, en la zona de la quimioclina, en la cual tiene lugar la actividad fotosintética de *O. ornata*, la forma de sulfhídrico dominante es HS^- , mientras que conforme llegamos a mayores profundidades no sólo existe una mayor concentración de sulfhídrico sino que aumenta la proporción de la forma H_2S frente a las otras por efecto del pH

En conclusión, las adaptaciones que presenta *O. ornata* a la vida en aguas sulfhídricas, en condiciones de baja intensidad luminosa y de una banda espectral predominantemente verde, le resultan muy ventajosas para establecer importantes poblaciones en la quimioclina y el hipolimnion anóxico de la Laguna de Arcas, en tanto que las otras dos especies de cianobacterias filamentosas aisladas de las aguas de la laguna no presentan adaptaciones que les permitan su crecimiento en la conjunción de esas condiciones.

6.4.2.- MODELO CONCEPTUAL DE FUNCIONAMIENTO DE LA POBLACIÓN DE *Oscillatoria ornata* EN LA LAGUNA DE ARCAS

A lo largo de este trabajo se han venido observando diversos aspectos de la autoecología de *Oscillatoria ornata* en la Laguna de Arcas. A modo de resumen, recordemos que en el capítulo 4 se describió la dinámica poblacional de este microorganismo, que desarrolla densas poblaciones en las capas anóxicas de la laguna. En el capítulo 5 se vio que únicamente los filamentos situados en la parte superior de la quimioclina resultan fotosintéticamente activos, dada la

limitación de luz sufrida por estas poblaciones. En este sentido resulta determinante que esta cianobacteria tenga ficoeritrina, lo que le permite captar luz verde, banda espectral dominante al nivel de la quimioclina. Los resultados de ese capítulo, unidos a lo reflejado en el capítulo 6 al respecto de estudios de laboratorio sobre la capacidad fotosintética de *Oscillatoria ornata* en un medio con sulfhídrico, en las que su fotosíntesis oxigénica sigue siendo activa, nos hacen suponer que este organismo es capaz de continuar su fotosíntesis en presencia de sulfhídrico. Además, las observaciones reflejadas en un anterior apartado de este capítulo sobre la vacuolación de *Oscillatoria ornata* en distintas condiciones nos indican que el mantenimiento de este organismo en la oscuridad y en aguas sulfhídricas deriva en un aumento de su flotabilidad al aumentar el tamaño de sus vesículas de gas y consumir el lastre formado por sustancias de alta densidad, posiblemente glucógeno, acumuladas durante su periodo de actividad fotosintética en la quimioclina.

El mecanismo que controla la pérdida de flotabilidad en cianobacterias, ya sea el colapso de las vesículas de gas, la regulación de su síntesis o su dilución por aumento del volumen celular, y/o la acumulación de moléculas de polisacáridos que actúan como lastre (Oliver, 1994), se ve activado cuando la generación fotosintética de energía excede la utilización de la misma para el crecimiento (Foy y Smith, 1980; Konopka, 1984, Howard *et al.*, 1996), produciéndose por ello una acumulación de polisacáridos (Post *et al.*, 1985, Post, 1987; Feuillade *et al.*, 1992). Estos mecanismos se encuentran ampliamente explicados en Kromkamp y Konopka (1986), Walsby (1987) y Oliver (1994), y modelizados por Kromkamp y Walsby (1990). Además, Walsby (1994), dedica una parte de su extensa revisión sobre la vacuolación en los microorganismos, en el que revisa los factores implicados en este proceso (figura 6-9), a la incidencia de este fenómeno en las cianobacterias. En su trabajo se describen estas vesículas gaseosas como estructuras cilíndricas de unos 75 nm de anchura y alrededor de 1 µm de largo, huecas y rellenas de aire y formadas únicamente por dos proteínas, siendo la principal hidrofóbica, mientras que la otra tiene una estructura que ayuda a la estabilización. Estas vesículas se agrupan formando lo que se conoce como vacuolas gaseosas. Los mecanismos reguladores de la flotabilidad en las cianobacterias les permiten ocupar posiciones óptimas en la columna de agua, lo que hace que se produzcan movimientos que van desde pocas decenas de centímetros hasta decenas de metros en un solo día (Walsby *et al.*, 1995).

La capacidad de formación de vesículas gaseosas, que controlan su flotabilidad, es una característica bastante extendida entre las cianobacterias, siendo especialmente interesante desde nuestro punto de vista la que presentan las poblaciones metalimnéticas de *Oscillatoria* en diversos lagos. La cianobacteria *Oscillatoria rubescens*, que ha sido encontrada formando poblaciones profundas en lagos españoles como Montcortés (Camps *et al.*, 1976) y Estanya (Avila *et al.*, 1984), también fue encontrada por Konopka (1982), quien estudió la ecofisiología de una población metalimnética de *Oscillatoria rubescens* del Lago

Crooked (Indiana), la cual según este autor utilizaba un mecanismo basado en la vacuolación para efectuar migraciones en la columna de agua. En el lago Gjersjøen (Noruega), una cepa de color rojizo de *Oscillatoria agardhii* formaba densas poblaciones establecidas en la termoclina, desarrollando una alta vacuolación cuando crecía en condiciones de baja intensidad luminosa (Walsby *et al.*, 1983b, Walsby, 1988), y perdiendo rápidamente su flotabilidad al ser transferida a condiciones de alta iluminación. Utkilen y colaboradores (1985b) demostraron que los cambios de flotabilidad de esta cianobacteria se debían tanto a la variación de tamaño de sus vesículas gaseosas como a la acumulación de sustancias en condiciones de mayor iluminación, especialmente carbohidratos, que aumentaban su densidad. Estas vesículas gaseosas, a diferencia de las de otras cianobacterias, como *Anabaena flos-aquae* (Oliver y Walsby, 1984; Spencer y King, 1989) u otras cianobacterias generalmente abundantes en medios eutróficos y que normalmente presentan una limitación por la luz (Humphries y Lyne, 1988), no se colapsaban por la presión existente al ser mucho más resistentes que las de las cianobacterias antedichas. Van Rijn y Shilo (1985) también encontraron el mismo tipo de comportamiento migratorio en las poblaciones de cianobacterias dominadas por *Oscillatoria* en cubetas de cultivo de peces.

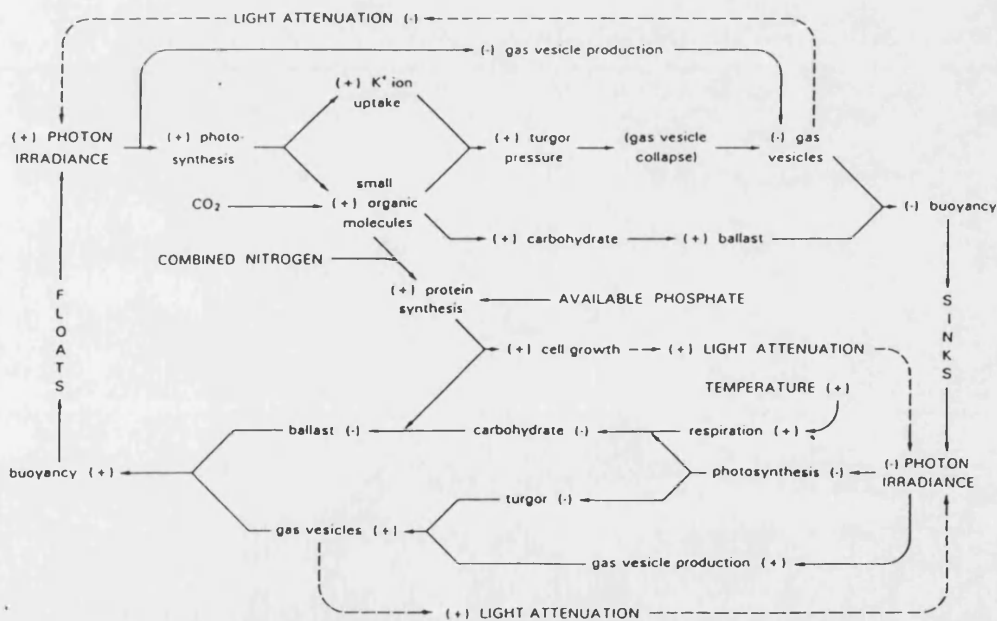


Figura 6.9.- Resumen de los factores implicados en la regulación del contenido en vesículas gaseosas y en la flotabilidad en las cianobacterias planctónicas (Tomado de Walsby, 1994).

Figure 6.9.- Summary of the factors involved in the regulation of gas vesicle content and buoyancy in planktonic cyanobacteria (From Walsby, 1994).

En algunas especies de *Anabaena* también se ha citado la acumulación de carbohidratos como mecanismo regulador de la densidad de flotación (Walsby *et*

al., 1989; Viner, 1989, Walsby *et al.*, 1991); al igual que en *Aphanizomenon flos-aquae* (Kromkamp *et al.*, 1986, Konopka *et al.*, 1987a), y *Microcystis aeruginosa* (Kromkamp y Mur, 1984; Kromkamp *et al.*, 1988; Deacon y Walsby, 1990), en la cual el mecanismo de regulación parece estar determinado no sólo por la luz sino también por la disponibilidad de nutrientes (Konopka *et al.*, 1987b). La cianobacteria marina *Trichodesmium thiebautii* también presentaba el mecanismo regulador basado en la acumulación de carbohidratos (Villareal y Carpenter, 1990), así como la especie congénérica *Trichodesmium tenue* (Romans *et al.*, 1994). No obstante, todas estas cianobacterias formaban densas poblaciones superficiales, no profundas como en el caso de *Oscillatoria*. Por regla general, las poblaciones profundas de *Oscillatoria* suelen ser poseedoras de ficoeritrina, lo que les permite su crecimiento en las condiciones luminosas del metalimnion (Utkilen *et al.*, 1985a).

Konopka (1989), estudiando las poblaciones metalimnéticas de *Aphanizomenon flos-aquae* de dos lagos en Indiana, encontró que este organismo recuperaba su capacidad de flotación tras cinco horas en la oscuridad, pero su observación más interesante fue que, si bien la capacidad de flotación disminuía al exponer a esta cianobacteria a una intensidad luminosa de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la adición de ortofosfato a una concentración de $2 \mu\text{M}$ hacía necesario aumentar dicha iluminación a $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para obtener la misma pérdida de flotabilidad, lo que fue explicado en términos de que una mayor disponibilidad de nutrientes inorgánicos permitiría un mayor crecimiento y por tanto la saturación luminosa tendría lugar a una mayor intensidad. Un proceso similar podría explicar los resultados de Van Rijn y Shilo (1986), en los cuales la adición de amonio en poblaciones naturales de *Oscillatoria* y *Spirulina* incrementaba la proporción de carbono fotoasimilado que era incorporado como proteína frente al que se destinaba a ser acumulado en polisacáridos, a la vez que estimulaba el consumo de estos polisacáridos en la oscuridad. Feuillade y colaboradores (1992) propugnaban que en condiciones de limitación de nutrientes la energía obtenida de la fotosíntesis por *Oscillatoria rubescens* se dedicaba más a la acumulación de polisacáridos que al crecimiento, con lo que se producía una pérdida de flotabilidad, lo que ayudado por sus bajas tasas de excreción (Feuillade *et al.*, 1990) y alta capacidad de captación de luz (Foy y Gibson, 1982) contribuye a la dominancia de *Oscillatoria* en el metalimnion de los lagos, a pesar de que normalmente sus tasas de crecimiento son bajas. En el mismo sentido, Konopka y colaboradores (1993) estudiaron la influencia de los nutrientes sobre la flotabilidad de *Oscillatoria agardhii*, la cual formaba una población metalimnética en el Lago Deming, en Minnesota, encontrando que, además de la luz, la adición de fosfato disminuía la flotabilidad de esta cianobacteria, pero la adición de amonio atenuaba ese descenso, lo que unido a otros resultados de este trabajo les lleva a pensar en la posible existencia de otras moléculas que actúen como lastre además de las polisacáridicas. Estas observaciones son especialmente interesantes en el caso de una población que, como la de *O. ornata* de la Laguna de Arcas, se concentra especialmente en la quimioclina, una zona en la que

existen importantes gradientes en las concentraciones de compuestos inorgánicos de nitrógeno y fósforo, sin embargo nuestro estudio carece todavía de la base suficiente para poder realizar aseveraciones al respecto del papel de esos nutrientes en la determinación de la distribución de *O. ornata* en la laguna, aunque pensamos que el fósforo podría ser un factor importante en este caso, dado que es un elemento que resulta extremadamente limitante en las aguas epilimnéticas y se encuentra en cantidades algo superiores en las aguas anóxicas. Además del efecto de los compuestos de nitrógeno y fósforo sobre la regulación de la flotabilidad de las cianobacterias, la disponibilidad de carbono inorgánico también ha sido estudiada como un factor regulador (Konopka y Klemer, 1993; Klemer *et al.*, 1995, 1996), aunque la misma sólo tendría lugar en sistemas pobres en bicarbonatos, lo que no ocurre en la Laguna de Arcas. En general, la flotabilidad disminuye cuando los nutrientes inorgánicos son limitantes y aumenta cuando la cantidad de carbono inorgánico es insuficiente (Oliver, 1994). Cuando hay carencia de nutrientes, la energía asimilada excede la que puede dedicarse al crecimiento, por lo que se acelera la acumulación de carbohidratos y disminuye la flotabilidad, estando el balance entre el crecimiento y la acumulación de carbohidratos regulado por la luz y los nutrientes.

Así como muchas cianobacterias, entre ellas *O. ornata* pueden presentar vesículas gaseosas en cualquier posición de la célula, *Pseudanabaena* se caracteriza por formar estas vesículas únicamente en posición terminal de la célula. Este hecho resulta especialmente relevante, ya que la posesión de estas vesículas no le sirve a *Pseudanabaena* como un mecanismo suficientemente potente para regular su flotabilidad (Walsby, 1994), por lo que carecería de este mecanismo fundamental para asegurar su viabilidad en la quimioclina de la Laguna de Arcas. Esto se convierte en un factor adicional que explica porqué es *Oscillatoria ornata* y no *Pseudanabaena* la cianobacteria dominante en la laguna, además de los ya tratados en la primera parte de esta discusión..

Las observaciones señaladas, tanto de nuestros resultados como acompañadas de resultados obtenidos por otros autores, nos hace atrevernos a elaborar un modelo conceptual sobre el comportamiento de *Oscillatoria ornata* en la Laguna de Arcas. Según este modelo (figura 6-10) *Oscillatoria ornata* sólo está fotosintéticamente activa en las capas más superficiales de la población, donde realizaría fotosíntesis oxigénica, aunque la posibilidad de que tuviera una actividad fotosintética anoxigénica no podría descartarse totalmente a tenor de los experimentos de laboratorio que ponen de manifiesto esta capacidad, aunque probablemente estaría inhibida por falta de intensidad de luz y/o de su banda espectral adecuada para el PSI. En estas capas fotosintéticamente activas de la población, esta cianobacteria podría acumular sustancias de reserva que actuarían como lastre, diluyendo al mismo tiempo las vesículas gaseosas como consecuencia del crecimiento. Ello haría que el filamento se fuera hundiendo a las capas más profundas del hipolimnion. Esto supone que el filamento se ve sometido inevitablemente a condiciones de oscuridad en presencia de sulfhídrico,

lo que le obligaría a un mantenimiento basado en la fermentación endógena de esas sustancias de reserva (podría ser glucógeno), las cuales, a medida que van siendo metabolizadas, de manera bastante lenta, aligerarían el lastre. Simultáneamente aumentaría su contenido en vesículas gaseosas, proceso de síntesis que puede darse también en la oscuridad en base a la utilización de la energía de los carbohidratos acumulados, con lo que el filamento dejaría de hundirse y comenzaría a remontar la columna de agua hasta situarse de nuevo en la capa superior de la población, en la cual las condiciones de luz le permiten reiniciar su producción fotosintética reanudándose el ciclo. Además, su paso por el hipolimnion, más rico en nutrientes, podría servirle a *O. ornata* para acumular fósforo, más escaso en las aguas de la quimioclina.

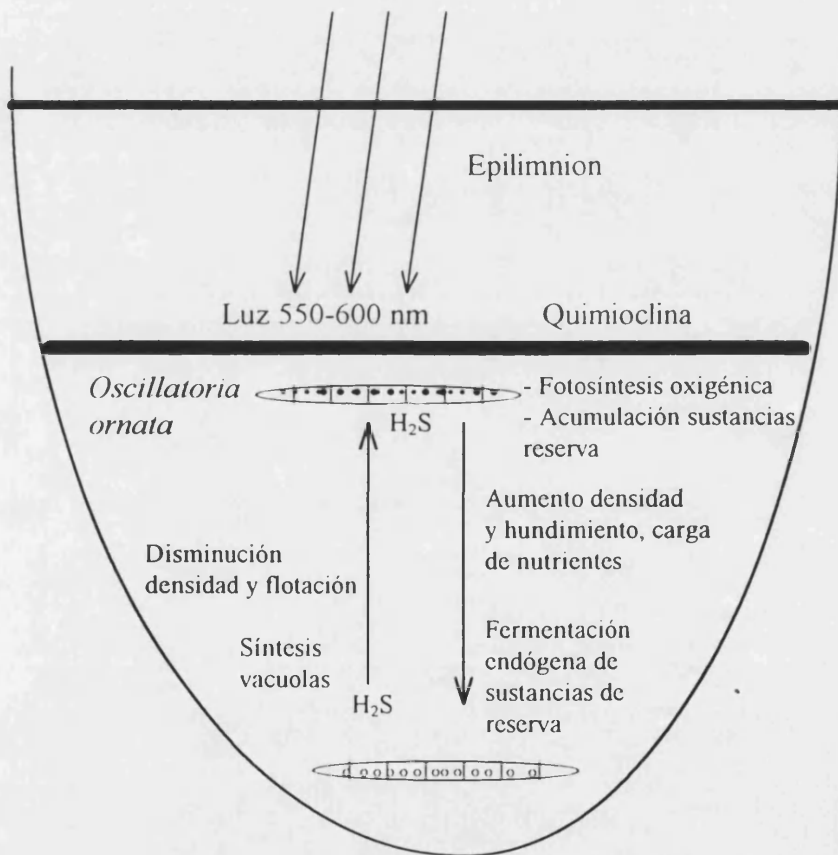


Figura 6.10.- Modelo conceptual del funcionamiento de la población de *Oscillatoria ornata* en la Laguna de Arcas.

Figure 6.10.- Conceptual model of the functioning of the *Oscillatoria ornata* population in Lake Arcas.

Este modelo está basado en los resultados obtenidos en nuestro trabajo, a excepción del apartado referente a la fermentación de sustancias endógenas, que

aunque ha sido demostrado (tabla 6-3) por numerosos trabajos sobre cianobacterias que vivían en medios ricos en sulfhídrico (Stal y Krumbein, 1984b; Richardson y Castenholz, 1987b; Stal *et al.*, 1989; Moezelaar *et al.*, 1996, Nold y Ward, 1996), en nuestro caso no se pudo confirmar mediante experimentos con cultivos de *Oscillatoria ornata*. Si bien se poseía cultivos en los cuales este microorganismo era la única especie fotosintética, no se pudo eliminar completamente la contaminación de bacterias heterótrofas, que aunque suponían una fracción muy pequeña de la biomasa en los cultivos (normalmente menor del 0,1 %, y aún menor en los experimentos de fotoasimilación al lavarse repetidamente los filamentos con medio BG-11 esteril), si podían interferir decisivamente en cualquier experiencia que implicara una actividad respiratoria (aerobia o anaerobia). Por ello fue imposible la realización de este tipo de experimentos, aunque el reto de la obtención de un cultivo axénico, que nos permitiría realizarlos, sigue pendiente para un futuro que esperamos próximo

Tabla 6.3.- Algunas cianobacterias en las que se ha demostrado un metabolismo anaerobio fermentativo o heterotrófico aeróbico.

Table 6.3.- Some cyanobacteria showing an anaerobic fermentative or aerobic heterotrophic metabolism.

Cianobacteria	Actividad	Aislamiento de/por	Referencia
<i>Oscillatoria terebriformis</i> (strain OH-80-Ot-D)	Fermentación endógena de glucógeno o exógena de glucosa o fructosa a ácido láctico	Hunter Hot Springs	Richardson & Castenholz, 1987b.
<i>Cyanothece</i> PCC7822	Degradación fermentativa de reservas de carbono	R. Rippka	<i>Van der Oost et al.</i> , 1989.
<i>Oscillatoria limosa</i> (strain 23)	Degradación de glucógeno mediante fermentación heteroláctica	Stal and Krumbein, 1981, 1985	Stal & Krumbein, 1989.
<i>Oscillatoria limnetica</i>	Fermentación homoláctica en ausencia de azufre elemental	Cohen <i>et al.</i> , 1975a,b. Solar Lake	Oren & Shilo, 1979.
<i>Oscillatoria rubescens</i> D. C. (strain 19R, Staub, 1961)	Respiración de glucosa, fructosa o acetato exógeno, pero sin crecimiento	Lac Nantua	Feuillade & Feuillade, 1989.
<i>Synechococcus lividus</i>	Fermentación endógena de glucógeno		Sheridan & Castenholz, 1968 Sheridan, 1973
<i>Anabaena variabilis</i>	Respiración de glucosa exógena	Strain ATCC29413	Jensen, 1990.
<i>Phormidium uncinatum</i> (CU 1462/7)	Respiración de glucosa exógena	R. S. Safferman,	Bagchi <i>et al.</i> , 1990.
<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	fermentación endógena de glucógeno	L.J. Stal	Moezelaar <i>et al.</i> , 1996
<i>Microcystis</i> PCC 7806	Fermentación de lactato	R. Moezelaar	Moezelaar & Stal, 1994 Moezelaar <i>et al.</i> , 1995
<i>Synechococcus</i> spp.	fermentación endógena de glucógeno	<i>In situ</i>	Nold y Ward, 1996

La permanencia de una cianobacteria en condiciones prolongadas de oscuridad puede verse favorecida por las condiciones anóxicas y el bajo potencial de óxido-reducción. Richardson y Castenholz (1987b), trabajando con cultivos de *Oscillatoria terebriformis* aislada de un tapete microbiano, demostraron que las condiciones anaerobias y el bajo potencial redox favorecen el mantenimiento de esta cianobacteria durante un periodo prolongado en la oscuridad, ya que en estas condiciones la tasa de metabolismo endógeno del glucógeno acumulado es mucho más baja que en condiciones aerobias, lo que permite a este microorganismo prolongar su disponibilidad energética en condiciones en las que no es posible la fotoasimilación. Post y colaboradores (1986) vieron que el consumo de esas sustancias que actuaban como lastre era un proceso bastante rápido en la oscuridad, pero se trataba de condiciones aerobias, mientras que la síntesis o aumento de tamaño de las vacuolas de gas sería un proceso más lento (Hayes y Walsby, 1984). Esa diferente escala temporal en ambos procesos se vería compensada en la población de *O. ornata* de la Laguna de Arcas por el hecho de que el metabolismo endógeno fermentativo es considerablemente más lento, con lo que el filamento llega alcanzar mayores profundidades y la velocidad de pérdida de su lastre es menor, acompasándose en cierta manera al proceso de aumento de las vesículas gaseosas.

De forma adicional a lo antedicho, las temperaturas del hipolimnion son bastante bajas, lo cual ralentiza a su vez el metabolismo, con lo que la degradación de las sustancias que constituyen el lastre también sería más lenta, tal como refiere Walsby (1994) para *Microcystis*. En esta misma cianobacteria se ha observado que a temperaturas relativamente bajas se frena la síntesis de proteínas y se acelera la acumulación de glucógeno (Visser *et al.*, 1995), lo cual, caso de darse en *O. ornata* en la Laguna de Arcas supondría que la mayoría de la energía acumulada durante la actividad fotoasimiladora sería destinada al mantenimiento y no al crecimiento. Ello haría necesario un mecanismo activo de recirculación de los filamentos entre las capas profundas del hipolimnion y la quimioclina para asegurar el mantenimiento de la población, lo cual se observó que ocurría cuando se trabajaba con las trampas de sedimentación y ha sido incluido en el modelo aquí expuesto, aunque obviamente la recirculación no sería total y en la población de *O. ornata* existiría una cierta componente de pérdida por sedimentación.

Además del metabolismo endógeno, Richardson y Castenholz (1987b) citan numerosos casos de crecimiento heterotrófico de cianobacterias en la oscuridad con fuentes exógenas de carbono. lo que caso de darse en *O. ornata* podría resultar una contribución adicional a la de la fermentación endógena del glucógeno. Sin embargo, esta contribución debe ser despreciable en condiciones naturales, ya que las cianobacterias presentan mucha menor afinidad por estos compuestos orgánicos que las bacterias heterótrofas, por lo que su utilización de

estos es probablemente muy limitada, siendo el metabolismo fermentativo del glucógeno el proceso realmente importante en condiciones de anoxia y oscuridad

Estas consideraciones modifican considerablemente los modelos sobre flotación de las cianobacterias hasta ahora propuestos, pues anteriormente no se habían hecho consideraciones sobre las alteraciones de estos modelos que podrían darse cuando la cianobacteria se viera sometida a condiciones anóxicas en la oscuridad. Esto se debía a que los trabajos hasta ahora publicados no se basaban en una estructura de población tal como la descrita para *Oscillatoria ornata* en la Laguna de Arcas, la cual ocupa las aguas anóxicas ricas en sulfhídrico de esta laguna estratificada y el hipolimnion profundo en el que permanece en condiciones de oscuridad.

CAPÍTULO 7

LA BACTERIA EPIBIONTE DE *Chromatium weissei*

7.1.- INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos epibiontes sobre células de *Chromatium* ya fue detectada en el siglo XIX por Warming (1875), uno de los pioneros en el estudio de las bacterias fotosintéticas del azufre, aunque la presencia del epibionte fuera interpretada de forma errónea como una gemación de la célula portadora. Posteriormente Poshoff (1921, 1922) describió estructuras similares en *Chromatium weissei* y *Chromatium okenii*, interpretando que dichas estructuras estaban relacionadas con la reproducción celular. El primer investigador en sugerir que estas estructuras pudieran ser organismos parásitos o epibiontes fue Bavendaam, que en 1924 hablaba de “yemas” y “puentes” que aparecían sobre o entre las células de *Chromatium warmingii*, *Chromatium weissei* y *Chromatium okenii*, así como sobre algunas especies del género *Thiospirillum*. A partir de entonces no aparecieron nuevos trabajos al respecto hasta la década de los 80, momento en el que un equipo de investigadores de la Universidad Autónoma de Barcelona realizó una serie de interesantes estudios sobre este tipo de epibiontes (Esteve *et al.*, 1983), que se comentarán más adelante.

Como se ha descrito a lo largo de este trabajo, *Chromatium weissei* es la bacteria fotosintética más abundante en la laguna de Arcas. En nuestras primeras visitas a la laguna, que se remontan a mediados de la década anterior habíamos observado con curiosidad como sobre estas células de *Chromatium* se observaba con frecuencia la presencia de epibiontes (Vicente *et al.*, 1991, Rodrigo, 1997). El estudio de la dinámica espacio-temporal de este microorganismo permitió seguir una dinámica similar en las poblaciones de microorganismos epibiontes que los infectan, cuyos resultados se exponen en este capítulo. Dado que los epibiontes no ligados a células de *Chromatium* son prácticamente indistinguibles de otras bacterias presentes en las muestras, el seguimiento de la evolución de las poblaciones de la bacteria epibionte sólo puede hacerse mediante el estudio de sus interacciones con la célula hospedadora.

Aunque en este capítulo se utilizara con frecuencia el término infección, ello no implica necesariamente que el microorganismo epibionte cause daño alguno a la célula de *Chromatium* que lo soporta, por lo que la utilización de términos epidemiológicos, tales como infección, hospedador y huésped no supone que exista necesariamente una relación de parasitismo.

Dicha relación de parasitismo si que ha sido demostrada para diversos tipos de bacterias. Además del conocido caso de *Bdellovibrio* (Torrella *et al.*, 1978, Shilo, 1984; Sanchez Amat, 1989), la predación bacteriana se ha descrito en otros grupos bacterianos (Casida, 1982, 1988, 1989; Larkin, 1990). Pace (1988), aunque en un sentido más amplio, se refería a la predación y al parasitismo como dos de los factores más importantes en la regulación de las poblaciones bacterianas planctónicas. Incluso se ha descrito la predación por mixobacterias (*Myxococcus xanthus* y *M. fulvus*) que se agregan formando colonias en las que

atrapan a cianobacterias que son lisadas por la secreción de enzimas líticos, aprovechándose de los productos de ese lisado (Fraleigh y Burnham, 1988).

7.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Esteve y colaboradores (1992) describieron una serie de técnicas para el estudio de bacterias predadoras que atacan a las Cromatiaceas. Una de las técnicas propuesta se basaba en el desarrollo de placas líticas sobre una superficie de cultivo de *Chromatium*, similar a la descrita por Fallon y Brock (1979). Esta técnica se descartó en nuestro caso, dado que en el epibionte encontrado en la laguna de Arcas no se ha detectado esa capacidad de lisis de *Chromatium*. La técnica alternativa se basaba en la detección del número de *Chromatium* infectados, lo que resultaba una indicación de la abundancia de la bacteria epibionte. La técnica de formación de placas líticas daba resultados muy inferiores (hasta en cuatro ordenes de magnitud) a la de la observación microscópica, subestimando la infección real en la población natural (Esteve *et al.*, 1992).

Nuestro trabajo no pretendía describir la dinámica poblacional del epibionte en las aguas de la laguna, donde los epibiontes no adheridos serían en principio indistinguibles de otras bacterias de su mismo tamaño, sino estudiar la dinámica espacio-temporal de la infección del epibionte sobre las células de *Chromatium weissel* que componían la población de la laguna. Por ello, la técnica utilizada también se basó en determinar el número de células infectadas, pero a diferencia de la utilizada por Esteve y colaboradores (1992), que utilizaban la microscopía electrónica de barrido a 3000 aumentos, en nuestro caso se utilizó la microscopía óptica con máxima resolución. La microscopía óptica de epifluorescencia, usando naranja de acridina (Francisco *et al.*, 1973; Zimmermann y Falkler, 1974, Hobbie *et al.*, 1977, Kepner and Pratt, 1994) no daba buenos resultados, ya que la resolución para distinguir las bacterias epibiontes no era buena. Sin embargo, el uso de filtros de acetato de celulosa (0,2 μm de poro) teñidos con eritrosina fenicada, los mismos usados en los recuentos, cuya preparación se reseña en el capítulo 4, se reveló como un buen soporte para la observación y recuento de las células de *Chromatium weissel* infectadas por el epibionte. Estos filtros eran observados a 2000 aumentos en un potente microscopio Zeiss III, usando un objetivo 100x planapocromático en la técnica de contraste de fases. La figura 7-1 muestra como se veían las células infectadas al utilizar esta técnica.

En el mismo trabajo de Esteve y colaboradores (1992) se realiza una corrección para evitar la cuantificación de bacterias adheridas de manera no específica. Ello resulta totalmente correcto en el caso de ese trabajo, a la vista de la fotografía mostrada en el mismo, donde aparecen bacterias adheridas a las células de *Chromatium* que claramente no son los epibiontes estudiados. Sin embargo, en

nuestro caso no se efectuó ninguna corrección, ya que la técnica empleada permitía diferenciar prácticamente con total seguridad las bacterias adheridas inespecíficamente de aquellas que realmente eran los epibiontes objeto de estudio, ya que el epibionte se situaba de forma totalmente perpendicular a la célula hospedadora formando una estructura inconfundible.

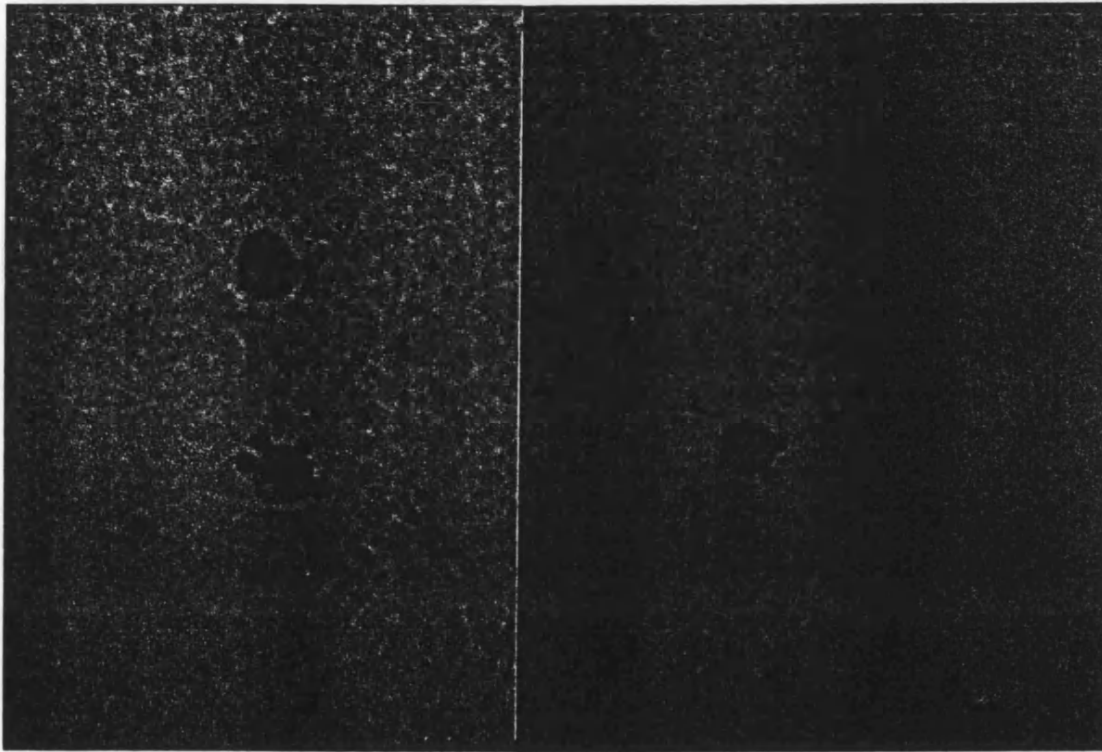


Figura 7-1.- Microfotografía de contraste de fases de células tenidas con eritrosina de *Chromatium weissel* de una muestra de la laguna de Arcas mostrando infección por bacterias epibiontes (x 2000)

Figure 7-1.- Phase contrast micrograph of a sample from Lake Arcas showing *Chromatium weissel* erythrosine stained cells infected by epibiontic bacteria. (2000 x).

Una vez obtenidos los datos sobre infección, el análisis de la varianza (Sokal y Rohlf, 1980) se mostró como una herramienta eficaz para discriminar las variaciones de la infección en función de la distribución espacial, permitiendo especialmente discernir las diferencias existentes entre la parte de la población de *C. weissel* que se mantiene más activa metabólicamente, en las cercanías del "plate" bacteriano, y la de la zona afótica de capas más profundas del hipolimnion, fotosintéticamente inactiva.

La técnica utilizada para la preparación de muestras para ser observadas por microscopía electrónica viene descrita con detalle en Clarke *et al.* (1993).

7.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El epibionte que infecta *Chromatium weissei* en la laguna de Arcas es una bacteria Gram-negativa no capsulada que forma estructuras adheridas a la célula hospedadora, consistentes de un número de entre una y cinco células cocoides apiladas unas sobre otras en forma perpendicular a la célula de *Chromatium*. Las células situadas en los extremos tienen un diámetro de unas 0,6 μm y unos 0,8 μm de longitud, siendo las células centrales ligeramente más estrechas. Sólo la célula proximal se encuentra adherida a la célula de *Chromatium*.

La relación existente entre la célula de *Chromatium weissei* y su epibionte en la laguna de Arcas todavía permanece en parte como una incógnita. A lo largo de este estudio no se ha conseguido establecer una relación entre la infección por epibionte y la lisis celular de *Chromatium weissei*, es más, las típicas placas líticas obtenidas por otros autores nunca han aparecido en nuestros intentos por obtenerlas, lo cual no necesariamente implica la inexistencia de esa relación.

Sin embargo, del estudio de la dinámica espacio-temporal de la infección de *Chromatium weissei* por el epibionte si que se derivan claras diferencias en cuanto a la infección en función de la distribución espacial del epibionte y del hospedador. La tabla 7-1 indica el porcentaje medio de infección, calculado para muestras del "plate" bacteriano y su zona próxima, la parte más activa de la población, y para el resto de la población de *Chromatium weissei* que se situaba en las aguas hipolimnéticas carentes de iluminación, donde llegaban principalmente células poco activas por sedimentación desde la zona del "plate", caracterizada ésta por su activo crecimiento. Para considerar las muestras a incluir dentro del llamado "plate" se ha tomado desde la profundidad superior en la que aparecía *C. weissei* hasta aquella profundidad en la que su población dejaba de disminuir de manera considerable con la profundidad.

A la vista de los resultados expuestos ya parece claro que el porcentaje de infección es siempre más elevado en las capas menos activas de la población. Al realizar un análisis de la varianza ($F = 17,87$), se pudo rechazar la hipótesis de similitud entre las medias tanto para $p = 0,05$ como para $p = 0,01$, o lo que es lo mismo, se confirmó que la diferencia de infección de *Chromatium weissei* por el epibionte entre las capas más activas de la población y el resto era significativa. Sin embargo, estos porcentajes no deben confundirse con valores absolutos, ya que hay que considerar que aunque los porcentajes de infección en la zona del "plate" sean más bajos, la densidad poblacional del hospedador es mayor, con lo cual el número de bacterias epibiontes por unidad de volumen puede no ser tan diferente. No obstante, solo nos limitaremos a realizar esta advertencia, ya que no consideramos posible hablar de densidades poblacionales del epibionte cuando mediante la técnica de microscopía óptica utilizada en nuestro trabajo no

seriamos capaces de detectar la forma de vida libre del epibionte, si es que existe, aunque en centenares de observaciones al microscopio electrónico nunca se ha revelado la presencia de epibiontes no adheridos a *C. weissel*, pareciendo que la unión entre el epibionte y su hospedador es permanente

Tabla 7-1.- Porcentaje de células de *Chromatium weissel* infectadas por epibiontes en los distintos muestreos considerando diferencialmente la zona del "plate" y el resto del hipolimnion. Entre paréntesis se muestran los valores para las fechas en las que no aparecía un "plate" bien delimitado, en cuyo caso se calculó para el conjunto de la columna de agua y se representa entre paréntesis.

Table 7-1.- Percentage of *Chromatium weissel* infected cells in some of the sampling dates, with differentiation of plate and deep hypolimnetic zones. When a clear plate did not appear, calculated values for the whole anoxic water column are show in brackets.

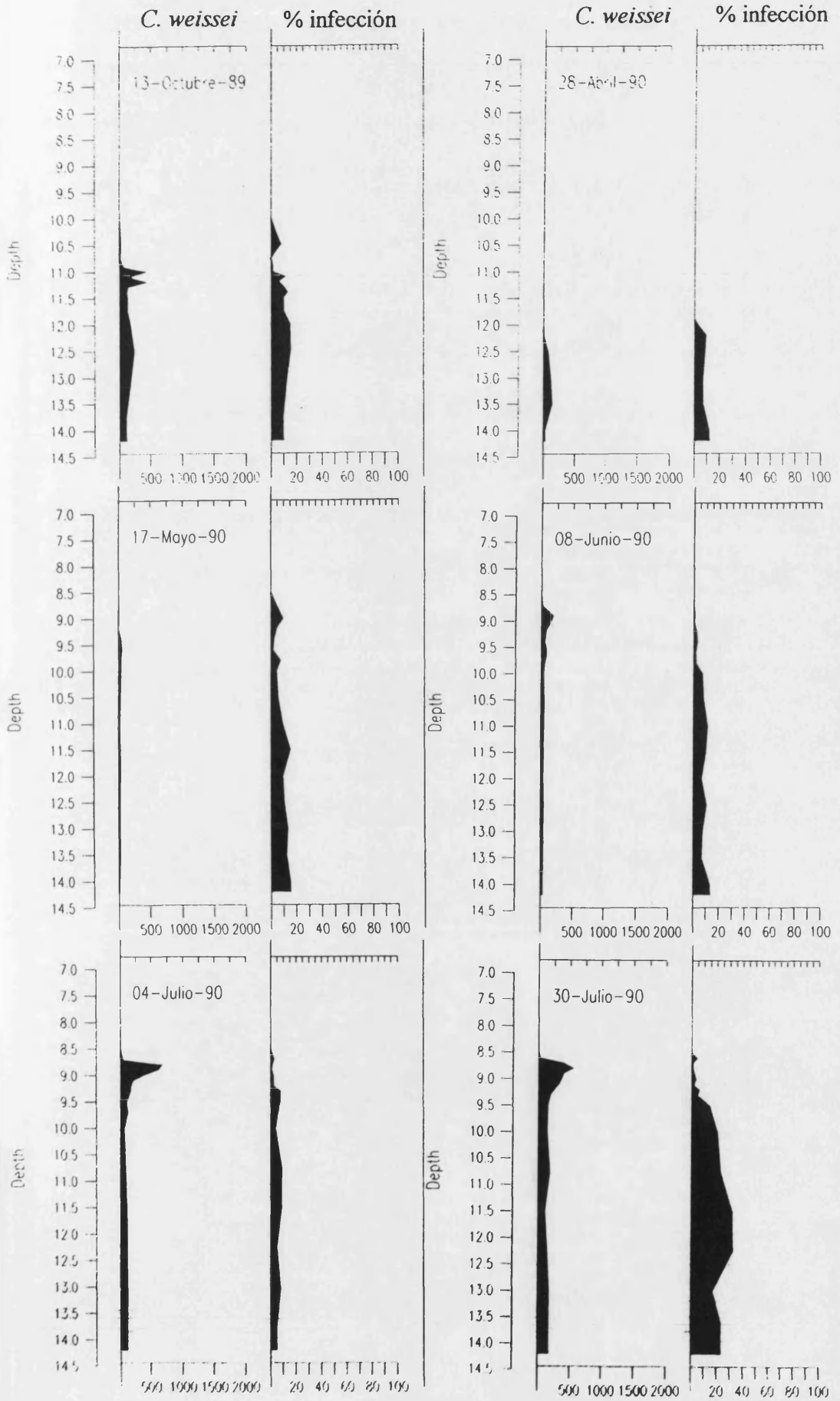
FECHA	% INFECCIÓN		FECHA	% INFECCIÓN	
	"PLATE"	RESTO		"PLATE"	RESTO
13/10/89	(8,39)	(8,39)	24/09/90	2,37	10,41
23/02/90	(1,10)	(1,10)	12/10/90	(7,12)	(7,12)
23/03/90	(2,07)	(2,07)	1/05/91	(4,17)	(4,17)
28/04/90	(8,19)	(8,19)	24/05/91	1,84	4,07
17/05/90	(7,80)	(7,80)	27/06/91	1,19	6,72
8/06/90	1,26	8,95	6/08/91	1,33	4,48
4/07/90	2,20	7,98	3/09/91	2,08	5,87
30/07/90	2,80	23,14	12/09/91	1,50	6,22
25/08/90	3,31	16,47	1/10/91	1,72	5,13
7/09/90	1,59	9,76	11/10/91	(2,69)	(2,69)
18/09/90	1,81	10,12			

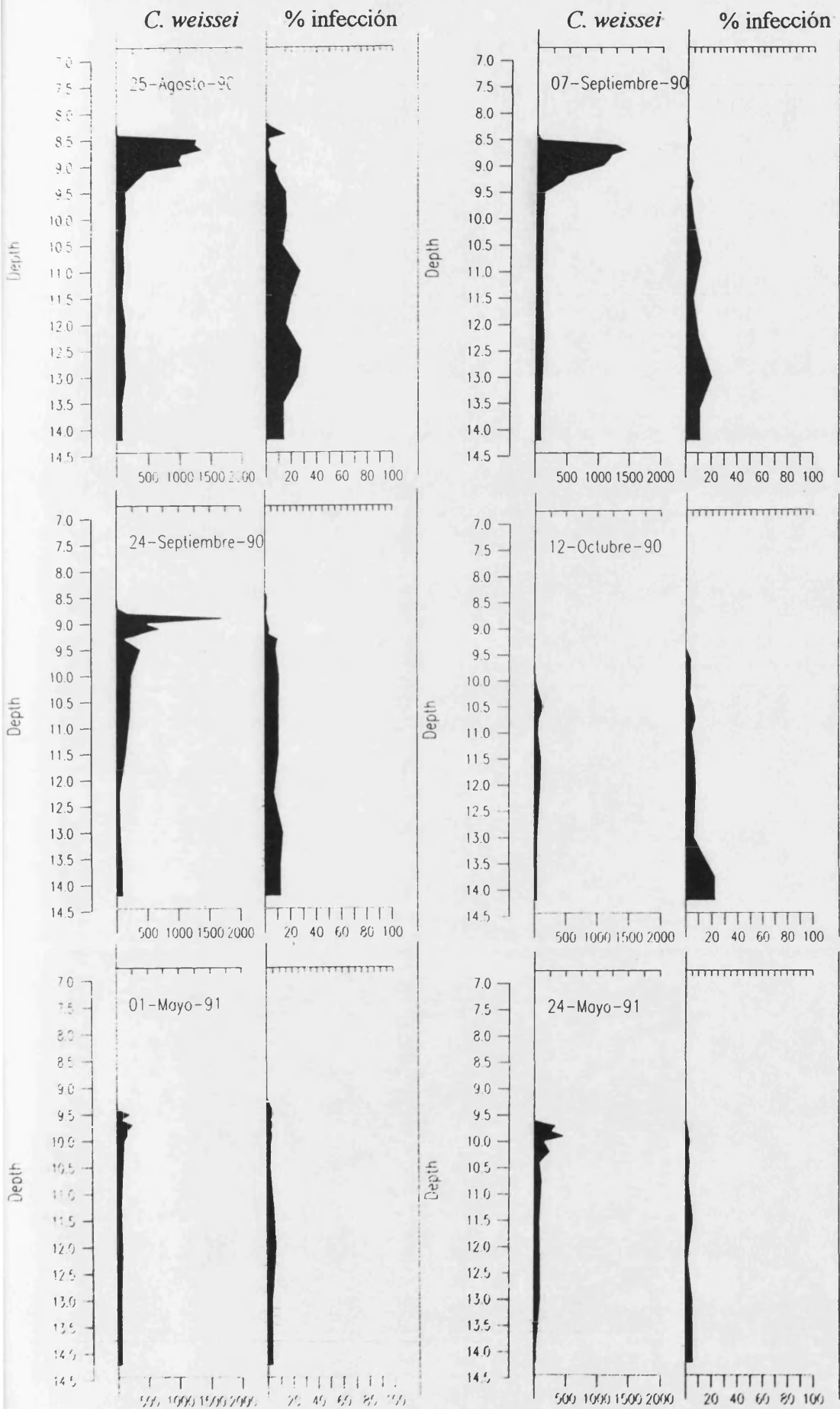
La ausencia de luz parece ser un factor fundamental para la célula huésped en la activación de la infección por predadores de microorganismos fotosintéticos, debido a que ello supone un estado fisiológico desfavorable en la célula hospedadora que la hace más susceptible de ser infectada. Ese tipo de infección se vio sobre células de *Chlorella* y aunque en un principio se penso en ese epibionte como un miembro del género *Bdellovibrio* (Gromov y Mamkayeva, 1972), las diferencias con los organismos de este género llevaron a excluir a este parásito del genero *Bdellovibrio* y a proponer como nuevo género *Vampirovibrio* para los predadores bacterianos que no entraban en la célula hospedadora (Coder y Starr, 1978; Gromov y Mamkayeva, 1980, Coder y Goff, 1986). El epibionte

descrito por Esteve *et al.*(1983) presenta unas características similares al de *Chlorella* y diferentes a *Bdellovibrio*, ya que no entra en la célula hospedadora, tiene un mecanismo particular de división, no lisa la célula huésped totalmente y no tiene flagelos pero si cápsula.

Mucho menos clara resulta la evolución temporal del porcentaje de infección (figura 7-2), aunque se apunta una ligera tendencia a ir aumentando el porcentaje de infección a lo largo del periodo de estratificación para frenarse y descender conforme se acerca el momento de la mezcla otoñal. Ese aumento en el porcentaje de infección hay que evaluarlo no sólo desde el punto de vista porcentual, sino también considerando que ese porcentaje de infección tiene lugar sobre una población cada vez mayor de *Chromatium weissei*, lo que supondría que el crecimiento de la población del epibionte (al menos en lo que se refiere a las células adheridas) se produciría en la primera mitad del periodo de estratificación de una forma más rápida que la de su hospedador. Sin embargo, como se ha comentado, esta evolución no es tan clara como para apoyar inequívocamente esta interpretación. Otros estudios (Esteve *et al.*, 1983) encontraban una máxima abundancia del epibionte después del declive de la población de *Chromatium*, lo que se interpretaba como que el epibionte (que en ese caso se reveló como un predador) atacaba principalmente a las células en estado fisiológico desfavorable, no siendo un factor determinante, aunque si coadyuvante, en el decaimiento de la población de *Chromatium*. Sin embargo, en el Lago de Estanya, la población de epibiontes seguía el mismo patrón de desarrollo que el de bacterias hospedadoras (Esteve *et al.*, 1992). Nuestros resultados no coinciden con ninguno de estos dos casos.

La aparición de más de una estructura epibiontica por célula de *Chromatium* no es un hecho infrecuente (figura 7-3). El máximo número de epibiontes, (entendido no como distintas células de un mismo epibionte sino como estructuras distintas, cada una en un lugar de adherencia diferente) infectando a una célula de *Chromatium weissei*, fue de cinco, y se detectó en una muestra de 10,5 metros de profundidad en el muestreo del día 4 de julio de 1990, aunque este fue el único caso con ese número de epibiontes. Más frecuente es encontrar células que cargan 3 ó 4 epibiontes, y aún más dos, aunque la situación más frecuente es que la célula infectada sólo lo sea por un epibionte. En la tabla 7-2 se ofrece el número medio de epibiontes por célula calculado en base al número de epibiontes que aparecía en cada célula individual.





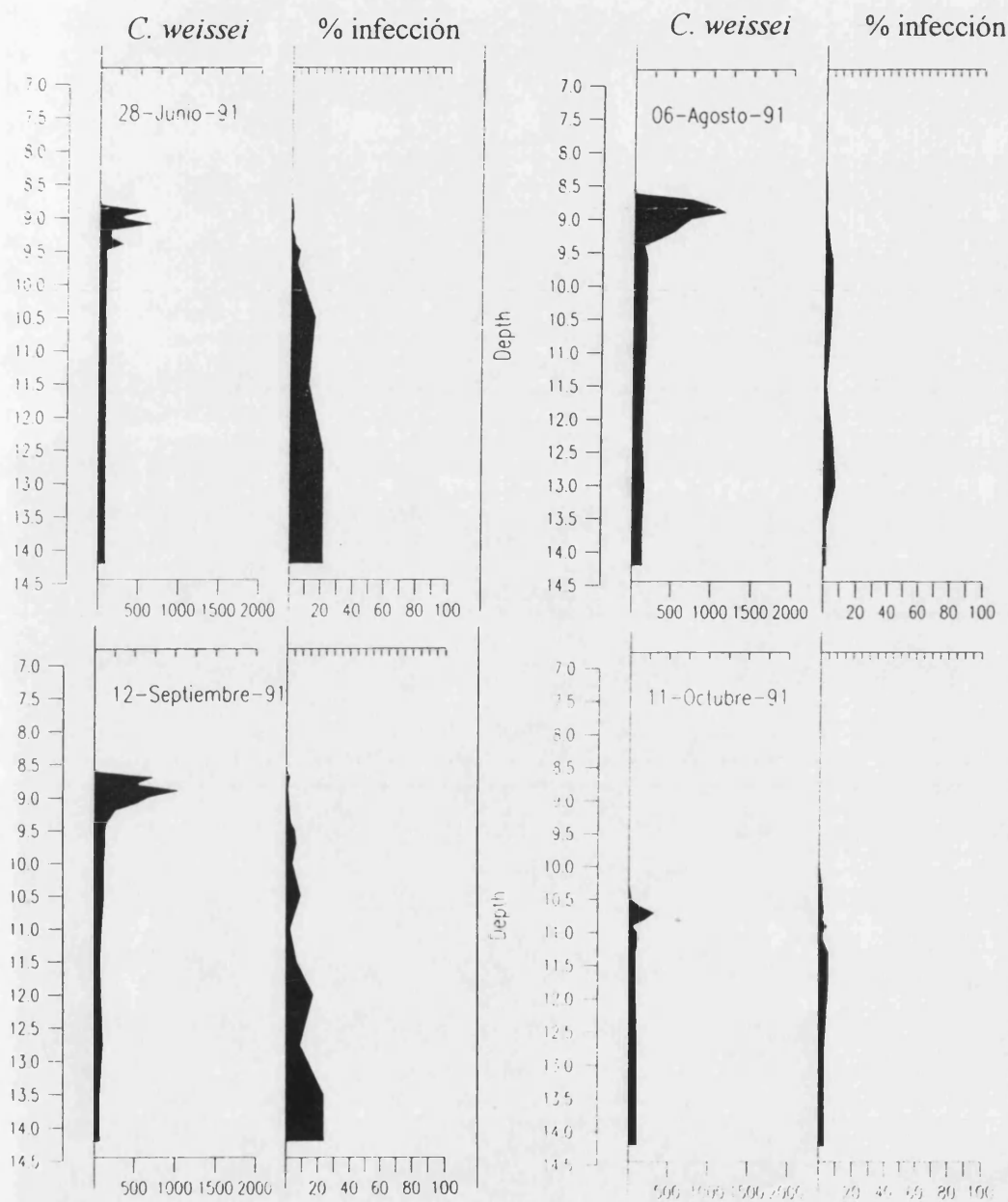


Figura 7-2.- Evolución temporal de la población de *Chromatium weissei* (cel·ml⁻¹ x 10³) y el porcentaje de infección (%) por su epibionte en el perfil vertical de la laguna de Arcas.
 Figure 7-2.- Temporal dynamics of the population of *Chromatium weissei* (cell·ml⁻¹ x 10³) and the infection by epibiontic bacteria (%) in the vertical profile of Lake Arcas.

Aunque no tan claramente como en el caso del porcentaje de infección, también aquí parece que la parte más profunda de la población de *Chromatium*, sedimentada de las capas superiores, presenta números medios ligeramente

mayores que los de la zona del "plate" (tabla 7-2). El análisis de la varianza ($F = 4,97$) también permite rechazar la hipótesis de igualdad en el número medio de epibiontes por célula entre la zona del "plate" y el resto de la población hipolimnética a un nivel de significación $p = 0,05$, aunque un nivel mayor de significación $p = 0,01$ supondría la aceptación de igualdad de medias. Guerrero y colaboradores (1986) encontraron medias de 1,4-3,26 células adheridas por célula de *Chromatium*, aunque la técnica utilizada fue la epifluorescencia, que no resulta muy buena para estos menesteres, por lo que posteriores recuentos realizados por microscopía electrónica de barrido dieron medias entre 1 y 2,5 que parecen más fiables (Gasol *et al.*, 1990) y son más similares a nuestros resultados.

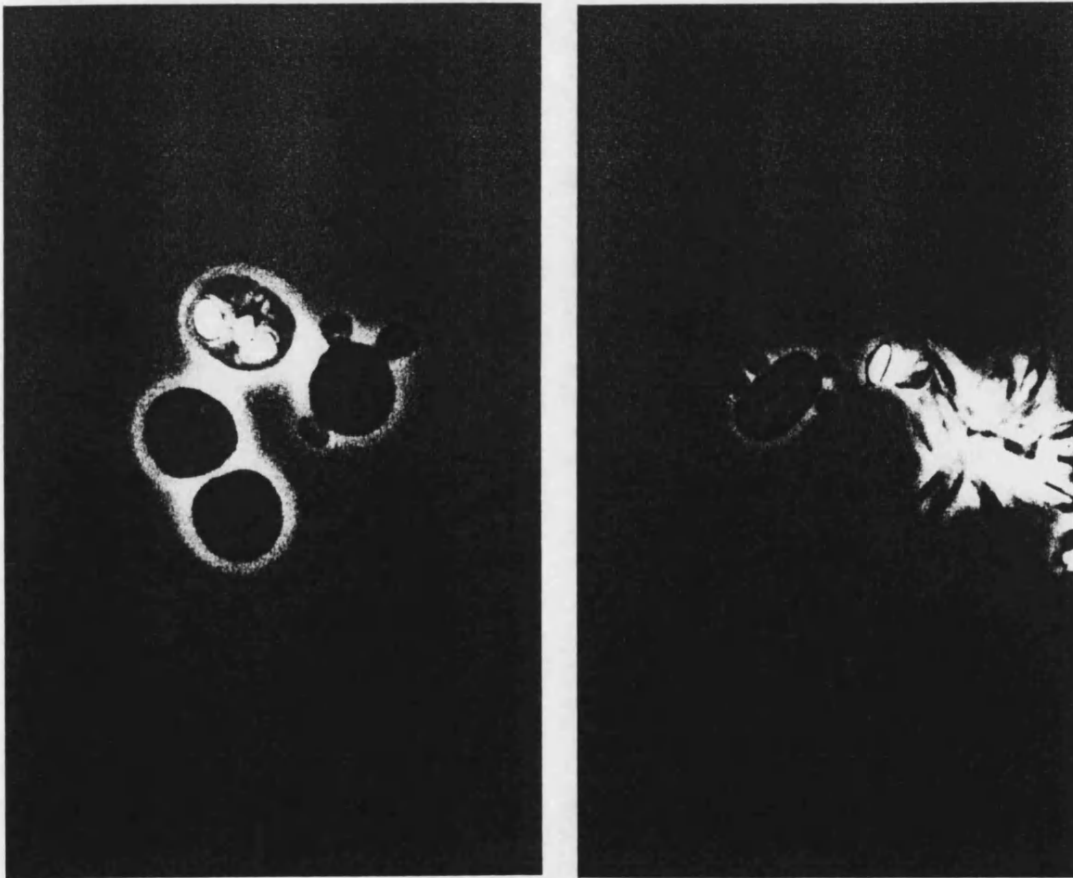


Figura 7-3.- Microfotografías *in vivo* al microscopio óptico de contraste de fases de una muestra del hipolimnion de la laguna de Arcas mostrando una infección múltiple sobre un células de *Chromatium weissel* (izquierda x 2000, derecha x1250).

Figure 7-3.- *In vivo* phase contrast micrographs of a hypolimnetic sample from Lake Arcas showing several epibiontic bacteria infecting *Chromatium weissel* cells (left -2000x, right - 1250x).

Tabla 7-2.- Número medio de epibiontes por célula de *Chromatium weissel* infectada en los distintos muestreos, considerando diferencialmente la zona del "plate" y el resto del hipolimnion. Entre paréntesis se muestran los valores para las fechas en las que no aparecía un "plate" bien delimitado, en cuyo caso la media se calculó para el conjunto de la columna de agua y se muestra entre paréntesis

Table 7-2.- Average values of epibiotic bacteria living on *Chromatium weissel* infected cells in some of the sampling dates, with differentiation of plate and deep hypolimnetic zones. When a clear plate did not appear, calculated values for the whole anoxic water column are shown in brackets.

FECHA	nº medio epibiontes por célula		FECHA	nº medio epibiontes por célula	
	'PLATE'	RESTO		'PLATE'	RESTO
13/10/89	(1,20)	(1,20)	24/09/90	1,06	1,16
23/02/90	(1,02)	(1,02)	12/10/90	(1,09)	(1,09)
23/03/90	(1,01)	(1,01)	1/05/91	(1,23)	(1,23)
28/04/90	(1,21)	(1,21)	24/05/91	1,01	1,07
17/05/90	(1,17)	(1,17)	27/06/91	1,01	1,17
8/06/90	1,08	1,10	6/08/91	1,07	1,02
4/07/90	1,20	1,38	3/09/91	1,05	1,10
30/07/90	1,09	1,69	12/09/91	1,02	1,13
25/08/90	1,09	1,18	1/10/91	1,06	1,12
7/09/90	1,11	1,27	11/10/91	(1,04)	(1,04)
18/09/90	1,08	1,20			

La infección por parte de epibiontes también se ha observado sobre células en división de *Chromatium weissel*. En la tabla 7-3 se muestra el porcentaje de células en división y el porcentaje de infección sobre estas células en división. También en este caso, el análisis de la varianza obtuvo un resultado que era significativo respecto a la menor infección sobre células en división que sobre células en otra fase del ciclo celular. Se comparó, tanto para el "plate" como para el resto del hipolimnion, si existía una diferencia significativa entre el porcentaje de células en división y el porcentaje de las células parasitadas que estaban en división. Tanto para las muestras del "plate" ($F = 19,03$, $p = 0,05$) como para las del resto del hipolimnion ($F = 8,63$, $p = 0,05$) la diferencia resultaba significativa. Además, el análisis de correlación entre la frecuencia de células en división y el porcentaje de infección mostró una correlación significativa ($p = 0,01$) e inversa entre ambos ($r = -0,5245$, $n = 235$). El menor porcentaje de infección sobre células en división podría resultar significativa en el sentido de que el epibionte pudiera causar algún perjuicio a la célula que le impidiera desarrollar el proceso reproductivo, sin embargo aún en ese caso, no se puede aventurar con nuestros resultados cual podría ser ese perjuicio. Es más, en el caso de infección por bacteriofagos se ha podido demostrar que éstos, en ocasiones, estimulan la división de la bacteria hospedadora (Lammers, 1992), con lo que el supuesto

efecto del epibionte sobre la división celular de *Chromatium weissei* aún queda menos claro.

Tabla 7-3.- Porcentaje de infección sobre células de *Chromatium weissei* en división respecto al porcentaje de células de *Chromatium weissei* en división en distintos muestreos en la laguna de Arcas, diferenciando las zonas del "plate" y del hipolimnion profundo.

Table 7-3.- Percentage of infection on *Chromatium weissei* dividing cells in comparison to the frequency of dividing cells of *Chromatium weissei* in several sampling dates in Lake Arcas, with differentiation of plate and deep hypolimnetic zones.

"PLATE"			RESTO HIPOLIMNION		
FECHA	% células en división	% infección sobre células en división	FECHA	% células en división	% infección sobre células en división
4/07/90	34,5	26,32	4/07/90	16,1	14,04
7/09/90	24,60	19,44	7/09/90	8,3	4,92
24/09/90	18,90	9,83	24/09/90	10,1	4,0
24/05/91	33,6	7,7	24/05/91	15,1	3,5
27/06/91	25,5	3,5	27/06/91	13,9	8,62
6/08/91	31,1	6,67	6/08/91	10,4	6,52
12/09/91	17,2	7,56	12/09/91	9,3	2,56
1/10/91	26,5	5,50			

Como ya comentamos en la introducción, la presencia de microorganismos epibiontes sobre células de *Chromatium*, si bien no siempre interpretada como tal, fue observada por distintos investigadores durante el último cuarto del siglo XIX y el primero del XX. Pero no fue hasta la pasada década cuando se realizaron los pocos trabajos que estudian en mayor profundidad la biología de estos organismos. (Esteve *et al.*, 1983, Guerrero *et al.*, 1986, 1987b). Esteve y colaboradores (1983) describen la presencia de microorganismos epibiontes Gram-negativos y capsulados, en parte parecidos a los de la laguna de Arcas, viviendo sobre células de *Chromatium minus* en el lago Cisó, del área lacustre de Banyoles, así como en el Lago de Estanya, los cuales, al igual que la laguna de Arcas presentan densas poblaciones de Cromatiaceas en su quimioclina. Estos autores, al igual que nosotros, sólo encontraron una infección selectiva sobre determinadas especies de *Chromatium*, y no sobre otras bacterias fotosintéticas. También encontraron que el epibionte sólo se dividía cuando se encontraba adherido a la célula de *Chromatium*, y que las células sobre las que se asentaba el epibionte mostraban signos de degradación celular, con formación de placas líticas en cultivo, aunque esto podría deberse a una situación fisiológica desfavorable como consecuencia de una permanencia prolongada en la oscuridad (Van Gemerden, 1980) y no necesariamente a degradación relacionada con el parásito. De hecho, el epibionte de la laguna de Arcas no ha mostrado hasta el

momento esa capacidad de lisis detectada en los epibiontes encontrados en otras lagunas. Tampoco el estudio por microscopía electrónica de transmisión ha revelado daños en las células hospedadoras de *C. weissei* en las proximidades de la zona de inserción del epibionte.

Por otro lado, el hecho de que la formación de placas líticas en el epibionte encontrando en otras lagunas diera resultados varios ordenes de magnitud inferiores a los recuentos microscópicos obtenidos para el epibionte (Esteve *et al.*, 1992), podría hacer pensar que la capacidad lítica del epibionte, caso de existir, es muy limitada, y sólo tendría lugar en muy raras circunstancias, como podría ser el alcanzar concentraciones de epibionte muy altas.

Guerrero y colaboradores (1986, 1987b) describieron otro microorganismo que atacaba a células de *Chromatium* penetrando en su interior, donde se divide y causa lisis celular, al que dieron el nombre provisional de *Daptobacter* (Gaju, 1987). Al epibionte que no entraba en las células, descrito por estos autores como un predador más o menos oportunista, anaerobio no móvil, le denominaron *Vamprococcus*. Estos microorganismos se observaron también en placas líticas obtenidas al añadir muestras con el epibionte a cultivos axénicos de Cromatiaceas.

Gaju y colaboradores (1992), utilizando para el recuento el método de formación de placas líticas sobre céspedes de *Chromatium*, estudiaron la distribución de las bacterias epibiontes en Cromatiaceas del Lago Cisó durante dos ciclos anuales, encontrando principalmente que el número de bacterias “predadoras” era máximo en la zona inmediatamente inferior a la del máximo de la población de la bacteria hospedadora, pero no existía una correlación significativa entre el número de células hospedadoras y el de predadores. En ese estudio poblacional también detectaron que al disminuir la cantidad de sulfhídrico aumentaba la población de bacterias predadoras, mientras que la de *Chromatium* no se veía afectada, para lo que se daban dos soluciones alternativas, bien que una menor cantidad de sulfhídrico favoreciera el desarrollo del predador o bien que supusiera un estado fisiológico desfavorable de *Chromatium*, lo que le haría más susceptible de ser infectado.

A diferencia del estudio anteriormente citado, Esteve y colaboradores (1992), estudiando la población de bacterias predadoras de *Chromatium* en el Lago de Estanya, encontraron correlaciones siempre significativas entre el número total de *Chromatium* y el de predadores, así como entre el número total de *Chromatium* y el de células infectadas y entre el número de *Chromatium* infectados y el número de predadores. Una observación muy interesante de este trabajo es que sólo se detectaron bacterias predadoras en aquellas muestras que contenían al menos 10^3 células por mililitro de la bacteria hospedadora, lo que sugeriría que, al igual que ocurre con *Bdellovibrio* (Varon *et al.*, 1984) o con bacteriofagos (Wiggins y Alexander, 1985; Abedon, 1989), la infección sólo se da de manera eficiente a

partir de unas concentraciones mínimas de la célula hospedadora. No obstante, *Bdellovibrio* tiene mecanismos de supervivencia que le permiten resistir los periodos desfavorables para la predación (Sánchez-Amat y Torrella, 1990). Así como se ha postulado la importancia de los bacteriofagos en el control de las poblaciones microbianas (Hennes *et al.*, 1995; Hennes y Simon, 1995), Esteve y colaboradores (1992) también reflexionaron sobre la importancia de la predación por bacterias en el control de las poblaciones de bacterias fotosintéticas, que anteriormente parecía mucho menos importante que el de otros factores como el lavado y la sedimentación, pero al que a la vista de sus resultados le atribuyen una mayor importancia que la que hasta entonces se le había dado.

Recientemente Pibernat (1995) describió la presencia de microorganismos epibiontes o endobiontes sobre especies de Clorobiaceas. Denominó *Vampirochlorobium* a un bacilo de 0,6 x 1 µm, con movilidad flagelar y que penetraba en las células de *Chlorobium limicola* y *Epipelodictyon* a una bacteria de 0,5 x 0,7 µm, inmóvil, que aparecía como epibionte extracelular de *Pelodictyon phaeoclathratiforme*.

En la laguna de Arcas, los epibiontes únicamente han sido observados sobre células de *Chromatium weissei*, dejando libres las células del resto de bacterias fotosintéticas presentes en la laguna. Este parece ser un patrón general en los epibiontes estudiados hasta ahora, ya que a pesar de la existencia de otras especies de bacterias fotosintéticas del azufre, este epibionte no se asienta nunca sobre ellas. Esto no puede ser explicado sólo en términos de abundancia de la bacteria hospedadora, ya que si bien ésta era normalmente más alta que la del resto de bacterias fotosintéticas, al menos en algunos casos se hubiera visto infección sobre esas otras bacterias, por lo que al menos debe existir algún tipo de especificidad en la relación entre las diversas especies de *Chromatium* y sus bacterias epibiontes, que podrían estar relacionados con receptores específicos como se vio en el caso de la infección por *Bdellovibrio* (Schelling y Conti, 1986).

El ciclo de vida y la morfología microscópica y ultraestructura del epibionte encontrado en la laguna de Arcas fue detallado por Clarke y colaboradores (1993) utilizando diversas técnicas de microscopía electrónica. El epibionte tiene una matriz citoplasmática granular, presentando ocasionalmente regiones especialmente densas (ADN) y pequeñas estructuras membranosas similares a los mesosomas que podrían estar relacionadas con el proceso de división. En la figura 7-4 se ha realizado un montaje fotográfico en el que se representa el hipotético ciclo de vida propuesto para el epibionte, acompañado de fotografías de microscopía electrónica que ilustran cada uno de esos estadios. Según esta hipótesis, cuando el epibionte se adhiere a la superficie de *Chromatium weissei*, rápidamente divide para formar la estructura más típica formada por dos células epibiontes apiladas, pudiendo dividirse de nuevo alguna de estas células, ya que todas las células del epibionte tienen capacidad de división. La célula terminal genera el estado dispersivo (normalmente uno pero en ocasiones dos o tres), a

modo de gemación que va creciendo, que es transferida a otra célula de *Chromatium* como inicio de un nuevo ciclo infeccioso. Este estadio dispersivo, al igual que el resto del epibionte, es inmóvil, por lo que depende del contacto físico con otras células de la bacteria hospedadora para su transmisión, ayudado en el proceso de transferencia por una cubierta de material adhesivo y finas espinas que le podrían servir como mecanismo de adherencia inicial (Allison y Sutherland, 1987). La existencia de dicho estado dispersivo no ha sido descrita en los otros epibiontes. Además, el epibionte descrito en el resto de trabajos tenía una cubierta capsular a su alrededor, lo que tampoco se detectó nunca en el caso del epibionte de *Chromatium weissei* que se encuentra en la laguna de Arcas.

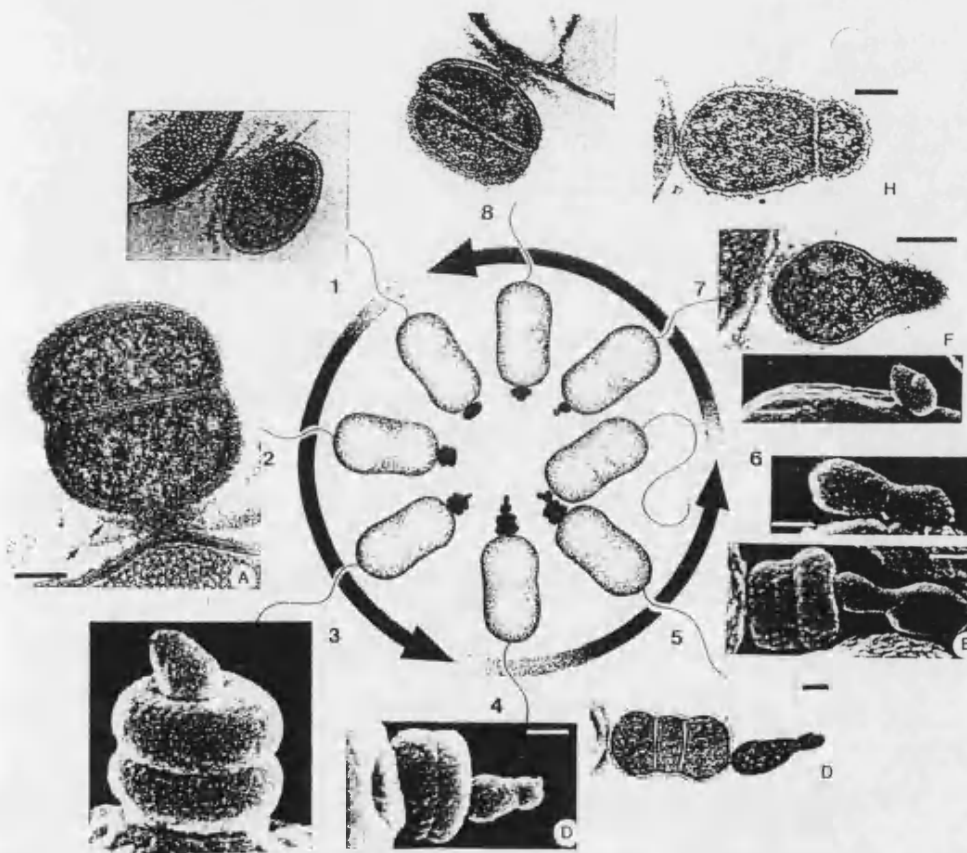


Figura 7-4 - Ciclo de vida hipotético del epibionte de *Chromatium weissei* de la laguna de Arcas (Basado en Clarke *et al.*, 1993). 1 Epibionte sobre *Chromatium weissei*. 2 Desarrollo de una segunda célula epibiontica. 3 Desarrollo del estado dispersivo en la célula distal. 4 Estado dispersivo totalmente desarrollado. 5 y 6 Transferencia del estado dispersivo a una nueva célula de *Chromatium weissei* hospedadora. 7 Establecimiento del estado dispersivo en el nuevo hospedador. 8 Desarrollo del epibionte a partir del estado dispersivo.

Figure 7-4 - Hypothetical life cycle of the Arcas epibiont (Base on Clarke *et al.*, 1993). 1 Epibiont on a *Chromatium weissei* host. 2 Development of second epibiont cell. 3 Development of dispersive stage on epibiont distal cell. 4 Fully developed dispersive stage. 5 and 6 Transfer of dispersive stage to a new *Chromatium weissei* host. 7 Dispersive stage established on a new *Chromatium weissei* host. 8 Development of epibiont from dispersive stage.

Las diferencias morfológicas y de ciclo de vida del epibionte, unidas a la ausencia de capacidad lítica, llevaron a Clarke y colaboradores (1993) a proponer la hipótesis de que el epibionte podría ser una bacteria heterótrofa cuyo crecimiento se haría en base al consumo de carbono orgánico disuelto (DOC) excretado por las bacterias fotosintéticas, hipótesis que apoyaban con datos de DOC medido en la zona del "plate". La existencia de un mayor porcentaje de infección en profundidad la explicaban, en base a una hipótesis que ampliaba la propuesta por Vicente y colaboradores (1991), en términos de: a) una menor tasa de crecimiento del hospedador por la ausencia de luz, b) un aporte continuo de *Chromatium weissel* infectados desde capas superiores y, c) la capacidad de crecimiento, reproducción e infectividad del epibionte se mantendría en el hipolimnion.

Si bien la hipótesis inicial de una bacteria heterótrofa no parásita podría ser coherente con los resultados de nuestro trabajo, no parecen tan claras las explicaciones en lo que se refiere a la mayor infección en profundidad. La referencia a un aporte continuo de *Chromatium weissel* infectados desde capas superiores no podría sustentar por si sola este hecho, ya que ese aporte de *Chromatium weissel* se dará tanto para bacterias infectadas como para las no infectadas, con lo que ello no supondría un enriquecimiento tan grande en el porcentaje de infección con la profundidad como el que nosotros encontramos, o en todo caso, el número medio de epibiontes por célula en profundidad aumentaría de manera acompasada al porcentaje de infección, lo cual no hemos encontrado en nuestro trabajo. Por eso es importante considerar que, como hemos podido comprobar, la tasa de reproducción de *Chromatium weissel* es bastante inferior en las capas profundas (capítulo 4), lo que de mantenerse la capacidad infectiva del epibionte en el resto del hipolimnion, podría hacer aumentar el porcentaje de infección durante el proceso de sedimentación. También importante puede ser el hecho de que puesto que el epibionte puede ser considerado como una unidad generadora de infección, unas tasas mayores de infección supondrían una mayor tasa de infectividad, lo que estaría en la línea de las explicaciones dadas por Vicente y colaboradores (1991) a esa mayor infección en profundidad, sin embargo eso significaría también que la tasa de infección iría creciendo durante todo el periodo de estratificación, especialmente a partir de final de agosto cuando la población de *Chromatium weissel* comienza a decrecer, y nuestros resultados al respecto indican que esa tendencia no se da.

La cantidad de DOC disponible en la zona del "plate" es mayor (Clarke *et al.*, 1993), por tanto, las mejores condiciones para el desarrollo del epibionte, caso de ser un heterótrofo no parásito debían darse en ese caso en la zona del "plate", siendo esperable que la diferencia entre el porcentaje de infección en función de la profundidad no fuera tan grande como la que hemos encontrado. Esta mayor concentración de DOC en la quimioclina podría explicarse por el hecho de que allí se concentra la mayor actividad fijadora de carbono (Mague *et al.*, 1980;

Lovell y Konopka, 1985b), y una parte, más o menos importante, de ese carbono podría ser excretada (Czeczuga y Gradski, 1983; Søndergaard *et al.*, 1988; Sundh, 1989, 1992a; Salonen *et al.* 1992, Siuda *et al.*, 1991, Kato, 1994). Sin embargo, esto resulta equívoco, ya que si bien en determinados casos se ha descrito la excreción como un mecanismo dependiente del estado fisiológico de la célula (Hino, 1988), también existen estudios que demuestran que en organismos fotosintéticos como el fitoplancton, la excreción, especialmente la de compuestos de bajo peso molecular, es un proceso pasivo que tiene lugar en cualquier situación fisiológica de la célula incluyendo las condiciones de oscuridad (Fogg, 1983, Berman y Kaplan, 1984, Sundh y Bell, 1992), y que se da independientemente de las tasas de fijación de carbono (Bratbak y Thingstad, 1985). Eso último nos llevaría a pensar que la existencia de mayores cantidades de DOC en la quimioclina se debe simplemente a que allí la cantidad de microorganismos fotosintéticos es más grande, lo que independientemente de las tasas de excreción haría que la concentración de DOC en el agua sea mayor, ya que todas las células, "sanas o no", realizarían esta excreción (Fogg, 1971; Mague *et al.*, 1980). El estudio del carbono orgánico disuelto producido fotosintéticamente (PDOC) en poblaciones de fitoplancton reveló que la fracción excretada correspondiente a compuestos de bajo peso molecular (<1000), era rápidamente utilizada por las bacterias heterótrofas, mientras que la fracción de elevado peso molecular (>10000) era menos utilizada (Sundh, 1992b), dependiendo la proporción relativa de esas fracciones de diversos factores. Sin embargo, la utilización de la materia orgánica disuelta proveniente de la excreción también parece depender de la concentración de N y P (Tulonen *et al.*, 1992), lo cual supondría que, al ser las concentraciones de estos elementos mayores al aumentar la profundidad en el hipolimnion, un organismo heterótrofo como se propone para el epibionte podría encontrar mejores condiciones para su desarrollo.

Algunas de las consideraciones expuestas en el apartado anterior han llevado al extremo de considerar a las bacterias heterótrofas planctónicas como ectoparasitos (y no mutualistas) de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos planctónicos (Bjørnsen, 1988) ya que, al consumir esos compuestos orgánicos de bajo peso molecular excretados reducirían la concentración extracelular de estos compuestos, lo que activaría más aún el proceso de exudación. Todo ello nos da una idea sobre la verdadera dificultad del establecimiento de las relaciones tróficas y nos hace ser prudentes a la hora de utilizar los términos habitualmente establecidos al referirse a las interacciones microbianas (Bull y Slater, 1982), mostrándonos que en ocasiones las fronteras no son tan claras como las que quisiéramos establecer.

Por otro lado, el desarrollo de varias células en lo que es una estructura epibiontica dificulta en parte la hipótesis de la predación, ya que sólo una célula está en contacto con la célula hospedadora, con lo que el epibionte, caso de depender de la lisis celular de *Chromatium* por él provocada, tendría que tener

mecanismos de transporte intercelular que permitieran que las sustancias obtenidas de la lisis del hospedador fueran transferidas a las células más distales.

Lo hasta ahora expuesto nos lleva a plantearnos una nueva hipótesis modificativa de la propuesta por Clarke y colaboradores (1993). Ciertamente es que la cantidad de carbono disuelto puede ser alta cuando existe una alta actividad fotosintética, por lo que el epibionte podría actuar en la quimioclina como un comensal del hospedador, ya que recogería sus “despojos”. Pero también debe considerarse que las células sedimentadas de *Chromatium* van degradándose durante el proceso de sedimentación (Cornett y Rigler, 1987) y siguen haciéndolo al llegar al sedimento, además de que la excreción probablemente continúe a niveles similares en condiciones de oscuridad (Bjørnsen, 1988). Esto supone que el epibionte adherido a *Chromatium weissii* dispondría de una fuente de alimentación independientemente del estado fisiológico de su hospedador. Cuando el hospedador se encuentra en la zona del “plate”, el epibionte puede vivir en base a las elevadas cantidades de DOC excretado, pero durante el proceso de sedimentación de *Chromatium weissii*, el mismo proceso de excreción, al que podría contribuir la degradación de la célula hospedadora en el hipolimnion, no necesariamente provocada por el epibionte, le seguiría suministrando sustancias que lo sustentarían, con lo que el epibionte actuaría en este caso como una especie de “carroñero”, pudiendo sacar provecho de su “soporte” incluso cuando este llegara al sedimento (Marshall, 1988). Lo que favorecería especialmente al epibionte no es la presencia del hospedador en una zona altamente productiva, sino su propia proximidad física a esa fuente de DOC que, independientemente de su situación metabólica, es la célula hospedadora, siendo la disposición de DOC un factor muy importante para las bacterias heterótrofas en los ecosistemas acuáticos (Nalewajko, 1977; Chrost, 1981; Chrost y Faust, 1983; Brock y Clyne, 1984; Baines y Pace, 1991), e incluso las excreciones pueden ser fuentes de otros elementos como el nitrógeno (Carman, 1994). Esa atracción por fuentes de material orgánico disuelto (DOM) no es nueva, ya que incluso bacterias de vida libre muestran una quimiotaxis positiva hacia dichas fuentes (Kangatharasingam *et al.*, 1991). Así, se ha descrito la adhesión, si bien sin una especificidad tan grande como en nuestro caso, de bacterias heterótrofas sobre microorganismos fotosintéticos como diatomeas (Rosowski, 1992) y cianobacterias (Lupton y Marshall, 1984; Paerl *et al.*, 1989, 1993), e incluso la asociación de bacterias fotosintéticas con posibilidad de metabolismo heterótrofo con cianobacterias (D’Amelio *et al.*, 1987), lo que les supone a dichas bacterias una mayor accesibilidad a las sustancias excretadas (Wang y Priscu, 1994). De hecho, el proceso de adhesión a superficies, tanto vivas como inertes, resulta importante en muchas bacterias heterótrofas (Pedrós-Alió y Brock, 1983; Kjelleberg *et al.*, 1985; Marshall, 1988), ya que, entre otras ventajas, les facilita la accesibilidad a sustancias metabolizables.

Por otro lado, la formación de la fase infectiva podría estar relacionada con el establecimiento de una distancia excesiva entre la célula distal de la estructura

epibiótica y la hospedadora, de manera que, independientemente de que la transmisión de nutrientes fuera intracelular o a través del medio circundante, esta distancia excesiva dificultaría la llegada de las sustancias orgánicas hacia la célula distal, que podría desencadenar el mecanismo de formación del estado dispersivo.

Como el lector podrá observar, este capítulo, el último de la tesis, abre quizá más interrogantes de los que despeja, no solo en los referente a los aspectos concretos estudiados, sino también respecto a consideraciones más teóricas que las aquí tratadas. Esto, teniendo en cuenta que la realización de una Tesis Doctoral constituye tan solo el comienzo de una vida científica, resulta importante en el establecimiento de una actitud abierta hacia cualquier tipo de hipótesis, lo que en mi opinión supone la base del avance de la ciencia.

CONCLUSIONES

La Laguna de Arcas está situada en el humedal localizado en las cercanías de la localidad del mismo nombre, formación cárstica que contiene hasta 35 dolinas, muchas de ellas temporal o permanentemente inundadas. La laguna estudiada en nuestro trabajo tiene dos cubetas, siendo en la más profunda (14,2 m), en la que se ha centrado este trabajo. El conjunto del humedal se encuentra asentado en una zona carstificada sobre materiales paleógenos, donde entre las margas y arcillas dominantes se intercalan masivos yesos y delgados lentejones de calizas dolomíticas. Las dolinas se originan por la carstificación subterránea de los yesos seguidas del hundimiento de las arcillas superiores. La disolución de los yesos y otros materiales solubles confiere a sus aguas una elevada conductividad (2,1-3,3 mS/cm), con altas concentraciones de sulfato y calcio. La cuenca de alimentación de la laguna es prácticamente inexistente, por lo que sus aportes hídricos se basan en aguas subterráneas.

La morfometría de la laguna, con una baja relación superficie-volumen (profundidad relativa 31 %), determina unas condiciones muy favorables para la estratificación, aunque el hecho de encontrarse poco protegida en su superficie facilita la inestabilidad en periodos en los que el gradiente térmico no es muy importante. Las condiciones meteorológicas condicionan un periodo de estratificación que tiene lugar entre los meses de mayo y octubre, produciéndose la circulación de las aguas hacia mediados de este último mes. Durante el periodo de estudio recogido en esta memoria, entre 1989 y 1991, las temperaturas fueron por regla general más cálidas que la media de la zona, lo que unido a periodos de déficit de precipitaciones, permitió la aparición de incipientes fenómenos de estratificación y formación de una capa anóxica profunda incluso en algunos momentos de final de invierno y primavera temprana, que se veían interrumpidos cuando las condiciones meteorológicas empeoraban.

En un sistema estratificado, como la Laguna de Arcas, las técnicas de muestreo difieren de las utilizadas rutinariamente en Limnología, ya que se debe prestar una atención especial a las zonas en las que se establecen abruptos gradientes físico-químicos, lo que requiere un muestreo fino en dichas zonas y un extremado cuidado en la manipulación y análisis de las muestras de agua.

Durante la mayor parte del periodo de estratificación la termoclina sitúa su base en torno a los 8 metros de profundidad para bajar a los 10,5-11 metros al aproximarse la mezcla otoñal. Sin embargo el inicio del gradiente térmico, situado en torno a 2,5-3 metros en primavera va descendiendo progresivamente durante el periodo estival. El descenso de las temperaturas a final del verano da lugar a un enfriamiento de las aguas superficiales, lo que unido a la entrada de agua freática en profundidad acentuada por las lluvias otoñales, finalmente resulta en la destrucción de la estructura térmica estratificada y la circulación vertical de las aguas

En ese periodo de estratificación, el final de la termoclina determina la formación en profundidad de un hipolimnion anóxico que se extiende entre los 8-9 metros y el fondo de la laguna, y que como consecuencia de los importantes procesos de sulfato-reducción en las aguas anóxicas alcanza rápidamente elevadas concentraciones de sulfhídrico (0-0,5 mM en la quimioclina y hasta 3 mM en las aguas del fondo). Las aguas epilimnéticas mantienen sus concentraciones de oxígeno por encima de la saturación, produciéndose máximos de oxígeno durante la primavera y principio del verano, que van situándose más abajo en el mixolimnion conforme avanza este periodo. Estos máximos de oxígeno coinciden con incrementos del pH de algunas décimas de unidad. En el seguimiento del ciclo diario, se detecta en las cercanías de la interfase óxica-anóxica pequeños picos de oxígeno, coincidiendo con las máximas densidades de microorganismos fotosintéticos oxigénicos que se encuentran en la quimioclina. El pH de la laguna, ligeramente alcalino (7,6-8) en las aguas superficiales, va disminuyendo en profundidad durante el periodo de estratificación, pudiendo tomar valores ligeramente por debajo de pH 7 en las cercanías del fondo. El potencial de óxido-reducción, con valores propios de un sistema oxidante en las aguas superficiales, llega a potenciales muy reductores (Eh -150 mV) en las aguas hipolimnéticas ricas en compuestos reducidos, principalmente sulfhídrico.

La mineralización de las aguas es relativamente elevada (conductividades de 2,1 a 3,3 mS·cm⁻¹), siendo el sulfato el anión dominante (34-37 meq·l⁻¹), con alcalinidades que en las aguas epilimnéticas se encuentran entre 3 y 4 meq·l⁻¹ y mucho menos abundante el cloruro (0,25 meq·l⁻¹). Los cationes están dominados por el calcio (38 meq·l⁻¹) y el magnesio (6 meq·l⁻¹), con concentraciones mucho más reducidas de cationes monovalentes (Na⁺=0,18 meq·l⁻¹ , K⁺=0,05 meq·l⁻¹).

El análisis de los nutrientes inorgánicos denota una limitación de la producción primaria epilimnética por la carencia de fósforo, muy escaso en el epilimnion (normalmente por debajo de 0,03 μM) y que alcanza mayores concentraciones en el hipolimnion. Las densas poblaciones de bacterias fotosintéticas que se encuentran en la quimioclina podrían ejercer un efecto de filtro biológico, que dificultaría aún más la difusión del fósforo desde las aguas hipolimnéticas hacia el epilimnion. El amonio es el compuesto de nitrógeno inorgánico dominante en toda la columna de agua, especialmente en el hipolimnion (hasta 1 mM), con importantes concentraciones epilimnéticas de nitrato (10-30 μM), mientras que el nitrito toma valores mucho más bajos. El silicato, importante en el desarrollo de las poblaciones de diatomeas, se encuentra de forma abundante en las aguas de la laguna (0,15-0,6 mM).

La interfase óxica-anóxica, en cuyos alrededores se establece una quimioclina con acusados gradientes físico-químicos, es la zona de la laguna en la que durante el periodo estival se alcanzan elevadas densidades poblacionales de microorganismos fotosintéticos. Estas poblaciones se estratifican verticalmente de manera abrupta en la quimioclina, de manera que sus densidades

poblacionales varían mucho en rangos de profundidad que se miden en centímetros. En la parte superior de la quimioclina, en aguas microaerobias o anóxicas, *Cryptomonas* spp. alcanza sus máximas densidades poblacionales (hasta 38000 ind ml⁻¹). Ligeramente por debajo suelen encontrarse los máximos de *Oscillatoria ornata* (que llegan casi hasta 1000 filamentos ml⁻¹), una cianobacteria filamentosa que presenta especiales adaptaciones al sulfhídrico. El máximo de esta cianobacteria coincide aproximadamente con el de *Chromatium weissei*, bacteria fotosintética del azufre que alcanza densidades poblacionales próximas a los 2 millones de células por mililitro en el momento de mayor desarrollo de la población. Tanto *Oscillatoria ornata* como *Chromatium weissei* siguen alcanzando números elevados en el resto del hipolimnion, debido principalmente a la sedimentación de las poblaciones de la quimioclina. Además de estos tres microorganismos, otras bacterias fotosintéticas como *Amoebobacter* sp., *Thiocapsa* sp., *Chomatium okenii* y *Pelodictyon clathratiforme* están presentes en las aguas hipolimnéticas ricas en sulfhídrico, pero sus densidades poblacionales, comparadas en términos de biovolumen, son mucho menores. Otras cianobacterias filamentosas, de las que se aislaron *Oscillatoria tenuis* y *Pseudanabaena* sp., aparecen ocasionalmente en las aguas de la laguna, en muy bajas densidades poblacionales. El desarrollo de las densas poblaciones de microorganismos fotosintéticos en la quimioclina se produce durante el periodo de estratificación estival, e incluso durante cortos periodos de estratificación a final de invierno o principio de la primavera aparecen incipientes poblaciones en las capas anóxicas.

La evolución de las poblaciones y sus tasas de crecimiento siguen unos patrones más claros en el caso de los dos microorganismos más abundantes, *Chromatium weissei* y *Oscillatoria ornata*, que se observan mejor en el año 1990 que 1991. *C. weissei* aumenta su población durante el periodo de estratificación hasta final de agosto, momento en el cual se produce un lento declive que se acelera en el mes de octubre. Esto mismo se observa para *Amoebobacter* sp. y, menos claramente, para *Thiocapsa* sp. y *Pelodictyon clathratiforme*. Esta evolución se pone de manifiesto en el cálculo de las tasas netas de crecimiento poblacional, muy elevadas al principio del periodo de estratificación y que se reducen después hasta llegar a los máximos poblacionales del mes de agosto, haciéndose negativas posteriormente. *Oscillatoria ornata*, tiene un comportamiento similar a los anteriores, a excepción del periodo final de la estratificación, en el cual no sólo su población no disminuye sino que puede aumentar. Por su parte, la población de *Cryptomonas* spp. presenta una evolución temporal mucho más anárquica, lo que se atribuye a su mayor sensibilidad a factores como la predación o disponibilidad de nutrientes.

La frecuencia de células en división no puede utilizarse para el cálculo de la tasa de crecimiento poblacional de *Chromatium weissei* sin realizar las correcciones oportunas, pero su determinación sí que reveló que el crecimiento de la población

de este microorganismo tiene principalmente lugar en la capa superior de esa población, que se encuentra fotosintéticamente activa.

Las poblaciones epilimnéticas de algas están dominadas por diatomeas, en concreto las especies *Cyclotella stelligera* y *Cyclotella distinguenda*, que abarcan la mayoría de la biomasa fitoplanctónica. Las poblaciones de zooplancton están dominadas por el copépodo *Tropocyclops prasinus*, con mención especial a los rotíferos *Anuraeopsis fissa* y *Filinia hofmanii*, que aparecen asociados a las aguas microaerobias siendo abundantes en las proximidades de la interfase óxico-anóxica. Especialmente abundantes en las aguas hipolimnéticas son los ciliados anaerobios con bacterias metanógenas simbioses (p. ej. *Caenomorpha* spp. y *Lacrymaria* spp.), algunos de los cuales se alimentan básicamente de los organismos fotosintéticos como *Cryptomonas* spp.

El análisis de componentes principales de las variables físico-químicas y biológicas estudiadas pone de manifiesto que el paso de un ambiente oxidante en las aguas epilimnéticas a un ambiente reductor en las hipolimnéticas es el factor principal que gobierna tanto la composición química del agua como la estructura de la comunidad de microorganismos fotosintéticos. Un segundo factor, de mucho menos peso, separa el gradiente existente en la zona anóxica, lo que se observa claramente en la representación de las muestras en el espacio determinado por ambos factores.

La penetración luminosa en las aguas de la laguna se ve condicionada por la presencia de organismos fotosintéticos en ella. Durante el periodo de mezcla la luz resulta detectable hasta el fondo de la laguna, mientras que durante la estratificación las densas poblaciones de microorganismos fotosintéticos situadas en la quimioclina absorben prácticamente toda la luz que les llega. Los fotones que llegan a la quimioclina son mayoritariamente de una longitud de onda comprendida entre 500 y 600 nm, debido a la absorción selectiva en capas superiores por el agua, materia en suspensión y poblaciones fitoplanctónicas. Para poder captar eficientemente la luz en las profundidades en las que se sitúan, estos microorganismos poseen pigmentos accesorios, okenona en el caso de las Cromatiaceas y ficoeritrina en el de *Oscillatoria ornata* (y probablemente también en el de *Cryptomonas* spp.), que son los apropiados para captar los fotones en esa banda espectral.

Las concentraciones de pigmentos clorofilicos alcanzadas durante el periodo de estratificación en las aguas en torno a la interfase óxico-anóxica fueron muy elevadas para este tipo de lagos. La clorofila *a* alcanzaba los 150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ e incluso valores superiores de manera puntual y la bacterioclorofila *a* superaba los 700 $\mu\text{g.l}^{-1}$, mientras que en el resto del hipolimnion los valores oscilaban entre 20 y 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ para la clorofila *a* y los 50 y 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ para la bacterioclorofila *a*. A diferencia de estos elevados valores, la concentración de clorofila *a* en las aguas

óxicas de la laguna se hallaba comprendida entre los 2 y los 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ durante todo el año, con máximos primaverales ligeramente superiores.

La producción fotosintética en la laguna, que en las aguas epilimnéticas presenta una limitación debida a la carencia de fósforo, tiene una marcada limitación por la luz disponible en el caso de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos de la quimioclina. La cantidad de carbono fijado por unidad de volumen de agua en la quimioclina es mucho más elevada (hasta cerca de $200 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$) que en las aguas epilimnéticas, debido a las elevadas densidades poblacionales de microorganismos fotosintéticos allí acumulados. Sin embargo estas altas tasas solo se encuentran en un rango de profundidades muy pequeño, e implican a un pequeño volumen de agua, por lo que a pesar de las bajas tasas encontradas en el epilimnion, este contribuye en un 82-83 % de la fotoasimilación registrada durante el periodo estival, siendo el 16-17 % restante lo atribuible a la fotoasimilación en la quimioclina, de la que un 30-35 % era oxigénica. En presencia de sulfhídrico, debida a la actividad fotosintética de *Oscillatoria ornata*. En comparación con los lagos estudiados por otros autores, la Laguna de Arcas presenta en la quimioclina una de las tasas de fotoasimilación de carbono inorgánico por unidad de volumen más altas medidas hasta la fecha. Sin embargo, la contribución a la fotoasimilación total solo es ligeramente superior a descrita para la mayoría de los otros lagos, siendo muy inferior a los casos de mayor contribución como el Solar Lake. Esto se debe a la densa pero estrecha banda de profundidad en la que se produce esta actividad.

La cantidad y calidad de la luz resultaba ser el principal factor limitante de la fotoasimilación por las poblaciones de la quimioclina, lo que quedó puesto de manifiesto al incubar muestras de la profundidad con mayor densidad de organismos fotosintéticos a profundidades del lago más iluminadas (producción potencial) en ausencia de un gradiente importante de temperatura. Sin embargo, a pesar de dicha limitación, la eficiencia fotosintetizadora era máxima en la profundidad de procedencia de la muestra, lo que mostraba inequívocamente la buena adaptación de estas poblaciones a la intensidad y composición espectral de la luz que les llega. Además de la producción fotosintética, la asimilación oscura alcanza también en la quimioclina del lago valores elevados..

En la interfase óxico-anóxica y en la parte superior de la quimioclina, la actividad fotosintética oxigénica se mantiene a carga de *Oscillatoria ornata*, incluso en presencia de sulfhídrico si banda espectral de la luz que llega lo permite. Esta cianobacteria *Oscillatoria ornata* cuenta con ficoeritrina como pigmento accesorio, lo que le permite captar de forma eficiente la luz que llega a la parte superior de la quimioclina, pero, dado que la luz captada por el complemento biliproteico (ficobilisomas) se canaliza a través del fotosistema II, ello significa que el proceso fotosintético de esa cianobacteria debe ser predominantemente oxigénico, para lo cual es necesaria una cierta resistencia del PSII al sulfhídrico. Los experimentos de adaptación de los procesos fotosintéticos en la presencia de

sulfhídrico ponen de manifiesto que, de las tres cepas de cianobacterias filamentosas aisladas de la Laguna de Arcas, solo *O. ornata* presenta esa resistencia de su PSII a las concentraciones de sulfhídrico que se encuentran en la parte superior de la quimioclina de la laguna. Además de esa resistencia al sulfhídrico del PSII de *O.ornata*, esta cianobacteria y, sobre todo, *Pseudanabaena* sp. presentan la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigénica utilizando el sulfhídrico como dador de electrones, pero lo antedicho en cuanto a la captación de la luz resta importancia a dicha capacidad como característica adaptativa.

Los resultados obtenidos en el estudio ecofisiológico de *O. ornata*, que incluyen datos accesorios sobre la flotabilidad de sus filamentos han permitido el establecimiento de un modelo de funcionamiento de las poblaciones de esta cianobacteria en la Laguna de Arcas. Según el mismo, en parte todavía hipotético, los filamentos de este organismo se situarían en la parte superior de la quimioclina, en aguas que ya presentan sulfhídrico, donde realizarían un proceso fotosintético preferentemente oxigénico, cargándose de sustancias de reserva hidrocarbonadas que elevarían su densidad, con lo que se hundirían lentamente en las capas hipolimnéticas profundas a las que no llega la luz. Para su mantenimiento en la oscuridad, *O. ornata* realizaría un metabolismo fermentativo endógeno de esas sustancias acumuladas, lo que progresivamente reduciría el volumen de sustancias de reserva contenido en las células que iría siendo sustituido por vesículas gaseosas de nueva síntesis, produciéndose en consecuencia un descenso en la densidad de flotación y por tanto un aumento de su flotabilidad, que llevaría al filamento de nuevo a la capa superior de la quimioclina donde comenzaría nuevamente el proceso fotosintético. La lentitud del metabolismo anaerobio fermentativo acoplaría la velocidad de la degradación de esas sustancias a la de formación de vesículas gaseosas. Aunque el apartado correspondiente a la fermentación no sido comprobado, existen numerosas citas bibliográficas referidas a cianobacterias similares que lo avalan.

La presencia de *Cryptomonas* spp. en las capas microaerobias y anaerobias de la laguna no ha podido justificarse tan claramente como la de *O.ornata*. Sin embargo, la explicación dada por algunos autores según la cual estos organismos se sitúan en capas ricas en sulfhídrico para huir de la predación quedaría descartada en nuestro caso, dado que *Cryptomonas* spp. sufre una importante predación en esta zona de la laguna, especialmente debido a la presencia de ciliados, aerobios y anaerobios, que habitan estas aguas. Más plausible sería la hipótesis de que estos organismos se sitúan allí por ser una zona de compromiso entre las disponibilidades de luz (a la que estarían especialmente adaptadas) y nutrientes (que difunden desde las aguas hipolimnéticas) y las limitaciones dadas por un ambiente anóxico rico en sulfhídrico.

De todos los microorganismos estudiados, el que presenta mayores densidades poblacionales en la Laguna de Arcas es la bacteria fotosintética del azufre

Chromatium weissei. Sobre células de la misma se encuentra con frecuencia una especie de bacteria Gram-negativa que vive como epibionte sobre *C. weissei*, al que se une de manera permanente. Ese epibionte es bastante similar a un predador bacteriano, *Vamprococcus*, descrito anteriormente por otros autores, sin embargo presenta diferencias esenciales respecto a ese predador, como es la ausencia de capacidad lítica (o al menos esta no ha sido detectada), la existencia de un estado dispersivo y diferencias en la composición de la cubierta celular (ausencia de cápsula). La población de la bacteria hospedadora presenta un mayor porcentaje de infección en las aguas hipolimnéticas más profundas, con también un mayor número medio de epibiontes por célula en esta zona. En base a nuestros resultados se ha postulado una hipótesis alternativa a la de la predación y que complementa la propuesta por Clarke *et al.* (1993). Según nuestra hipótesis, el epibionte sería una bacteria heterótrofa que, a diferencia de lo propuesto por estos autores, no sólo se alimenta del DOC excretado en las zonas en la que la actividad fotosintética de su hospedador es alta, sino que también se aprovecha del proceso de degradación de sus células que libera sustancias al medio inmediatamente próximo en el que ellos se encuentran, lo que tiene lugar durante todo el proceso de sedimentación de la célula hospedadora. En este caso, la proximidad física sería el factor determinante para el epibionte, y no necesariamente la situación en la capa productiva más rica en DOC. La capacidad de lisis provocada por el epibionte, aunque no se descarta, no ha sido encontrada en nuestro caso, por lo que postulamos que, de existir, podría tratarse sólo de un proceso inducido por condiciones desfavorables para el epibionte. Este epibionte desarrolla un peculiar ciclo de vida que implica la formación de una estructura de varias células apiladas adherida a la célula de *C. weissei*, que forma en su extremo distal una estructura dispersiva. Nuestra hipótesis es que la activación del mecanismo de producción de la misma puede deberse al establecimiento de una distancia excesiva respecto a la célula hospedadora, cuya consecuencia sería un menor acceso a los nutrientes provenientes del hospedador.

CONCLUSIONS

La llacuna d'Arcas està situada a l'humedal localitzat en les rodalies de la localitat del mateix nom, que conté fins a 35 dolines, moltes de les quals temporal o permanentment inundades. La llacuna estudiada per nosaltres té dos cubetes, sent en la més fonda (14,2 m), en la que s'ha centrat aquest treball. El conjunt de l'humedal es troba assentat en una zona càrstica sobre materials paleògens, on entre les margues i argiles dominants s'intercalen massius guixos i primers dentillons de calices dolomítiques. Les dolines s'originen per la carstificació subterrània dels guixos seguida d'un enfonsament de les argiles superiors. La dissolució dels guixos y altres materials solubles confereix a les seues aigües una elevada conductivitat (2,1-3,3 mS/cm), amb altes concentracions de sulfat i calci. La conca de la llacuna és pràcticament inexistent, per la qual cosa es mantén en base a aigües subterrànies.

La morfometria de la llacuna, amb una baixa relació superfície-volum (profunditat relativa 31 %), determina unes condicions molt afavoridores per a l'estratificació, encara que el fet de trobar-se poc protegida en la seua superfície facilita la inestabilitat en períodes en els que el gradient tèrmic no és molt important. Les condicions meteorològiques condicionen un període d'estratificació que té lloc entre els mesos de maig i octubre, produint-se la circulació de les aigües cap a mitjan d'aquest últim mes. Al llarg del període d'estudi recollit en esta memòria, entre 1989 i 1991, les temperatures foren per regla general més càlides que la mitja de la zona, el que unit a períodes de dèficit de precipitacions, va permetre l'aparició d'incipients fenòmens d'estratificació i formació d'una capa anòxica fonda inclús en alguns moments de final d'hivern i primavera primerenca, que es veien interromputs quan les condicions meteorològiques empitjoraven.

Al llarg de la major part del període d'estratificació la termoclina situa la seua base al voltant dels 8 metres de fondària per baixar als 10,5-11 metres en aproximar-se la mescla de la tardor. Tot i aixó, l'inici del gradient, situat al voltant a 2,5-3 metres va baixant progressivament al llarg del període estiuenc. La baixada de les temperatures a final de l'estiu dona lloc a un refredament de les aigües superficials, la qual cosa, unida a l'entrada de aigües freàtiques debudes a les pluges de la tardor, porta finalment a la destrucció de l'estructura tèrmica estratificada i la circulació vertical de les aigües.

En aquest període d'estratificació, la fondària inferior de la termoclina determina la formació en profunditat d'un hipolimnion anòxic, situat entre els 8-9 metres i el fons de la llacuna, que a conseqüència dels importants processos de sulfatoreducció assoleix ràpidament elevades concentracions de sulfhídric (0-0,5 mM en les proximitats de la quimioclina i fins a 3 mM en les aigües del fons). El potencial d'òxido-reducció, amb valors propis d'un sistema oxidant en les aigües

superficials, arriba a potencials molt reductors (Eh -150 mV) en les aigües hipolimnètiques riques en substàncies reduïdes, principalment sulfhídric.

La mineralització de les aigües és relativament elevada (conductivitats de 2,1 a 3,3 mS·m⁻¹), sent el sulfat l'anió dominant (34-37 meq·l⁻¹), amb alcalinitats que en les aigües epilimnètiques es troben entre 3 i 4 meq·l⁻¹, i molt menys abundant el clorur (0,25 meq·l⁻¹). Els cations estan dominats pel calci (38 meq·l⁻¹) i el magnesi (6 meq·l⁻¹), amb concentracions molt més reduïdes de cations monovalents (Na⁺ = 0,18 meq·l⁻¹, K⁺ = 0,05 meq·l⁻¹).

L'anàlisi dels nutrients inorgànics denota una limitació de la producció primària epilimnètica per la carència de fòsfor, molt escàs en l'epilimnion (normalment per davall de 0,03 µM), pujant la seua concentració a l'hipolimnion. L'ammoni es el compost de nitrogen inorgànic majoritari en tota la columna d'aigua, especialment a l'hipolimnion (fins a 1 mM), amb importants concentracions epilimnètiques de nitrat (10-30 µM), mentre que el nitrit pren valors molt més baixos. El silicat, important en el desenvolupament de les poblacions de diatomees, es troba de forma abundant en les aigües de la llacuna (0,15-0,6 mM).

La interfase òxico-anòxica, en les rodalies de la qual s'estableix una quimioclina amb acusats gradients fisico-químics, és la zona de la llacuna en la que durant el període estiuenc s'assoleixen elevades densitats poblacionals de microorganismes fotosintètics. Estes poblacions s'estratifiquen verticalment de forma abrupta en la quimioclina, de forma que les seues densitats poblacionals varien molt en rangs de fondària que es medeixen en centímetres. En la part superior de la quimioclina, en aigües microaeròbies o anòxiques, *Cryptomonas* spp assoleix les seues màximes densitats poblacionals (fins a 38000 ind·ml⁻¹). Lleugerament per davall solen trobar-se els màxims de *Oscillatoria ornata* (que arriben quasi fins a 1000 filaments·ml⁻¹), una cianobactèria filamentosa que presenta especials adaptacions al sulfhídric. Aquest màxim coincideix aproximadament amb el de *Chromatium weissei*, bactèria fotosintètica sulfúrea que arribha a densitats poblacionals pròximes als 2 milions de cèl·lules per mililitre en el moment de major desenvolupament de la població. Tant *Oscillatoria ornata* com *Chromatium weissei* segueixen arribant a valors elevats en la resta del hipolimnion, degut principalment a la sedimentació de les poblacions de la quimioclina. A més a més dels tres microorganismes esmentats, altres bacteries fotosintètiques com *Amoebobacter* sp., *Thiocapsa* sp. i *Pelodietyon clathratiforme* estan presents en les aigües hipolimnètiques riques en sulfhídric, però les seues densitats poblacionals, comparades en termes de biovolum són prou més baixes. Altres cianobactèries filamentoses, de les que s'aïllaren *Oscillatoria tenuis* i *Pseudoanabaena* sp. aparegueren ocasionalment en les aigües de la llacuna, en molt baixes densitats poblacionals. El desenvolupament de les poblacions de microorganismes fotosintètics en la quimioclina es produeix durant el període d'estratificació estival, inclús al llarg de curts períodes

d'estratificació a final de l'hivern o principis de la primavera apareixen incipients poblacions en les capes anòxiques.

L'evolució de les poblacions i les seues taxes de creixement segueixen uns patrons més clars en el cas dels dos microorganismes més abundants, *Chromatium weissii* i *Oscillatoria ornata*, que s'observen millor en l'any 1990 que en 1991. *C. weissii* augmenta la seua població al llarg del període d'estratificació fins últims d'agost, moment en el qual es produeix un lleuger declive que s'accelera al mes d'octubre. Açò mateix s'observa per a *Amoebobacter* sp i, menys clarament, per a *Thiocapsa* sp i *Pelodictyon clathratiforme*. Esta evolució es posa de manifest en el càlcul de les taxes de creixement poblacional, molt elevades al principi del període d'estratificació i que es redueixen després fins a plegar als màxims poblacionals del mes d'agost, fent-se negatives posteriorment. *Oscillatoria ornata* té un comportament similar als d'abans, a excepció del període final de l'estratificació, en el qual no sols la seua població no disminueix si no que pot augmentar. Per la seua part, la població de *Cryptomonas* spp. presenta una evolució temporal molt més anàrquica, la qual cosa s'atribueix a la seua major sensibilitat a factors com la predació o disponibilitat de nutrients.

La freqüència de cèl·lules en divisió no pot utilitzar-se per al càlcul de la taxa de creixement poblacional de *Chromatium weissii* sense realitzar les correccions oportunes, però la seua determinació sí que va revelar que el creixement de la població d'aquest microorganisme té lloc en la capa superior d'aquesta població, que s'encontra fotosintèticament activa.

Les poblacions epilimnètiques de algues estan dominades per diatomees, en concret les espècies *Cyclotella stelligera* i *Cyclotella distinguenda*, que abasten la majoria de la biomassa fitoplànctònica. Les poblacions de zooplàncton estan dominades per el copèpod *Tropocyclops prasinus*, amb menció especial als rotífers *Anuraeopsis fissa* i *Filinia hofmannii*, que apareixen associats a les aigües microaeròfiles sent abundants en les proximitats de la interfase òxica-anòxica. Especialment abundants en les aigües hipolimnètiques són els ciliats anaerobis, com *Caenomorpha* spp. i *Lacrymaria* spp., amb bacteries metanògenes simbiotes, alguns dels quals s'alimenten bàsicament dels organismes fotosintètics com *Cryptomonas* spp

L'anàlisi de components principals de les variables físico-químiques i biològiques estudiades posa de manifest que el pas d'un ambient oxidant en les aigües epilimnètiques és el factor principal que governa tant la composició química de l'aigua com l'estructura de la comunitat de microorganismes fotosintètics. Un segon factor, de molt menys pes, separa el gradient existent en la zona anòxica, que es veu molt clar quan es situen les mostres en l'espai delimitat pels dos factors.

La penetració lluminosa en les aigües de la llacuna es veu condicionada per la presència d'organismes fotosintètics en ella. Al llarg del període de mescla la llum resulta detectable fins al fons de la llacuna, mentre que al llarg de l'estratificació les denses poblacions de microorganismes fotosintètics situats en la quimioclina absorbeixen pràcticament tota la llum que els arriba. Els fotons que arriben a la quimioclina són majoritàriament d'una llongitud d'ona compresa entre 500 i 600 nm, degut a l'absorció selectiva en capes superiors per l'aigua, matèria en suspensió i poblacions fitoplanctòniques. Per poder captar eficientment la llum en les profunditats en les que es situen, aquests microorganismes poseixen pigments accessoris, okenona en el cas de les cromatiàcees i ficoeritrina en el de *Oscillatoria ornata* (i probablement també en el de *Cryptomonas* spp.), els quals son apropiats per a captar la llum d'eixes bandes espectrals.

Les concentracions de pigments clorofil·lics abastades al llarg del període d'estratificació en les aigües al voltant de la interfase òxica-anòxica foren molt elevades per aquest tipus de llacs. La clorofil·la α arribava als $150 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ i inclús valors superiors de manera puntual i la bacterioclorofil·la α superava els $700 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, mentre que en la resta del hipolimnion els valors oscilaven entre 20 i $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ per a la clorofil·la α i els 50 i $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ per a la bacterioclorofil·la α . A diferència d'aquests elevats valors, la concentració de clorofil·la a en les aigües òxiques de la llacuna es trobava entre els 2 i els $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ al llarg de tot l'any amb màxims primaverals.

La producció fotosintètica en la llacuna, que en les aigües epilimnètiques presenta una limitació deguda a la carència de fòsfor, té una marcada limitació per la llum disponible en el cas de les poblacions de microorganismes fotosintètics de la quimioclina. La quantitat de carboni fixat per unitat de volum d'aigua en la quimioclina és molt més elevada (fins a prop de $200 \text{mg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$) que en les aigües epilimnètiques, degut a les elevades densitats poblacionals de microorganismes fotosintètics. Tanmateix, estes altes taxes sols es troben en un rang de profunditats molt menut, i impliquen a un xicotet volum d'aigua, per la qual cosa a pesar de les baixes taxes trobades en l'epilimnion, aquest contribueix a un 82-84% de la fotoassimilació registrada al llarg del període estiuenc, sent el 16-18% que queda l'atribuïble a la fotoassimilació en la quimioclina, de la que un 30-35% era oxigènica en presència de sulfhídric, debuda a l'activitat de *Oscillatoria ornata*. En comparació amb els llacs estudiats per altres autors, la Llacuna d'Arcas presenta a la quimioclina una de les taxes de fotoassimilació de carboni inorgànic per unitat de volum més elevades descrites fins ara. Tot i això, la seua contribució a la fotoassimilació total sols es lleugerament superior a la descrita per a la majoria dels altres llacs, sent molt inferior als casos de major contribució com el Solar Lake. Açò es debut a la densa però estreta banda de profunditat en la que es dona esta activitat.

La limitació de la quantitat i qualitat de la llum resultava el principal factor limitant de la fotoassimilació de carboni per les poblacions de la quimioclina, la qual cosa es posà de manifest al incubar mostres de la profunditat amb major densitat d'organismes fotosintètics a diferents profunditats del llac. Tanmateix, a despit de la dita limitació, l'eficiència fotoassimiladora era màxima en la profunditat de procedència de la mostra, la qual cosa mostrava inequívocament la bona adaptació d'estes poblacions a la intensitat i composició espectral de la llum que els arriba. A més de la producció fotosintètica, l'assimilació fosca en la quimioclina del llac arriba a valors molt elevats.

L'activitat fotosintètica oxigènica es mantén en presència de sulfhídric si la llum que hi arriba ho permet. La cianobactèria *Oscillatoria ornata* compta amb ficoeritina com pigment accessori, el que li permet captar de forma eficient la llum que arriba a la part superior de la quimioclina, però donat que la llum captada pel complement biliproteic es canalitza a través del fotosistema II, açó significa que el procés fotosintètic de les cianobactèries deu ser predominantment oxigènic, per a la qual cosa es necessària una certa resistència del PSII al sulfhídric. Els experiments d'adaptació dels processos fotosintètics al sulfhídric posen de manifest que, dels tres soques de cianobactèries filamentoses aïllades de la llacuna, sols *O. ornata* presenta eixa resistència del seu PSII a les concentracions de sulfhídric que es troben en la part superior de la quimioclina de la llacuna. A més d'eixa resistència al sulfhídric del PSII de *O. ornata*, esta cianobactèria, i per damunt de tot, *Pseudanabaena* sp. presenten la capacitat de realitzar fotosíntesis anoxigènica utilitzant el sulfhídric com dador d'electrons, però tot l'esmentat en quan a la captació de la llum resta importància a dita capacitat com a característica adaptativa.

Els resultats obtesos en l'estudi ecofisiològic de *O. ornata*, que inclouen dades accessòries sobre la flotabilitat dels seus filaments han permés l'establiment d'un model de funcionament de les poblacions d'esta cianobactèria en la llacuna d'Arcas. Segons el mateix, en part encara hipotètic, els filaments d'aquest organisme es trobarien en la part superior de la quimioclina, en aigües que ja presenten sulfhídric, on realitzarien un procés fotosintètic preferentment oxigènic, carregant-se de substàncies de reserva que augmentarien la seua densitat amb la qual cosa s'afonarien en les capes hipolimnètiques fondes a les que no arriba la llum. Per al seu manteniment en la foscor, *O. ornata* realitzaria un metabolisme fermentatiu endògen d'eixes substàncies acumulades, el que reduiria progressivament el volum de substàncies de reserva contingudes en les cèl·lules que aniria sent substituït per vesícules gaseoses, produint-se en conseqüència un descens en la densitat de flotació que portaria al filament de nou a la capa superior de la quimioclina, on començaria de nou el procés. Com que el metabolisme anaerobi fermentatiu es lent, açó permetria l'acoblament entre la degradació d'eixes substàncies i la formació de vesícules de gas. Encara que el apartat corresponent a la fermentació no ha pogut ser comprovat, existeixen nombroses cites bibliogràfiques referides a cianobacteries similars que ho avalen.

La presència de *Cryptomonas* spp. en les capes microaeròbies i anaeròbies de la llacuna no ha pogut justificarse tan clarament com la de *O. ornata*. Tanmateix, l'explicació donada per alguns autors segons la qual aquestos organismes es situen en capes riques en sulfhídric per a fugir de la predació quedaria descartada en el nostre cas, donat que *Cryptomonas* spp sofreix una important predació en esta zona de la llacuna, especialment degut a la presència de ciliats microaeròbics i anaeròbics que habiten aquestes aigües. Més plausible seria la hipòtesi de que aquests organismes es situen allí per ser una zona de compromís entre les disponibilitats de llum (a la que estarien especialment adaptats) i nutrients (que difonen des de les aigües hipolimnètiques) i les limitacions donades per un ambient anòxic ric en sulfhídric.

De tots els microorganismes estudiats, el que presenta majors densitats poblacionals és la bactèria fotosintètica sulfúrea *Chromatium weissii*. Damunt de cèl·lules de la mateixa es troba amb freqüència bactèries gram-negatives que viuen com epibionts. Estos epibionts són molt similars a un predador bacterià, *Vamprococcus*, descrit abans per altres autors, tanmateix presenten diferències essencials respecte a aquest predador, com és la absència de capacitat lítica (o al menys esta no ha estat detectada), la existència d'un estat dispersiu i diferències en la composició de la coberta cel·lular. La població de la bactèria hospedadora presenta un major percentatge de infecció en fondària, com també un major nombre mitjà d'epibionts per cèl·lula. En base als nostres resultats s'ha postulat una hipòtesi alternativa a la de la predació i que complementa la proposta per Clarke *et al.* (1993). Segons la nostra hipòtesi, l'epibiont seria una bactèria heteròtrofa que, a diferència de la proposta per aquestos autors, no sols s'alimenta del DOC excretat per l'activitat fotosintètica del seu hospedador, si no que també s'aprofita del procés de degradació de les seues cèl·lules en el que s'alliberen substàncies al medi immediatament pròxim en el que ells es troben, la qual cosa té lloc al llarg de tot el procés de sedimentació de la cèl·lula hospedadora. La capacitat de lisis provocada per l'epibiont, encara no es descarta, no ha estat trobada en aquest epibiont, pel que postulem que, d'existir, podria tractar-se sols d'un procés induït per condicions desfavorables per al epibiont. En aquest cas, la proximitat física seria el factor determinant per a l'epibiont, i no la situació en la capa productiva més rica en DOC. Aquest epibiont desenvolupa un peculiar cicle de vida que implica la formació d'una estructura de varies cèl·lules apilades adherida a la cèl·lula de *C. weissii*, en el seu extrem distal es forma una estructura dispersiva. La nostra hipòtesi és que l'activació dels mecanismes de producció de la fase dispersiva pot deures a l'establiment d'una distància excessiva respecte a la cèl·lula allotjadora, la conseqüència de la qual seria un menor accés als nutrients provinents de l'allotjador.

CONCLUDING REMARKS

Lake Arcas is located in the Arcas-Ballesteros wetland, in which 35 dolines are found, most temporal or permanently containing water. Lake Arcas is formed by two basins, being the deepest one (14.2 m) in which this work has been done. This wetland is placed in a karstic zone, on a paleogene substrate dominated by marl and clay, but gypsum and limestone are also present. Dolines originate from the karstic process diluting mainly gypsum, then upper clays fall down. Because of the dissolution of gypsum, the water from Lake Arcas has high conductivity (2,1-3,3 mS/cm), with high concentrations of sulphate and calcium. Water supply comes mainly from groundwater, since the catchment area is reduced to the surface of the Lake.

Lake morphometry favours stratification, mainly due to the low surface/volume relationship (mean depth 31 %), however, the lake is poorly wind-sheltered, which promotes instability during periods with low vertical temperature gradient. Meteorological conditions allow the water of the lake to thermally stratify from May to October, in the rest of the year lake water is mixed. From 1989 to 1991, the period here studied, air temperature was generally higher than the typical values, which together with low rains allowed for short stratification periods, including deep anoxic waters, during late winter and early spring, which were discontinued when weather conditions made worse.

In a stratified system, like Lake Arcas is during summer, sampling techniques differs to those usually used by limnologists, since stronger attention should be paid to the zones of the lake where sharp physico-chemical and biological gradients are found, requiring fine layer sampling and special care in sample handling and analyses.

Most part of the stratification period, the bottom of the thermocline is found at 8 meter depth, falling down to 10.5-11 meter at the end of this period. However, the top of thermocline, which initially is found at 2.5-3 meters, goes down through the stratification period. When air temperature drops at the end of summer, surface waters becomes cooler, which, together with the entrance of groundwater, results in the destruction of the thermally stratified vertical structure.

Through the stratification period, the bottom of the thermocline determines the formation of an anoxic hypolimnion located from 8-9 meters to the lake bottom, where, due to the sulphate reduction, high sulfide concentrations (from 0-0.5 mM near the chemocline to 3 mM near the bottom) are rapidly reached. Epilimnetic waters maintain oversaturated oxygen concentrations, with oxygen maxima becoming deeper from spring to early summer. These oxygen maxima are usually associated to pH increases. When looking at the diel cycle, small peaks of oxygen are detected close to the oxic-anoxic boundary, where maximal population

density of oxygenic phototrophs are found. pH, which is slightly alkaline in surface waters (7.6-8) drops to less than 7 near the lake bottom during the stratification period. Redox potential (Eh) ranges from typical oxidant values at surface waters to strongly reduced potential (Eh -150 mV) in sulfide-rich anoxic waters.

Water mineralization is relatively high (2.1-3.3 mS·cm⁻¹). Sulphate is the dominant anion (34-37 meq·l⁻¹), alkalinity ranges from 3 to 4 meq·l⁻¹ in epilimnetic waters, whereas chloride (0,25 meq·l⁻¹) is much less abundant. Calcium and magnesium are the main cations (38 meq·l⁻¹ and 6 meq·l⁻¹ respectively), with much lower concentrations of monovalent cations (Na⁺=0,18 meq·l⁻¹, K⁺=0,05 meq·l⁻¹).

Phosphorus is the inorganic nutrient which limits primary production, since extremely low concentrations (usually lower than 0.03 µM) are found in epilimnetic waters, however, it reach higher concentrations in the hypolimnion. Ammonium is the dominant inorganic nitrogen compound in Lake Arcas water, especially in the hypolimnion, where it reach up to 1 mM. Nitrate is present only in the oxic waters (10-30 µM) whereas nitrite concentrations are much lower. Silica, which is important to the development of diatoms, is abundant (0,15-0,6 mM) in the waters of Lake Arcas.

High population densities of phototrophic microorganisms are found at the chemocline level during the stratification period. They sharply stratify at the chemocline, then varying their abundances within just a few centimeters. In the upper part of the chemocline, a *Cryptomonas* spp population develops (up to 38000 cell·ml⁻¹). Slightly lower in depth, into sulfide containing waters, maxima of *Oscillatoria ornata* (nearly 1000 fil·ml⁻¹), a filamentous cyanobacterium showing adaptations to sulfide, as well as *Chromatium weissei* (up to 2 million cell·ml⁻¹) are found. Both microorganisms also reach high population densities through the anoxic hypolimnion, mostly resulting from sedimentation of overlying populations. Moreover, other phototrophic bacteria are found in anoxic waters (*Amoebobacter* sp, *Thiocapsa* sp and *Pelodictyon clathratiforme*), although their contribution to the phototrophic community is much lower in terms of biovolume. Other filamentous cyanobacteria *Oscillatoria tenuis* and *Pseudanabaena* sp. have been isolated, but they only occasionally appears in Lake Arcas. The development of these dense populations of phototrophic microorganisms at the chemocline of Lake Arcas takes place through the whole stratification period, but even during short periods in late winter or early spring they can develop less dense populations if conditions are adequate.

Population dynamics and growth rates follows a clear pattern in both *C. weissei* and *O. ornata*, which are the most abundant microorganisms. This pattern becomes clearest in 1990 than in 1991. The population of *C. weissei* grows through the stratification period until the end of August, then, cell number goes

down slowly during September, but very fast during the previous days before mixing. The same pattern is followed by *Amoebobacter* sp., and less clearly by *Thiocapsa* sp and *Pelodictyon clathratiforme*. This evolution is evident when looking to net growth rates, which are high at the beginning of the stratification period, lower until august and negative from this moment to the mixing date. *O. ornata* fits the same pattern, except in the final period, when population does not decrease, or even could also increase. The population of *Cryptomonas* spp shows an anarchical temporal pattern, which could be attributable to a higher sensibility of this organisms to factors as predation or nutrient availability.

The use of frequency of dividing cells for the calculation of growth rates of *C. weissei* is not useful until calibrations will we made, however, it clearly indicates than growth of this microorganisms is mainly concentrated in the upper layer, which is the only part being photosynthetically active.

Epilimnetic phytoplanktonic populations are dominated by diatoms, mostly *Cyclotella stelligera* and *Cyclotella distinguenda*, which account for most of the algal biomass. Zooplankton populations are dominated by the copepod *Tropocyclops prasinus*, as well as the rotifers *Anuraeopsis fissa* and *Filinia hofmanii*, which are more abundant in the microaerophilic strata close to the oxic-anoxic boundary. In hypolimnetic anoxic waters, where they have metanogen symbionts, ciliates (e.g. *Caenomorpha* spp. and *Lacrymaria* spp.) are especially abundant, some of them, either aerobic or anaerobic, feeding on *Cryptomonas* sp.

A principal component analysis of the physico-chemical and biological variables studied reveals than redox state of the water is the main factor explaining both the chemical composition of water and the community structure of phototrophic microorganisms. A secondary factor separates along the gradient found in anoxic waters, which becomes clear when samples are situated in the space determined by both principal components.

Light penetration into Lake Arcas waters is determined by the presence of phototrophic microorganisms. During the mixing period light reach the lake bottom, whereas in the stratification period the dense populations of phototrophic microorganisms absorb most of the light reaching the chemocline. This light is selectivelly enriched in photons of 500-600 nm, because other wavelenghts are mainly absorbed in upper waters by water, suspended solids and phytoplankton. In order to be able to efficiently harvesting light at the depths where they live, these phototrophic microorganisms present accessory pigments, such as okenone in Chromatiaceae and phycoerythrin in *Oscillatoria ornata* (and probably in *Cryptomonas* spp.).

High concentrations of chlorophylic pigments were found during the stratification period in waters surrounding the oxic-anoxic boundary. Chlorophyll *a* reached

150 $\mu\text{g.l}^{-1}$ or even higher values, whereas bacteriochlorophyll *a* overcame 700 $\mu\text{g.l}^{-1}$. In the rest of the hypolimnion these concentrations ranged between 20-50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for chlorophyll *a* and 50-100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ for bacteriochlorophyll *a*. In contrast, low chlorophyll *a* values (2-5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) were found in oxic waters through the whole year, being maximal during spring.

Photosynthetic production in Lake Arcas, which is phosphorus limited in epilimnetic waters, is limited by light at the chemocline level. Carbon photoassimilation rates at the chemocline (nearly 200 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$) are much higher than in epilimnetic waters, because of the higher population densities of phototrophic microorganisms. However, these high rates are only found in a quite narrow range, involving a little water volume. Then, despite to the low rates found in epilimnetic waters, 82-83 % of photoassimilation taking place during the stratification period is on account of mixed waters, whereas 16-17 % corresponds to the photoassimilation of microorganisms located at the chemocline, from which 30-35 % comes from oxygenic photosynthesis under sulfide mainly by *Oscillatoria ornata*. When comparing to other lakes. Lake Arcas shows at the chemocline one of the highest rates of inorganic carbon photoassimilation recorded so far, however, the contribution of the photoassimilation at the chemocline level to whole lake photosynthetic production is only slightly higher than most of the lakes studied so far, and much lower to some water bodies like Solar Lake. This is due to the narrow range of depths in which this activity takes place.

Light limitation, either quantitative and qualitative, is the main factor limiting carbon photoassimilation by phototrophic microorganisms at the chemocline. This becomes clear when plate samples are incubated across the vertical profile in a moment with low temperature gradient. Despite of this limitation, maximum photosynthetic yields are found when the plate sample is incubated at its own depth, showing that these populations are well adapted to the light field and intensity reaching the chemocline. In addition to photoassimilation, dark carbon photoassimilation at the chemocline reach high values.

The oxygenic photosynthesis under sulfide is maintained when light conditions are adequate. *Oscillatoria ornata*, by means of phycoerythrin, is able to efficiently harvest light reaching the chemocline. Because of light collected by the phycobiliprotein complex is funneled through photosystem II, the photosynthetic activity supported by these photons should be mainly oxygenic, then, PSII resistance to sulfide is necessary. When studying the adaptations to sulfide among the filamentous cyanobacteria from Lake Arcas, only *O. ornata* PSII showed this resistance to the sulfide concentrations found in the upper part of the anoxic hypolimnion. Besides this resistance, *O. ornata*, and mainly *Pseudanabaena* sp., showed the capacity to perform anoxygenic photosynthesis with sulfide as electron donor, but because of the above mentioned funneling of light, this capacity has a lower importance as adaptative characteristic.

The results of the ecophysiological study of *O. ornata*, including data of *in situ* buoyancy, allowed us to establish a conceptual model of the functioning of the population of this microorganisms in Lake Arcas. According to this model, the filaments of *O. ornata* situate in the upper part of the chemocline, where sulfide is already present, performing preferentially oxygenic photosynthesis. The accumulation of high density polisaccharides follows of an increase of density, then filaments fall down into the dark anoxic hypolimnion. There, *O. ornata* should maintain a fermentative endogenous metabolism of these carbohydrates, as well as continuing to form gas vesicles. This results on a decrease of buoyant density, which causes the filament to return to the upper part of chemocline, where the process starts again. Because anaerobic fermentative metabolism is much slower than aerobic, this joints velocity of degradation of carbohydrates and gas vesicle formation, being both responsables of the decrease of buoyant density in dark anoxic waters. Endogenous fermentation was not yet demonstrated in *O. ornata*, but it is shown by several cyanobacterial species from sulfide habitats, being likely to be performed by this cyanobacterium.

A similar model could not be established for the *Cryptomonas* spp population. However, the explanation given by several authors devoting to predation a main role in the causes of the metalimnetic cryptophyte maxima should be discarded in Lake Arcas provided that this organisms suffers an important grazing pressure by ciliates, either aerobic or anaerobic, living in the surroundings of the chemocline. It is more likely that *Cryptomonas* spp forms dense populations close to the chemocline due to a balance between their well adaptations to light conditions, nutrient difussion from the hypolimnion and sulfide limitations.

Among the phototrophic microorganisms inhabiting Lake Arcas, *Chromatium weissei* reach the highest population densities. This bacterium usually presents epibiotic gram-negative attached bacteria. These bacteria are quite similar to a bacterial predator, *Vamptirococcus*, described by other authors. However it differs because of the absence of lytic capacity on the host cells (at least this has been never detected in our case), as well as by the presence of a dispersive stage and differences in the cell envelope. Infection is higher with depth, as well as the mean number of epibiotic cells per host cell. According to our results, we hypothesize that the epibiont could be an heterotrophic bacteria, that, in contrast to the proposals of Clarke *et al.* (1993), not only feeds on the DOC excreted by the host photosynthetic activity, but it also takes profit of the exudates resulting from the degradation of the host cell taking place during the sedimentation process, which are more easily available when closer to the host cell. In this case, is the proximity to the source of DOC instead of the situation in a DOC rich water layer what actually is advantageous to the epibiotic cell. Lytic capacity, which could not be discarded, was not found in this epibiont, but even existing, could be only a process induced by desfavoured conditions to the epibiont. This epibiont has a very peculiar life cycle which implies the formation of a staked

structure of several cells, forming in the terminal cell a dispersive stage. Our hypothesis is that the formation of the dispersive stage could be induced by the increase of the distance to the host cells, which difficults the acces of the epibiont to the nutrients coming from the host.

BIBLIOGRAFÍA

Abedon, S. T. (1989). Selection for bacteriophage latent period length by bacterial density: A theoretical examination. *Microbial Ecol.* 18: 79-88.

Abellà, C.; E. Montesinos and R. Guerrero. (1980). Field studies on the competition between purple and green sulfur bacteria for available light (Lake Cisó, Spain). *Develop. Hydrobiol.* 3: 173-181.

Abellà, C. A.; E. Montesinos and J. Turet. (1985). Colonization and dynamics of phototrophic bacteria in a recently formed lagoon in Banyoles karstic area (Girona, Spain). *Scientia Gerundensis.* 10: 33-49.

Abellà, C. and L. J. Garcia-Gil. (1988). Diel migration as a mechanism for enrichment of natural populations of branching species of *Pelodyction*. In J. M. Olson *et al.* (Eds.). *Green Photosynthetic Bacteria*. Plenum Press. New York. 269-286.

Abellà, C. A. and L. J. García-Gil. (1992). Microbial ecology of planktonic filamentous phototrophic bacteria in holomictic freshwater lakes. *Hydrobiologia.* 243/244: 79-86.

Affronti, L. F. and H. G. Marshall. (1994). Using frequency of dividing cells in estimating autotrophic picoplankton growth and productivity in the Chesapeake Bay. *Hydrobiologia.* 284: 193-203.

Allison, D. G. and W. Sutherland. (1987). The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1319-1327.

Anagnostidis, K. and Overbeck, J. (1966). Methanoxydierer und hypolimnische schwefelbakterien - studien zur ökologischen bioökotik der gewässermikroorganismen. *Der Dtsch. Bot. Ges.* 79: 163-174.

Anton, A. and H. C. Duthie. (1981). Use of cluster analysis in the systematics of the algal genus *Cryptomonas*. *Can. J. Bot.* 59: 992-1002.

APHA - AWWA - WPCF (1989) Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th edition. American Public Health Association. Washington D.C.

Arieli, B.; E. Padan and Y. Sharak. (1991). Sulfide-induced sulfide-quinone reductase activity in thylakoids of *Oscillatoria limnetica*. *J. Biol. Chem.* 266: 104-111.

Arvola, L.; K. Salinen; R. I. Jones; A. Heinaven and I. Bergstrom. (1987). A three day study of the diel behaviour of plankton in a highly humic and steeply stratified lake. *Arch. Hydrobiol.* 109: 89-106.

Arvola, L.; A. Ojala; F. Barbosa and S. I. Heaney. (1991). Migration behaviour of three cryptophytes in relation to environmental gradients: an experimental approach. *Brit. Phycol. J.* 26: 361-373.

Arvola, L.; K. Salonen, P. Kankaala and A. Lehtovaara. (1992). Vertical distributions of bacteria and algae in a steeply stratified humic lake under high grazing pressure from *Daphnia longispina*. *Hydrobiologia.* 229: 253-269.

Avila, A.; J. L. Burrell; A. Domingo; E. Fernández; J. Godall and J. M. Llopart. (1984). *Limnología del Lago Grande de Estanya*. *Oecol. Aquat.* 7: 3-24.

Azam, F., T. Fenchel; J. G. Field; J. S. Grey; K. A. Meyer-Reil and F. Thingstad. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.

Baines, S. B. and M. L. Pace. (1991). The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. *Limnol. Oceanogr.* 36: 1078-1090.

Baker, A. L.; A. J. Brook and A. R. Klemer (1969) Some photosynthetic characteristics of a naturally occurring population of *Oscillatoria agardhii* Gomont. *Limnol. Oceanogr.* 14: 327-333.

Baker, A. L.; K. K. Baker and P. A. Tyler. (1985a). A family of pneumatically-operated thin layer samples for replicate sampling of heterogeneous water columns. *Hydrobiologia.* 122: 207-211.

Baker, A. L.; K. K. Baker and P. A. Tyler. (1985b). Fine-layer depth relationships of lakewater chemistry, planktonic algae and photosynthetic bacteria in meromictic Lake Fidler. *Freshwater Biol.* 15: 735-747.

Bakken, L. R. and R. A. Olsen. (1983). Buoyant densities and dry-matter contents of microorganisms: conversion of a measured biovolume into biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1188-1195.

Bañeras, L. (1996) *Ecologia i fisiologia del bacteris fototrofic del sofre en relació amb el cicle del fòsfor*. Ph. D. Thesis. Universitat de Girona.

Banens, R. J. (1990). Occurrence of hypolimnetic blooms of the purple sulfur bacterium *Thiopedia rosea* and the green sulfur bacterium, *Chlorobium limicola* in an australian reservoir. *Aust. J. Mar Freshwater Res.* 41: 223-235.

- Bavendamm, W. (1924). Die farblosen und roten schwefelbakterien des süß und salzwassers. Fischer-verlag, Jena. 93-94 pp.
- Bebout, B. M. and F. Garcia-Pichel. (1995). UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4215-4222.
- Belkin, S. and E. Padan. (1983). Low redox potential promotes sulphide -and light- dependent hydrogen evolution in *Oscillatoria limnetica*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3091-3098.
- Bergstein, T.; Y. Henis and B. Z. Cavari. (1979). Investigations on the phototrophic sulfur bacterium *Chlorobium phaeobacteriodes* causing seasonal blooms in Lake Kinneret. *Can. J. Microbiol.* 79: 999-1007.
- Berman, T. and B. Kaplan (1984) Diffusion chamber studies of carbon flux from living algae to heterotrophic bacteria. *Hydrobiologia* 108: 127-134.
- Berman, T. (1988). Differential uptake of orthophosphate and organic phosphorus substrates by bacteria and algae in Lake Kinneret. *J. Plankton Res.* 10: 1239-1250.
- Berman, T.; D. Wynne and B. Kaplan. (1990). Phosphatases revisited: analysis of particle-associated enzyme activities in aquatic systems. *Hydrobiologia.* 207: 287-294.
- Berninger, U.-G.; B. J. Finlay and P. Kuuppo-Leinikki. (1991). Protozoan control of bacterial abundances in freshwater. *Limnol. Oceanogr.* 36: 139-147.
- Biebl, H. and N. Pfennig. (1979). Anaerobic CO₂ uptake by phototrophic bacteria. A review. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 12: 48-58.
- Bird, D. F. and J. Kalff. (1987). Algal phagotrophy: regulating factors and importance relative to photosynthesis in *Dinobryon* (Chrysophyceae). *Limnol. Oceanogr.* 32: 277-284.
- Bird, D. F. and J. Kalff. (1993). Protozoan grazing and size-activity structure in limnetic bacterial communities. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 50: 370-380.
- Bjornsen, P. K. (1988). Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it? *Limnol. Oceanogr.* 33: 151-154.
- Blakar, I. and O. Løvstad. (1990). Determination of available phosphorus for phytoplankton populations in lakes and rivers of southeastern Norway. *Hydrobiologia.* 192: 271-277.

- Borrego, C. M.; L. J. Garcia-Gil; L. Bañeras and R. C. Brunet. (1993). Changes in the composition of the phototrophic sulphur bacterial communities in three basins of lake Banyoles (Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25: 720-725.
- Borrego, C. M. and L. J. García-Gil. (1994a). Caracterización limnológica de la Coromina, una laguna hipereutrífica del sistema lacustre de Banyoles. *Limnetica.* 10: 43-51.
- Borrego, C. M. and L. J. García Gil. (1994b). Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynth. Res.* 41: 157-163.
- Borrego, C. and J. García-Gil. (1995). Photosynthetic oxidation of MnS and FeS by *Chlorobium* spp. *Microbiologia SEM.* 11: 351-358.
- Borrego, C. (1996) Heterogeneïtat pigmentària en els bacteris fotosintètics verds, fisiologia i significació ecològica Ph. D. Thesis. Universitat de Girona.
- Børsheim, K. Y.; J. G. Kuenen; J. Gottschal and I. Dundas. (1985). Microbial activities and chemical gradients in the chemocline of a meromictic lake in relation to the precision of the sampling procedure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 337-341.
- Bower, P. M.; C. A. Kelly; E. J. Fee; J. A. Shearer; D. R. DeLerq and D. W. Schindler. (1987). Simultaneous measurement of primary production by whole-lake and bottle radiocarbon additions. *Limnol. Oceanogr.* 32: 299-312.
- Bowling, L. C. and P. A. Tyler. (1986). The underwater light-field of lakes with marked physico-chemical and biotic diversity in the water column. *J. Plankton Res.* 8: 69-78.
- Bratbak, G. and I. Dundas. (1984). Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 755-757.
- Bratbak, G. (1985). Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1488-1493.
- Bratbak G. and T. F. Thingstad (1985) Phytoplankton-bacteria interactions: Analysis of a model with both competition and commensalism *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25: 23-30.
- Brock, T. D. and J. Clyne. (1984). Significance of algal excretory products for growth of epilimnetic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 731-734.

Brzezinski, M. A. (1992). Cell-cycle effects on the kinetics of silicic acid uptake and resource competition among diatoms. *J. Plankton Res.* 14: 1511-1540.

Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons (Ed.). (1975). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Eight Edition. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.

Bull, A. T. and J. H. Slater. (1982). *Microbial interactions and community structure*. Academic Press. London.

Burke, C. M. and H. R. Burton. (1988a). The ecology of photosynthetic bacteria in Burton lake, Vestfold Hills, Antarctica. *Hydrobiologia*. 165: 1-11.

Burke, C. M. and H. R. Burton. (1988b). Photosynthetic bacteria in meromictic lakes and stratified fjords of the Vestfold Hills, Antarctica. *Hydrobiologia*. 165: 13-23.

Burnison, B. K. (1980) Modified dimethyl sulfoxide extraction for chlorophyll analysis of phytoplankton *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 729-733.

Butow, B. and T. Bergstein-Ben Dan. (1992). Occurrence of *Rhodospseudomonas palustris* and *Chlorobium phaeobacteroides* blooms in lake Kinneret. *Hydrobiologia*. 232: 193-200.

Caldwell, D. E. and J. M. Tiedje. (1975). The structure of anaerobic bacterial communities in the hypolimnia of several Michigan lakes. *Can. J. Microbiol.* 21: 377-385.

Camacho, A.; F. García-Pichel; E. Vicente and R. W. Castenholz. (1996) Adaptation to sulphide and to the underwater light field in three cyanobacterial isolates from lake Arcas (Spain). *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 293-301.

Camps, J.; I. Gonzalvo; J. Güell; P. López; A. Tejero; X. Toldrà; F. Vallespinos and M. Vicens. (1976). El lago de Montcortés, descripción de un ciclo anual. *Oecol. Aquat.* 2: 99-110.

Canfield, D. E. and D. J. Des Marais (1991) Aerobic sulfate reduction in microbial mats. *Science* 251: 1471-1473.

Capblancq, J. (1990). Nutrient dynamics and pelagic food web interactions in oligotrophic and eutrophic environments: an overview. *Hydrobiologia*. 207: 1-14.

Caraco, N. and A. H. Puccoon. (1986). The measurement of bacterial chlorophyll and algal chlorophyll *a* in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 33: 889-893.

- Carman, K. R. (1994). Stimulation of marine free-living and epibiotic bacterial activity by copepod excretions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14: 255-262.
- Caron, D. A.; K. G. Porter and R. W. Sanders. (1990). Carbon, nitrogen and phosphorus budgets for the mixotrophic phytoflagellate *Poterochromonas malhamensis* (Crysophyceae) during bacterial ingestion. *Limnol. Oceanogr.* 35: 433-443.
- Caron, D. A.; R. W. Sanders; E. L. Lim; C. Marrasé; L. A. Amaral; S. Whitney; R. B. Aoki and K. G. Porter. (1993). Light-dependent phagotrophy in the freshwater mixotrophic crysophyte *Dinobryon cylindricum*. *Microbial Ecol.* 25: 93-111.
- Carrick, H. J. and G. L. Fahnestiel. (1989). Biomass, size structure, and composition of phototrophic and heterotrophic nanoflagellate communities in lake Huron and Michigan. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 46: 1922-1928.
- Casida, L. E. Jr. (1982). *Enfiser adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 32: 339-345.
- Casida, Jr. L. E. (1988). Nonobligate bacterial predation on bacteria in soil. *Microbial. Ecol.* 15: 1-8.
- Casida, Jr. L. E. (1989). *Arthrobacter* species as a prey cell reservoir for nonobligate bacterial predators. *Can. J. Microbiol.* 35: 559-564.
- Castenholz, R. W. (1973). The possible photosynthetic use of sulfide by the filamentous phototrophic bacteria of hot springs. *Limnol. Oceanogr.* 18: 863-876.
- Castenholz, R. W. (1976). The effect of sulfide on the bluegreen algae of hot springs. I. New Zealand and Iceland. *J. Phycol.* 12: 54-68.
- Castenholz, R.W. (1977). The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs: II. Yellowstone National Park. *Microbial Ecol.* 3: 79-105.
- Castenholz, R. W. and H. C. Utkilen. (1984). Physiology of sulfide tolerance in a thermophilic *Oscillatoria*. *Arch. Microbiol.* 138: 299-305.
- Castenholz, R. W. (1988). Culturing methods for cyanobacteria. In Palker, L. and A. N. Glazer (Ed.). *Methods in Enzymology*. Academic Press. Inc. New York. 167: 68-93.
- Castenholz, R. W.; B.B. Jørgensen; E. D'Amelio and J. Bauld. (1991). Photosynthetic and behavioral versatility of the cyanobacterium *Oscillatoria boryana* in a sulfide-rich microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86: 43-58.

Caumette, P.; M. Pagano and L. Saint-Jean. (1983). Répartition verticale du phytoplancton, des bactéries et du zooplancton dans le milieu stratifié en Baie de Biétri (Lagune Ebrié, Côte D'Ivoire) relations trophiques. *Hydrobiologia*. 106: 135-148.

Caumette, P. (1984). Distribution and characterization of phototrophic bacteria isolated from the water of Biétri Bay (Ebrié Lagoon, Ivory coast). *Can. J. Microbiol.* 30: 273-284.

Caumette, P.; K. Schmidt; H. Biebl and N. Pfennig. (1985). Characterization of a *Thiocapsa* strain containing okenone as major carotenoid. *System. App. Microbiol.* 6: 132-136.

Caumette, P. (1986) Phototrophic sulfur bacteria and sulfate reducing bacteria causing red waters in a shallow brackish coastal lagoon (Prevost Lagoon, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 113-124.

Caumette, P., R. Matheron; N. Raymond and J. C. Relexans. (1994). Microbial mats in the hypersaline ponds of mediterranean salterns (Salins de Giraud, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 13: 273-286.

Cirujano, S. (1995). Flora y vegetación de las lagunas y humedales de la provincia de Cuenca. *JCCM - CSIC - Real Jardín Botánico de Madrid*. 224 pp.

Clarke, K.K. J., B. J. Finlay, E. Vicente; H. Llorens and M. R. Miracle. (1993). The complex life-cycle of a polymorphic prokaryote epibiont of the photosynthetic bacterium *Chromatium weissii*. *Arch. Microbiol.* 159: 498-505.

Cline, J.I. D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14: 454-458.

Cloern, J.J. E.; B. E. Cole and R. S. Oremland. (1983). Autotrophic processes in meromictic Big Soda Lake, Nevada. *Limnol. Oceanogr.* 28: 1049-1061.

Clymo, R.R. S. (1995). Nutrients and limiting factors. *Hydrobiologia*. 315: 15-24.

Coder, I.D. M. and M. P. Starr. (1978). Antagonistic association of the chlorellavirus bacterium ("*Bdellovibrio chlorellavorus*") with *Chlorella vulgaris*. *Curr. Microbiol.* 1: 59-64.

Coder, I.D. M. and L. J. Goff. (1986). The host range of the chlorellavirus bacterium ("*Vampirovibrio chlorellavorus*"). *J. Phycol.* 22: 543-546.

- Cohen, Y.; B. B. Jørgensen; E. Padan and M. Shilo. (1975a). Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature*. 257: 489-492.
- Cohen, Y.; E. Padan and M. Shilo. (1975b). Facultative anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *J. Bacteriol.* 123: 855-861.
- Cohen, Y.; W. E. Krumbein and M. Shilo. (1977a). Solar Lake (Sinai). 2. Distribution of photosynthetic microorganisms and primary production. *Limnol. Oceanogr.* 22: 609-620.
- Cohen, Y.; W. E. Krumbein and M. Shilo. (1977b). Solar Lake (Sinai). 3. Bacterial distribution and production. *Limnol. Oceanogr.* 22: 621-634.
- Cohen, Y. (1984). The Solar Lake cyanobacterial mats: Strategies of photosynthetic life under sulfide. In Cohen, Y.; R. W. Castenholz and H. O. Halverson (Ed.). *Microbial Mats: Stromatolites*. New York. 133-148.
- Cohen, Y. (1986). Interaction of cycles of C, O, S, and Fe in hypersaline cyanobacterial mats. In: Megusar, F. and M. Gantar (Ed.). *Perspectives in Microbial Ecology*. Slovene Society for Microbiology. Ljubljana.
- Cohen, Y.; B. B. Jørgensen; N. P. Revsbech and R. Poplawski. (1986). Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 398-407.
- Cohen, Y. (1993). Diurnal fluctuations of sulfate reduction and methanogenesis in microbial mats. In: Guerrero, R. and C. Pedrós-Alió (Ed.). *Trends In Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology. 83-86.
- Cole, J. J.; M. L. Pace; N. F. Caraco and G. S. Steinhart. (1993). Bacterial biomass and cell size distributions in lakes: more and larger cells in anoxic waters. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1627-1632.
- Conley, D. J.; M. A. Quigley and C. L. Schelske. (1988). Silica and phosphorus flux from sediments: importance of internal recycling in Lake Michigan. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 45: 1030-1035.
- Cornett, R. J. and F. H. Rigler. (1987). Decomposition of seston in the hypolimnion. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 44: 146-151.
- Cotner, J. B. and R. G. Wetzel. (1992). Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* 37: 232-243.

- Croome, R. L. and P. A. Tyler. (1984a) Microbial microstratification and crepuscular photosynthesis in meromictic Tasmanian Lakes. Verh. Internat. Verein Limmol. 22: 1216-1223.
- Croome, R. L. and P. A. Tyler. (1984b). The microanatomy and ecology of *Chlorochromatium agregatum* in two meromictic lakes in Tasmania. J. Gen. Microbiol. 130: 2717-2723.
- Croome, R. L. and P. A. Tyler. (1985) Structure and ecology of the flagellate *Scourfieldia caela* (Korsh.) Belcher and Swale in two meromictic lakes in Tasmania. Aust. J. Mar. Freshw. Res.
- Croome, R. L. (1986). Biological studies of meromictic lakes. In: De Deckker, P. and W. D. Williams (Eds.). Limnology in Australia. CSIRO, Melbourne. pp 113-130.
- Croome, R. L. and P. A. Tyler. (1988). Phytoflagellates and their ecology in tasmanian polyhumic lakes. Hydrobiologia. 161: 245-253.
- Culver, D. A. and G. J. Brunskill. (1969). Fayetteville Green Lake, New York. V. Studies of primary production and zooplankton in a meromictic marl lake. Limnol. Oceanogr. 14: 862-873.
- Currie, D. J. (1990). Phosphorus deficiency and its variation among lakes. Can. J. Fisheries Aquat. Sci. 47: 1077-1084.
- Czeczuga, B. (1968a). An attempt to determine the primary production of the green sulphur bacteria, *Chlorobium limicola* Nads, (Chlorobacteriaceae). Hydrobiologia. 31: 317-333.
- Czeczuga, B. (1968b). Primary production of the purple sulfuric bacteria *Thiopetra rosea* winogr. (Thiorhodaceae). Photosynthetica 2: 101-166.
- Czeczuga, B. and F. Gradzki. (1983) Relationship between extracellular and cellular products in the sulphuric green bacterium *Chlorobium limicola* Nads. (Chlorobacteriaceae) as compared to primary production of phytoplankton. Hydrobiologia 42: 85-95.
- Christensen, D. L.; S. R. Carpenter and K. L. Cottingham. (1995). Predicting chlorophyll vertical distribution in response to epilimnetic nutrient enrichment in small stratified lakes. J. Plankton Res. 17: 1461-1477.
- Chrost, R. J. (1981) The composition and bacterial utilization of DOC released by phytoplankton Kieler Meerersforsch., Sonderh. 5: 325-332.

- Chrost, R. J. and M. A. Faust. (1983). Organic carbon release by phytoplankton: its composition and utilization by bacterioplankton. *J. Plankton Res.* 5: 477-494.
- Chrost, R. J. (1986). Algal-bacterial metabolic coupling in the carbon and phosphorus cycle in lakes. In: Megusar, F. and M. Gantar (Ed.). *Perspectives in Microbial Ecology*. Slovene Society for Microbiology. Ljubljana. 360-366.
- D'Amelío, E. D.; Y. Cohen and D. J. Des Marais. (1987). Association of a new type of gliding, filamentous, purple phototrophic bacterium inside bundles of *Microcoleus chthonoplastes* in hypersaline cyanobacterial mats. *Arch. Hydrobiol.* 147: 213-220.
- Dasí, M. J. and M. R. Miracle. (1991). Distribución vertical y variación estacional del fitoplancton de una laguna carstica meromítica, La Laguna de La Cruz, (Cuenca, España). *Limnetica.* 7: 37-60.
- Davey, M. C. and S. I. Heaney. (1989). The control of sub-surface maxima of diatoms in a stratified lake by physical, chemical and biological factors. *J. Plankton Res.* 11: 1185-1199.
- Davison, W. and S. I. Heaney. (1978). Ferrous iron-sulfide interactions in anoxic hypolimnetic waters. *Limnol. Oceanogr.* 23: 1194-1200.
- Davison, W. (1980). A critical comparison of the measured solubilities of ferrous sulphide in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 44: 803-808.
- Davison, W. and Finlay, B. J. (1986) Ferrous iron and phototrophy as alternative sinks for sulphide in the anoxic hypolimnia of two adjacent lakes. *J. Ecol.* 74. 663-673.
- De Wit, R. and H. Van Gernerden. (1987a). Oxidation of sulfide to thiosulfate by *Microcoleus chthonoplastes*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45 7-13
- De Wit, R. and H. Van Gernerden. (1987b). Chemolithotrophic growth of the phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 117-126.
- De Wit, R.; W. M. M. Van Boekel and H. Van Gernerden. (1988). Growth of the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* on sulfide. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 203-210.
- De Wit, R.; J. H. M. Jonkers; F. P. Van Den Ende and H. Van Gernerden. (1989). In situ fluctuations of oxygen and sulphide in marine microbial sediment ecosystems. *Neth J. Sea Res.* 23: 271-281.

De Wit, R. and H. Van Gernerden. (1990). Growth of the phototrophic purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* under oxic/anoxic regimens in the light. FEMS Microbiol. Ecol. 73: 69-76.

De Wit, R.; F. P. Van Den Ende and H. Van Gernerden. (1995). Mathematical simulation of the interactions among cyanobacteria, purple sulfur bacteria and chemotrophic sulfur bacteria in microbial mat communities. FEMS Microbiol. Ecol. 17: 117-135.

Deacon, C. and A. E. Walsby. (1990). Gas vesicle formation in the dark, and in the light of different irradiances, by the cyanobacterium *Microcystis* sp. Brit. Phycol. J. 25: 133-139.

Demers, E. and J. Kalff. (1993). A simple model for predicting the date of spring stratification in temperate and subtropical lakes. Limnol. Oceanogr. 38: 1077-1081.

Dickman, M. and I. Artuz. (1978). Mass mortality of photosynthetic bacteria as a mechanism for dark lamina formation in the sediments of the Black Sea. Nature. 275: 192-195.

Downes, M. T. (1988). Aquatic nitrogen transformations at low oxygen concentrations. Appl. Environ. Microbiol. 54: 172-175.

Downing, J. A. and E. McCauley. (1992). The nitrogen: phosphorus relationship in lakes. Limnol. Oceanogr. 37: 936-945.

Drews, G. and J. F. Imhoff. (1991). Phototrophic sulphur bacteria. In: Shively, J. M. and L. L. Barton (Eds.). Variations in Autotrophic Life. Academic Press, London. pp 51-97.

Dryden, D. C. and S. J. L. Wright. (1987). Predation of cyanobacteria by protozoa. Can. J. Microbiol. 33: 471-482.

Dubinina, G. A. and S. J. Kuznetsov. (1976). The ecological and morphological characteristics of microorganisms in Lesnaya Lamba (Karelia). Int. Rev. Gesamten. Hydrobiol. 61: 1-19.

Dubinsky, Z. and T. Berman. (1979). Seasonal changes in the spectral composition of downwelling irradiance in Lake Kinneret (Israel). Limnol. Oceanogr. 24: 652-663.

Eichler, B. and N. Pfennig. (1988). A new purple sulfur bacteria from stratified freshwater lakes, *Amoebobacter purpureus* sp. nov. Arch. Microbiol. 149: 395-400.

Eichler, B. and N. Pfennig. (1990). Seasonal development of anoxygenic phototrophic bacteria in a holomictic drumlin lake (Schleinsee, F. R. G.). Arch. Hydrobiol. 119: 369-392.

Eloranta, P. (1985). Hypolimnetic chlorophyll maximum by algae and sulphur bacteria in one eutrophic pond. Arch. Hydrobiol. Suppl. 71: 459-469.

Esparcia, A.; J. Armengol; E. Vicente and M. R. Miracle. (1991). Vertical distribution of *Anuraeopsis* species as related to oxygen depletion in two stratified lakes. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 2745-2749.

Esteban, G.; B. J. Finlay and T. M. Embley. (1993). New species double the diversity of anaerobic ciliates in a Spanish lake. FEMS Microbiol. Lett. 109: 93-100.

Esteve, I. R. Guerrero; E. Montesinos and C. Abellá. (1983). Electron microscopy study of the interaction of epibiotic bacteria with *Chromatium minus* in natural habitats. Microbial Ecol. 9: 57-64.

Esteve, I.; J. Mir and N. Gaju. (1988). Green endosymbiont of *Coleps* from lake Cisó identified as *Chlorella vulgaris*. Symbiosis. 6: 197-210.

Esteve, I.; E. Montesinos; J. G. Mitchell and R. Guerrero. (1990). A quantitative ultrastructural study of *Chromatium minus* in the bacterial layer of lake Cisó (Spain). Arch. Microbiol. 153: 316-323.

Esteve, I.; N. Gaju; J. Mir and R. Guerrero. (1992). Comparison of techniques to determine the abundance of predatory bacteria attacking chromatiaceae. FEMS Microbiol. Ecol. 86: 205-208.

Falkowski, P. G. and L. LaRoche. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. J. Phycol. 27: 8-14.

Fallon, R. D. and T. D. Brock. (1979). Lytic organisms and photooxidative effects influence on blue-green algae (Cyanobacteria) in lake Mendota (Wisconsin). Appl. Environ. Microbiol. 38: 499-505.

Faust, M. A. and K. H. Norris. (1985). In vivo spectrophotometric analysis of photosynthetic pigments in natural populations of phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 30: 1316-1322.

- Fenchel, T. and B. J. Finlay. (1990). Anaerobic free-living protozoa: growth efficiencies and the structure of anaerobic communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 269-276.
- Fenchel, T. and B. J. Finlay. (1995). *Ecology and evolution in anoxic worlds*. Oxford University Press. Oxford, New York; Tokyo.
- Feuillade, M. and J. Feuillade. (1989). Heterotrophic capabilities of the blue-green alga *Oscillatoria rubescens*. *Arch. Hydrobiol.* 117: 61-76.
- Feuillade, M.; J. Feuillade and V. Fiala. (1990) The effect of light on the release of organic compounds by the cyanobacterium *Oscillatoria rubescens*. *Aquat. Sci.* 52: 345-359.
- Feuillade, M.; J. Feuillade and J. P. Pelletier. (1992). Photosynthate partitioning in phytoplankton dominated by the cyanobacterium *Oscillatoria rubescens*. *Arch. Hydrobiol.* 125: 441-461.
- Finlay, B. J.; K. J. Clarke; E. Vicente and M. R. Miracle. (1991). Anaerobic ciliates from a sulphide-rich solution lake in Spain. *Eur. J. Protistol.* 27: 148-159.
- Finlay, B. J.; T. Fenchel and T. M. Embley. (1993). Methanogen endosymbiosis in anaerobic ciliates. In Guerrero, R. and C. Pedrós-Alió (Ed.). *Trends in Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology. 285-288.
- Finlay, B. J.; S. L. Maberly and G. F. Esteban. (1996). Spectacular abundance of ciliates in anoxic pond water: contribution of symbiont photosynthesis to host respiratory oxygen requirements. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 229-235.
- Fischer, C.; M. Wiggli; F. Schanz; K. W. Hanjelmann and R. Bachofen. (1996). Light environment and synthesis of bacteriochlorophyll by populations of *Chromatium okenii* under natural environmental conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 1-9.
- Flynn, K. J. (1988). The concept of "primary production" in aquatic ecology. *Limnol. Oceanogr.* 33: 1215-1216.
- Fogg, G. E. (1971). Extracellular products of algae in freshwater. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 5: 1-25.
- Fogg, G. E. (1983) The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bot. Mar.* 26: 3-14.

- Folt, C. L.; M. J. Wevers; M. P. Yoder-Williams and R. P. Howmiller. (1989). Field study comparing growth and viability of a population of phototrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 78-85.
- Forsberg, C. (1989). Importance of sediments in understanding nutrient cyclings in lakes. *Hydrobiologia.* 176/177: 263-277.
- Foy, R. H. and R. V. Smith. (1980). The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species. *Brit. Phycol. J.* 15: 139-150.
- Foy, R. H. and G. E. Gibson. (1982). Photosynthetic characteristics of planktonic blue-green algae: the response of twenty strains growth under high and low light. *Brit. Phycol. J.* 17: 169-182.
- Fraleigh, P. C. and J. C. Burnham. (1988). Myxococcal predation on cyanobacterial populations: nutrient effects. *Limnol. Oceanogr.* 33: 476-483.
- Francisco, D. E. and A. C. Rabin. (1973). Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 92: 416-421.
- Fründ, C. and Y. Cohen. (1992). Diurnal cycles of sulfate reduction under oxic conditions in cyanobacterial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 70-77.
- Fry, J. C. (1990). Direct methods and biomass estimation. *Methods in Microbiology.* 22: 41-85.
- Fuhrman, J. A. and R. T. Noble. (1995). Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1236-1242.
- Gaju, N. (1987). Estudios ecológicos de microorganismos depredadores de Chromatiaceae. Caracterización morfológica y fisiológica de *Daptobacter*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 242 pp.
- Gaju, N.; R. Guerrero and C. Pedrós-Alió. (1989). Measurement of cell volume of phototrophic bacteria in pure cultures and natural samples: Phase contrast, epifluorescence and particle sizing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 295-302.
- Gaju, N.; I. Esteve and R. Guerrero. (1992). Distribution of predatory bacteria that attack Chromatiaceae in a sulfurous lake. *Microbial Ecol.* 24: 171-180.
- García-Cantizano, J. (1992). Análisis funcional de la comunidad microbiana en ecosistemas planctónicos. Ph. D. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona.

García-Cantizano, J.; J. I. Calderon-Paz and C. Pedrós-Alió. (1994). Thymidine incorporation in Lake Cisó: problems in estimating bacterial secondary production across oxic-anoxic interfaces. *FIEMS Microbiol. Ecol.* 14: 53-64.

García-Gil, L. J.; L. Sala-Genoher; J. W. Esteva and C. A. Abellà. (1990). Distribution of iron in lake Banyoles in relation to the ecology of purple and green sulfur bacteria. *Hydrobiologia.* 192: 259-270.

García-Gil, L. J.; L. Sala-Genoher and C. A. Abellà. (1991). Dynamics of phototrophic bacteria in relation to iron cycle in a meromictic basin of lake Banyoles. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 1016-1019.

García-Gil, L. J. and C. A. Abellà. (1992). Population dynamics of phototrophic bacteria in three basins of lake Banyoles (Spain). *Hydrobiologia.* 243/244: 87-94.

García-Pichel, F. and R. W. Castenholz. (1990). Comparative anoxygenic photosynthetic capacity in 7 strains of a thermophilic cyanobacterium. *Arch. Microbiol.* 153: 344-351.

García-Pichel, F.; M. Mechling and R. W. Castenholz. (1994). Diel migrations of microorganisms within a benthic, hypersaline mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1500-1511.

Garlick, S.; A. Oren and E. Padan. (1977). Occurrence of facultative anoxygenic photosynthesis among filamentous and unicellular cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 129: 623-629.

Gasol, J. M. (1988). *Ecologia Microbiana a l'estanyol d'en Cisó*. Ph. Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona.

Gasol, J. M.; J. Mas; C. Pedrós-Alió and R. Guerrero. (1990). *Ecologia Microbiana y Limnología en la Laguna Cissó: 1976-1989*. *Scientia Gerundensis.* 16: 155-178.

Gasol, J. M.; J. García-Cantizano; R. Massana; F. Peters; R. Guerrero and C. Pedrós-Alió. (1991). Diel changes in the microstratification of the metalimnetic community in lake Cisó. *Hydrobiologia.* 211: 227-240.

Gasol, J. M.; F. Peters; R. Guerrero and C. Pedrós-Alió. (1992a). Community structure in lake Cisó: biomass allocation to trophic groups and differing patterns of seasonal succession in the meta- and epilimnion. *Arch. Hydrobiol.* 123: 275-303.

Gasol, J. M.; R. Guerrero and C. Pedrós-Alió. (1992b). Spatial and temporal dynamics of a metalimnetic *Cryptomonas* peak. *J. Plankton Res.* 14: 1565-1580.

- Gasol, J. M.; J. García-Cantizano; R. Massana; R. Guerrero and C. Pedrós-Alió. (1993). Physiological ecology of a metalimnetic *Cryptomonas* population: relationships to light, sulfide and nutrients. *J. Plankton Res.* 15: 255-275.
- Geitler, L. (1932) Cyanophyceae. In: Rabenhorst, R. (Ed.). (1932). *Kryptogamenflora Von Deutschland, Österreich un der Schweiz*. Akademische Verlags. Leipzig. Reprinted (1971). Johnson Reprint Co, New York. 1196 pp.
- Gervais, F. (1991). Which factors control seasonal and spatial distribution of phytoplankton species in Schaachtensee (Berlin, FRG.). *Arch. Hydrobiol.* 121: 43-65.
- Gervais, F. (1997). Light-dependent growth, dark survival, and glucose uptake by cryptophytes isolated from a freshwater chemocline. *J. Phycol.* 33: 18-25.
- Gibson, C. E. and D. H. Jenson. (1984). The utilization of light by microorganisms. In: Codd, G. A. (Ed.). *Aspects of Microbial Metabolism and Ecology*. SGM. Academic Press. London. 97-128.
- Goehle, K. J. and J. F. Storr. (1978). Biological layering resulting from extreme meromictic stability, Devil's Hole, Abaco Island Bahamas. *Verh. Internat. Verein Limnol.* 20: 550-555.
- Golterman, H. L.; R. S. Clymo and M. A. M. Ohnstad. (1978). *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. IBP Handbook n° 8 . Blackwell Sci. Pub., Oxford, U. K.
- Golterman, H. L. (1988). The calcium and iron bound phosphate phase diagram. *Hydrobiologia.* 159: 153-158.
- Golterman, H. L. (1995a). The role of the ironhydroxide-phosphate-sulphide system in the phosphate exchange between sediments and overlying water. *Hydrobiologia.* 297: 43-54.
- Golterman, H. L. (1995b). Theoretical aspects of the adsorption of orthophosphate onto ironhydroxide *Hydrobiologia.* 315: 59-68.
- Gorlenko, V. M. and S. I. Kuznetsov. (1972). Über die photosynthesierenden bakterien des Kononjer-sees. *Arch. Hydrobiol.* 70: 1-13.
- Gorlenko, V. M.; E. N. Chebotarev and V. I. Kachalkin. (1973). Microbiological processes of oxidation of hydrogen sulfide in the Repnoe Lake (Slavonic lakes). *Mikrobiologiya.* 42: 723-728.

- Gorlenko, V. M.; E. N. Chebotarev and V. I. Kachalkin. (1974a). Participation of microorganisms in the circulation of sulfur in Pomyaretskoe Lake. *Mikrobiologiya*. 43: 908-914.
- Gorlenko, V. M.; E. N. Chebotarev and V. I. Kachalkin. (1974b). Microbial oxidation of hydrogen sulfide in Lake Veisovo (Slavyansk lake). *Mikrobiologiya*. 43. 530-534.
- Gorlenko, V. M.; M. B. Vainstein and V. I. Kachalkin. (1978). Microbiological characteristic of Lake Mogilnoye. *Arch. Hydrobiol.* 81: 475-492.
- Gorlenko, K. M.; G. A. Dubinina and S. I. Kuznetsov. (1983). The ecology of aquatic microorganisms. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele U. Obermiller). Stuttgart.
- Gottschal, J. C.; S de Vries and J. G. Kuenen. (1979) Competition between the facultatively chemolithotrophic *Thiobacillus* A2, and an obligately chemolithotrophic *Thiobacillus* and a heterotrophic *Spirillum* for inorganic and organic substrates. *Arch. Microbiol.* 121: 241-249.
- Gottschal, J. C.; and T. F. Thingstad. (1982) Mathematical description between two and three bacterial species under dual substrate limitation on the chemostat: a comparison with experimental data. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 1403-1418.
- Gromov, B. V. and K. A. Mamkayeva. (1972). Electron microscopy examination of *Bdellovibrio chlorellavorus* parasitism on cells of the green alga *Chlorella vulgaris*. *Tsitilogiya*. (in Russian). 14: 256-260.
- Gromov, B. V. and K. A. Mamkayeva. (1980). Proposal of a new genus *Vamprirovibrio* for chlorellavorus bacteria previously assigned to *Bdellovibrio*. *Mikrobiologiya*. (in Russian). 49: 165-167.
- Guerrero, M. C.; J. Balsa; M. Pascual; B. Martínez and C. Montes. (1991). Caracterización limnológica de la Laguna Salada de Chiprana (Zaragoza, España) y sus comunidades de bacterias fototróficas. *Limnetica*. 7: 83-96.
- Guerrero, R.; C. Abellà and M. R. Miracle. (1978) Spatial and temporal distribution of bacteria in a meromictic karstic lake basin: relationships with physicochemical parameters and zooplankton. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 20: 2264-2271.
- Guerrero, R.; J. Mas and C. Pedrós-Alió. (1984). Buoyant density changes due to intracellular content of sulfur in *Chromatium warmingii* and *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 137: 350-356.

Guerrero, R.; E. Montesinos; C. Pedrós-Alió; I. Esteve; J. Mas; H. Van Gemerden; P. A. Hofman and J. F. Baker. (1985a). Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.* 30: 919-931.

Guerrero, R.; C. Pedrós-Alió; T. M. Schmidt and J. Mas. (1985b). A survey of buoyant density of microorganisms in pure cultures and natural samples. *Microbiologia SEM.* 1: 53-65.

Guerrero, R.; C. Pedrós-Alió; I. Esteve; J. Mas; D. Chase and L. Margulis. (1986). Predatory prokaryotes; predations and primary consumption evolved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2138-2142.

Guerrero, R.; C. Pedrós-Alió; I. Esteve and J. Mas. (1987a). Communities of phototrophic sulphur bacteria in lakes of the Spanish Mediterranean region. *Acta Academiæ Aboensis.* 47: 125-151.

Guerrero, R.; I. Esteve; C. Pedrós-Alió and N. Gaju. (1987b). Predatory bacteria in prokaryotic communities. *Ann. New York Acad. Sci.* 503: 238-250.

Guhl, B. E. and B. J. Finlay. (1993). Anaerobic predatory ciliates track seasonal migrations of planktonic photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 107: 313-316.

Guhl, B.; B. J. Finlay and B. Schink. (1996). Comparison of ciliate communities in the anoxic hypolimnion of three lakes: general features and the influence of lake characteristics. *J. Plankton Res.* 18: 335-353.

Hadas, O. and R. Pinkas. (1995). Sulphate reduction in the hypolimnion and sediments of Lake Kinneret, Israel. *Freshwater Biol.* 33: 63-72.

Haffner, G. D. and R. McNeely. (1989). Community structure in epilimnetic and metalimnetic phytoplankton assemblages. *Hydrobiologia.* 182: 59-71.

Hagström, A.; U. Larssen; P. Hörstedt and S. Normark. (1979). Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 805-812.

Hall, G. H. (1984). Measurement of nitrification rates in lake sediments: comparison of the nitrification inhibitors nitrapyrin and allylthiourea. *Microbial Ecol.* 10: 25-37.

Hall, G. H. and C. Jeffries. (1984). The contribution of nitrification in the water column and profundal sediments to the total oxygen deficit of the hypolimnion of a mesotrophic lake (Grasmere, English Lake District). *Microbial Ecol.* 10: 37-46.

- Hall, K. J. and T. G. Northcote. (1990). Production and decomposition processes in a saline meromictic lake. *Hydrobiologia*. 197: 115-128.
- Hammer, U. T. (1994). Life and times of five Saskatchewan meromictic lakes. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* 79: 235-247.
- Hanna, M. (1990). Evaluation of models predicting mixing depth. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 47: 940-947.
- Hansson, L. A. (1995). Diurnal recruitment patterns in algae: effects of light cycles and stratified conditions. *J. Phycol.* 31: 540-546.
- Harris, G. P. (1984). Phytoplankton productivity and growth measurements: past, present and future. *J. Plankton Res.* 6: 219-238.
- Harris, G. P. (1986). *Phytoplankton Ecology*. Chapman and Hall. London, New York.
- Hartmann, H. J. and D. D. Kunkel. (1991). Mechanisms of food selection in *Daphnia*. *Hydrobiologia*. 225: 129-154.
- Hasle, G. R. (1978). The inverted microscope method. In Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton Manual UNESCO Monogr. Oceanogr. Method.* Paris. 6: 88-97.
- Hayes, P. K. and A. E. Walsby. (1984). An investigation into the recycling of gas vesicles protein derived from collapsed gas vesicles. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1591-1596.
- Hennes, K. P. and M. Simon. (1995). Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 333-340.
- Hennes, K. D.; C. A. Suttle and A. M. Chan. (1995). Fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3623-3627.
- Herbert, R. A.; C. S. Tughan; R. De Wit and H. Van Gernerden. (1986). Development of laminated mat microbial ecosystems in temperate marine environments. In: Megusar, F. and M. Gantar (Ed). *Perspectives in Microbial Ecology*. Slovene Society for Microbiology. Ljubljana. pp. 105-111.
- Heyer, H.; L. Stal and W. E. Krumbein. (1989). Simultaneous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limosa* incubated anaerobically in the dark. *Arch. Microbiol.* 151: 558-564.

Heyman, V. and A. Lungren. (1988). Phytoplankton biomass and production in relation to phosphorus: some conclusions from field studies. *Hydrobiologia*. 170: 211-225.

Hino, S. (1988). Extracellular release of organic matter associated with the physiological state of freshwater blue-green algae. *Arch. Hydrobiol.* 113: 307-317.

Hobbie, J. E.; R. J. Daley and S. Jasper. (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225-1228.

Hofman, P. A. G.; M. J. W. Velohuis and H. Van Gernerden. (1985). Ecological significance of acetate assimilation by *Chlorobium phaeobacteriodes*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 271-278.

Holtan, H.; L. Kamp-Nielsen and A. O. Stavanen. (1988). Phosphorus in soil, water and sediment: an overview. *Hydrobiologia*. 170: 19-34.

Hongve, D. (1994). Nutrient metabolism (C, N, P and Si) in the trophogenic zone of a meromictic lake. *Hydrobiologia*. 277: 17-39.

Howsley, R. and H. W. Pearson. (1979). pH dependent sulphide toxicity to oxygenic photosynthesis in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 6: 287-292.

Huang, T. C. and T. J. Chow. (1986). New type of N₂-fixing unicellular cyanobacterium (blue-green alga). *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 109-110.

Humphries, S. E. and U. D. Lyne. (1988). Cyanophyte blooms: The role of cell buoyancy. *Limnol. Oceanogr.* 33: 79-91.

Hurley, J. P. and C. J. Watras. (1991). Identification of bacteriochlorophylls in lakes via reverse-phase HPLC. *Limnol. Oceanogr.* 36: 307-315.

IGME. (1975). Mapa geológico de España. Hoja 635, Fuentes. Instituto Geológico y Minero de España. Madrid.

Imhoff, J. F. (1988). Anoxygenic phototrophic bacteria. *Methods in Aquatic Bacteriology*. 207-240.

Imhoff, J. F. (1992). Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic bacteria. In: Mann, N. H. and N. G. Carr (Ed.). *Photosynthetic Prokaryotes*. Plenum Press. New York. 53-91.

Infante, A. and J. E. B. Abella. (1985). Inhibition of *Daphnia* by *Oscillatoria* in Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1046-1052.

James, W. F.; R. H. Kennedy and R. F. Gaugush. (1990). Effects of large-scale metalimnetic migration events on phosphorus dynamics in a north-temperate reservoir. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 47: 156-162.

Jansson, M. (1988). Phosphate uptake and utilization by bacteria and algae. *Hydrobiologia.* 170: 177-189.

Jansson, M.; H. Olsson and R. Pettersson. (1988a). Phosphatases: origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia.* 170: 157-175.

Jansson, J., M. Enell; S. Fleischer; R. Gächter; P. Kelderman; S. Löfgren; G. Nürnberg; A. Provini and A. Sinke. (1988b). Phosphorus release from lake sediments. In: *Sediment Phosphorus Group: Working Group Summaries and Proposals for Future Research.* *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeben Limnol.* 30: 83-112.

Jeffrey, S. W. and G. F. Humphrey. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP).* 167: 191-194.

Jensen, B. B. (1990). Fructose utilization by the cyanobacterium *Anabaena variabilis* studied using whole filaments and isolated heterocysts. *Arch. Microbiol.* 154: 92-97.

Jenson, D. H.; J. F. Talling; M. J. Dring; M. M. Tilzer; S. I. Heaney and C. Cunningham. (1984). Measurement of photosynthetically available radiation in fresh-water: comparative test of some current instruments used in studies of primary production. *J. Plankton Res.* 6: 259-274.

Jones, H. L. J. (1997) A classification of mixotrophic protists based on their behaviour. *Freshwater Biol.* 37: 35-43.

Jones, J. G. (1979). Direct counts on membrane filters. In: *A Guide to Methods for Estimating Microbial Numbers and Biomass in Freshwaters.* FBA Sci. Publ. 39: 19-39.

Jones J. G. (1979). A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in freshwater. FBA. Scientific Publication 39. Ambleside. Cumbria. 112 p

Jørgensen, B. B.; J. G. Kuenen and Y. Cohen. (1979a). Microbial transformations of sulfur compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai). *Limnol. Oceanogr.* 24: 799-822.

Jørgensen, B. B.; N. P. Revsbech; T. H. Blackburn and Y. Cohen. (1979b). Diurnal cycle of oxygen and sulfide microgradients and microbial photosynthesis in a cyanobacterial mat sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 46-58.

Jørgensen, B. B. (1982). Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Phil. Trans. Roy. Soc. London B.* 298: 543-561.

Jørgensen, B. B.; Y. Cohen and N. P. Revsbech. (1986). Transition from anoxygenic to oxygenic photosynthesis in a *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 408-417.

Jørgensen, B. B. and D. J. Des Marais. (1986). A simple fiber-optic microprobe for high resolution light measurements: application in marine sediment. *Limnol. Oceanogr.* 31: 1376-1383.

Jørgensen, B. B.; Y. Cohen and D. J. Des Marais. (1987). Photosynthetic action spectra and adaptation to spectral light distribution in a benthic cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 879-886.

Jørgensen, B. B. and D. J. Des Marais. (1990). The diffusive boundary layer of sediments: oxygen microgradients over a microbial mat. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1343-1355.

Jørgensen, B. B. (1994). Sulfate reduction and thiosulfate transformations in a cyanobacterial mat during a diel oxygen cycle. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13: 303-312.

Kangatharasingam, N.; L. Wang and J. C. Prisco. (1991). Evidence for bacterial chemotaxis to cyanobacteria from a radioassay technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2395-2398.

Kato, K. (1994) Planktonic bacterial DNA and RNA synthesis from algal extracellular products in a eutrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15: 291-298.

Kemp, P. F.; B. F. Sherr and E. B. Sherr. (1993). *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton, Flo. 777 pp.

Kepner, R. L. and J. R. Pratt. (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.* 58: 603-615.

- Kirchman, D. L. (1993). Statistical analysis of direct counts of microbial abundance. In: Kemp, P. F.; B. F. Sherr; E. B. Sherr and J. J. Cole (Ed.). Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers. Boca Raton. 117-120.
- Kirk, J. T. O. (1983). Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press. London/New York.
- Kirk, J. T. O. (1985). Effects of suspensoids (turbidity) on penetration of solar radiation in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia*. 125: 195-208.
- Kjelleberg, S.; K. C. Marshall and M. Hermasson. (1985). Oligotrophic and copiotrophic marine bacteria-observations related to attachment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 89-96.
- Klemer, A. R., L. L. Hendzel; D. L. Findlay; R. A. Hedin; M. T Mageau and A. Konopka. (1995). Carbon availability and the pattern of cyanobacterial dominance in enriched low-carbon lakes. *J. Phycol.* 31: 735-744.
- Klemer, A. R.; J. J. Cullen; M. T. Mageau; K. M. Hanson and R. A. Sundell. (1996) Cyanobacterial buoyancy regulation: the paradoxical roles of carbon. *J. Phycol.* 323: 47-53.
- Kohler, H. P., B. Ahring; C. Abellà; K. Ingvorsen; H. Kewelok; E. Laczko; E. Stupperich and F. Tomei. (1984). Bacteriological studies on the sulfur cycle in the anaerobic part of the hypolimnion and in the surface sediments of Rotsee in Switzerland. *FEMS Microbiol. Lett.* 21: 279-286.
- Kondratieva, E. N.; V. G. Zhukov; R. N. Ivanovsky; Y. P. Petushkova and E. Z. Monosov. (1976). The capacity of phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* for chemosynthesis. *Arch. Microbiol.* 108: 287-292.
- Konopka, A. (1982). Physiological ecology of a metalimnetic *Oscillatoria rubescens* population. *Limnol. Oceanogr.* 27: 1154-1161.
- Konopka, A. (1984). Effect of light-nutrient interactions on buoyancy regulation in planktonic cyanobacteria. In Klug, M. J. and C. A. Reddy (Ed.). *Current Perspectives in Microbial Ecology*. ASM. Washington DC. 41-48.
- Konopka, A.; J. C. Kromkamp and L. R. Mur. (1987a). Buoyancy regulation in phosphate-limited cultures of *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 135-142.

- Konopka, A.; J. Kromkamp and L. R. Mur. (1987b). Regulation of gas vesicle content and buoyancy in light- or phosphate-limited cultures of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyta). *J. Phycol.* 23: 70-78.
- Konopka, A. (1989). Metalimnetic cyanobacteria in hard-water lakes: Buoyancy regulation and physiological state. *Limnol. Oceanogr.* 34: 1174-1184.
- Konopka, A. and A. R. Klemer. (1993). Physiological ecology of planktonic cyanobacteria. In: Guerrero, R. and C. Pedrós-Alió (Ed.). *Trends in Microbial Ecology*. Spanish Society for Microbiology. 45-50.
- Konopka, A. E.; A. R. Klemer; A. E. Walsby and B. W. Ibelings. (1993). Effects of macronutrients upon buoyancy regulation by metalimnetic *Oscillatoria agardhii* in Deming Lake, Minnesota. *J. Plankton Res.* 15: 1019-1034.
- Korthals, H. J. and C. L. M. Steenbergen. (1985). Separation and quantification of pigments from natural phototrophic microbial populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 177-185.
- Koschel, R.; J. Benndorf; G. Proft and F. Recknagel. (1983). Calcite precipitation as a natural control mechanism of eutrophication. *Arch. Hydrobiol.* 98: 380-408.
- Kroer, N. (1994). Relationships between biovolume and carbon and nitrogen content of bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13: 217-224.
- Kromkamp, J. C. and L. R. Mur. (1984). Buoyant density changes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* due to changes in the cellular carbohydrate content. *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 105-109.
- Kromkamp, J. and A. Konopka. (1986). Buoyancy regulation in cyanobacteria. In Megusar, F. and M. Gantar (Ed.). *Perspectives in Microbial Ecology*. Slovene Society for Microbiology. Ljubljana. 588-593.
- Kromkamp, J.; A. Konopka and L. R. Mur. (1986). Buoyancy regulation in a strain of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae): the importance of carbohydrate accumulation and gas vesicle collapse. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2113-2121.
- Kromkamp, J.; A. Konopka and L. R. Mur. (1988). Buoyancy regulation in light-limited continuous cultures of *Microcystis aeruginosa*. *J. Plankton Res.* 10: 171-183.
- Kromkamp, J. and A. E. Walsby. (1990). A computer model of buoyancy and vertical migration in cyanobacteria. *J. Plankton Res.* 12: 161-184.

- Kuznetsov, S. I. (1970). The microflora of lakes and its geochemical activities. University of Texas Press, Austin.
- Laliberté G. and J. De La Noüe. (1993). Auto-, hetero-, and mixotrophic growth of *Chlamydomonas humicola* (Chlorophyceae) on acetate. J. Phycol. 29: 612-620.
- Lammers, W. T. (1992). Stimulation of bacterial cytokinesis by bacteriophage predation. Hydrobiologia. 235/236: 261-265.
- Larkin, J. M. (1980). Isolation of *Thiothrix* in pure culture and observation of a filamentous epiphyte on *Thiothrix*. Curr. Microbiol. 4: 155-158.
- Larkin, J. M.; M. C. Henk and S. D. Burton. (1990). Occurrence of a *Thiothrix* sp. attached to mayfly larvae and presence of parasitic bacteria in the *Thiothrix* sp. Appl. Environ. Microbiol. 56: 357-361.
- Lassen, C.; H. Ploug and B. B. Jørgensen. (1992). A fibre-optic scalar irradiance microsensor: application for spectral light measurements in sediments. FEMS Microbiol. Ecol. 86: 247-254.
- Lawrence, J. R.; R. C. Haynes and U. T. Hammer. (1978). Contribution of photosynthetic green sulphur bacteria to total primary production in a meromictic saline lake. Verh. Internat. Verein Limnol. 20: 201-207.
- Lee, S. and J. A. Fuhrman. (1987). Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1298-1303.
- Lenz, J. and B. Zeitzschel. (1968). Zur bestimmung des extinktionkoeffizienten für chlorophyll a in methanol. Kieler Meeres-Forschungen. 24: 41-50.
- Li-Cor Inc. (1986). Li-Cor underwater radiation sensors, type SA. Intruction Manual. Publication N° 8609-57 Li-Cor Inc, Lincoln, Nebraska. USA.
- Li-Cor Inc. (1988). LI-1000 datalogger instruction manual. Publication N° 8510-0051 Li-Cor Inc, Lincoln Nebraska, USA.
- Lieberman, O. S.; M. Shilo and J. Van Rijn. (1994). The physiological ecology of a freshwater dinoflagellate bloom population: vertical migration, nitrogen limitation and nutrient uptake kinetics. J. Phycol. 30: 964-971.
- Lindholm, T.; K. Weppeling and H. S. Jensen. (1985). Stratification and primary production in a small brackish lake studied by close-interval siphon sampling. Verh. Internat. Verein Limnol. 22: 2190-2192.

Lindholm, T. and K. Weppling. (1987). Blooms of phototrophic bacteria and phytoplankton in a small brackish lake on Åland, SW. Finland. *Acta Academiae Aboensis*. 47: 45-53.

Lovell, C. R. and A. Konopka. (1985a). The effects of temperature on bacterial production in a dimictic eutrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 135-140.

Lovell, C. R. and A. Konopka. (1985b). Excretion of photosynthetically fixed organic carbon by metalimnetic phytoplankton. *Microbial Ecol.* 11: 1-10

Lund, J. W. G.; C. Kipling and E. D. Lecren. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia* 11: 143-170.

Lupton, F. S. and K. C. Marshall. (1984). Mechanisms of specific bacterial adhesion to cyanobacterial heterocysts. In Klug, M. J. and C. A. Reddy (Ed.). *Current perspectives in Microbial Ecology*. ASM. Washington. DC. pp. 144-150.

Lyalikova, N. N. (1957). A study of the assimilation of free carbon dioxide by purple sulfur bacteria in Lake Belovod. *Microbiologiya*. 26: 97-103.

Llopis Lladó, N. (1970). *Fundamentos de hidrogeología cársica*. Blume. Madrid.

Madigan, M. T. (1988). Microbiology, physiology and ecology of phototrophic bacteria. In: Zehnder, A. J. B. (Ed.). *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley and Sons. New York. 39-112.

Madoni, P. (1990). The ciliated protozoa of the monomictic lake Kinneret (Israel): species composition and distribution during stratification. *Hydrobiologia*. 190: 111-120.

Mague, T. H.; E. Friberg; D. J. Hughes and J. Horris. (1980) Extracellular release of carbon by marine phytoplankton; a physiological approach. *Limnol. Oceanogr.* 25: 262-279.

Malin, G. and A. E. Walsby. (1985). Chemotaxis of a cyanobacterium on concentration gradients of carbon dioxide, bicarbonate and oxygen. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2643-2652.

Mantoura, R. F. C. and C. A. Llewellyn. (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase HPLC. *Analyt. Chim. Acta.* 151: 297-314.

Margalef, R. (1983). *Limnología*. Omega. Barcelona.

Marshall, C. T. and E. H. Peters. (1989). General patterns in the seasonal development of chlorophyll a for temperate lakes. *Limnol. Oceanogr.* 34: 856-867.

Marshall, K. C. (1988). Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. *Can. J. Microbiol.* 34: 503-506.

Martínez, A.; I. Pibernat; K. J. Figueras and J. García-Gil. (1997). Structure and composition of freshwater microbial mats from a sulfur spring ("Font Pudosa"), NE Spain). *Microbiologia SEM.* 13: 45-56.

Mas, J.; C. Pedrós-Alió and R. Guerrero. (1985). Mathematical model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volume and density of microorganisms. *J. Bacteriol.* 164: 749-756.

Mas, J. and H. Van Gemerden. (1987). Influence of sulfur accumulation and composition of sulfur globule on cell volume and buoyant density of *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 146: 362-369.

Massana, R. and C. Pedrós-Alió. (1994a). A method to determine integrated predation in stratified waters. *Limnol. Oceanogr.* 39: 248-262.

Massana, R. and C. Pedrós-Alió. (1994b). Role of anaerobic ciliates in planktonic food webs: abundance, feeding, and impact on bacteria in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1325-1334.

Massana, R.; J. M. Gasol, K. Jürgens and C. Pedrós-Alió. (1994) Impact of *Daphnia pulex* on a metalimnetic microbial community. *J. Plankton Res.* 16: 1379-1399.

Matsuyama, M. (1978). Limnological aspects of meromictic lake Suigetsu: its environmental conditions and biological metabolism. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 44: 1-65.

Matsuyama, M. and E. Shirouzu. (1978). Importance of photosynthetic sulfur bacteria *Chromatium* sp. as an organic matter producer in Lake Kaiike Jap. *J. Limnol.* 39: 103-111.

Matsuyama, M. (1981). Comparative aspects of a small coastal lake, Kaiike, on Kamikoshiki island, southern Kyushu, Japan. *Verh. Internat. Verein Limnol.* 21: 979-986.

- Mazumder, A. and D. Dickman. (1989). Factors affecting the spatial and temporal distribution of phototrophic sulfur bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 116: 204-226.
- Mazumder, A. and W. D. Taylor. (1994). Thermal structure of lakes varying in size and water clarity. *Limnol. Oceanogr.* 39: 968-976.
- McGuire, S. and P. J. Currie. (1993). Factors related to the variation in mixing depth among meromictic lakes. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 50: 1338-1342.
- Meffert, M. E. and J. Overbeck. (1985). Dynamics of chlorophyll and photosynthesis in natural phytoplankton associations. II. Primary productivity, quantum yields and photosynthetic rates in small norhtgerman lakes. *Arch. Hydrobiol.* 104: 363-385.
- Megard, R. O.; D. W. Tonkyn and W. H. Senft. (1984). Kinetics of oxygenic photosynthesis in planktonic algae. *J. Plankton Res.* 6: 325-338.
- Meyns, S.; R. Flli and B. Ribí. (1994). Comparison of chlorophyll *a* analsis by HPLC and spectrophotometry: where do the differences come from?. *Arch. Hydrobiol.* 132: 129-139.
- Millero, F. J.; T. Plese and M. Fernandez. (1988). The dissociation of hydrogen sulfide in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 33: 269-274.
- Millie, D. F.; H. W. Paerl and J. P. Hurley. (1993). Microalgal pigment assessments using high-performance liquid chromatography: a synopsis of organismal and ecological applications. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 50: 2513-2527.
- Mir, J.; M. Martínez-Alonso; I. Esteve and R. Guerrero. (1991). Vertical stratification and microbial assemblage of a microbial mat in the Ebro Delta (Spain). *FEMS Microbiol. Ecol.* 86: 59-68.
- Miracle, M. R. and E. Vicente. (1983). Vertical distribution and rotifer concentrations in the chemocline of meromictic lakes. *Hydrobiologia.* 104: 259-267.
- Miracle, R. M. and E. Vicente. (1985) Phytoplankton and photosynthetic sulphur bacteria production in the meromictic coastal lagoon of Cullera (Valencia, Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 22: 2214-2220.
- Miracle, M. R.; E. Vicente, R. L. Croome and P. A. Tyler. (1991). Microbial microcosms of the chemocline of a meromictic lake in relation to changing levels of PAR. *Verh. Internat. Verein Limnol.* 24: 1139-1144.

- Miracle, M. R.; E. Vicente and C. Pedrós-Alió. (1992). Biological studies of spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica*. 8: 59-78.
- Miracle, M. R.; J. Armengol and M. J. Dasi. (1993). Extreme meromixis determines strong differential planktonic vertical distributions. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25: 705-710.
- Miracle, M. R. and M. T. Alfonso. (1993). Rotifer vertical distributions in a meromictic basin of Lake Banyoles (Spain). *Hydrobiologia*. 255/256: 371-380.
- Miracle, M. R. and X. Armengol-Díaz. (1995). Population dynamics of oxyclinal species in lake Arcas-2 (Spain). *Hydrobiologia*. 313/314: 291-301.
- Moezelaar, R. and L. J. Stal. (1994). Fermentation in the unicellular cyanobacterium *Microcystis* PCC 7806. *FEMS Microbiol. Ecol.* 162: 63-69.
- Moezelaar, R.; M. J. Teixeira de Mattos and L. J. Stal. (1995). Lactate dehydrogenase in the cyanobacterium *Microcystis* PCC 7806. *FEMS Microbiol. Lett.* 127: 47-50.
- Moezelaar, R.; S. M. Bijvank and L. J. Stal. (1996). Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1752-1758.
- Montesinos, E.; R. Guerrero; C. Abellá and I. Esteve. (1983). Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeobacteroides* in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1007-1016.
- Montesinos, E. and I. Esteve. (1984). Effect of algal shading on the net growth and production of phototrophic sulfur bacteria in lakes of the Banyoles karstic area. *Verh. Internat. Verein Limnol.* 22: 1102-1105.
- Montesinos, E. and H. Van Gernerden. (1986). The distribution and metabolism of planktonic phototrophic bacteria. In: Megusar, F. and M. Gantar (Ed.). *Perspectives in Microbial Ecology*. Slovene Society for Microbiology. Ljubljana. 349-359.
- Montesinos, E. (1987). Change in size of *Chromatium minus* cells in relation to growth rate, sulfur content, and photosynthetic activity: A comparison of pure cultures and field populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 864-871.
- Morgan, K. and J. Kalff. (1975). The winter dark survival of an algal flagellate *Cryptomonas erosa* (Skuja). *Verh. Internat. Verein Limnol.* 19: 2734-2740.

Murphy, T. P.; K. J. Hall and I. Yesaki. (1983). Coprecipitation of phosphate with calcite in a naturally eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 28: 58-59.

Murray, A. P., C. F. Gibbs and A. R. Longmore. (1986). Determination of chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorometric methods. *Mar. Chem.* 19: 211-227.

Nagata, T. and Y. Watanabe. (1990). Carbon and nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1303-1309.

Nakamura, H. (1938) Über die kohlenaesureassimilation bei niederen algen in Anwesenheit des Schwefelwasserstoffes. *Acta Phytochemica (Tokyo)* 10: 271-281.

Nalewajko C. (1977) Extracellular release in freshwater algae and bacteria: extracellular products of algae as a source of carbon for heterotrophs. In "Aquatic microbial communities" J. Cairns Jr. (ed). Garland Publ. Inc. New York, London. 589-625.

Newell, S. Y. and R. R. Christian. (1981). Frequency of dividing cells as an estimator of bacterial productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 23-31.

Nold, S. C. and D. M. Ward. (1996). Photosynthate partitioning and fermentation in hot spring microbial mat communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4598-4607.

Nürnberg, G. and R. H. Peters. (1984). Biological availability of soluble reactive phosphorus in anoxic and oxic freshwaters. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 41: 757-765.

Nürnberg, G. K. (1985). Availability of phosphorus upwelling from iron-rich anoxic hypolimnia. *Arch. Hydrobiol.* 104: 459-476.

Nürnberg, G. K.; P. J. Dillon and McQueen. (1986). Internal phosphorus load in an oligotrophic precambrian shield lake with and anoxic hypolimnion. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 43: 574-580.

Nürnberg, G. K. (1987). A comparison of internal phosphorus loads in lakes with anoxic hypolimnia: laboratory incubation versus in situ hypolimnetic phosphorus accumulation. *Limnol. Oceanogr.* 32: 1160-1164.

Nygaard, K. and A. Tobiejen. (1993). Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 38: 273-277.

Ojala, A. (1993a). Effects of temperature and irradiance on the growth of two freshwater photosynthetic cryptophytes. *J. Phycol.* 29: 278-284.

Ojala, A. (1993b). The influence of light quality on growth and phycobiliprotein/chlorophyll *a* fluorescence quotients of some species of freshwater algae in culture. *Phycologia.* 32: 22-28.

Ojala, A.; S. I. Heaney; L. Arvola and F. Barbosa. (1996). Growth of migrating and non-migrating cryptophytes in thermally and chemically stratified experimental columns. *Freshwater Biol.* 35: 599-608.

Oliver, R. L. and A. E. Walsby. (1984). Direct evidence for the role of light mediated gas vesicle collapse in the buoyancy regulation of *Anabaena flos-aquae* (Cyanobacteria). *Limnol. Oceanogr.* 29: 879-886.

Oliver, R. L.; R. H. Thomas; C. S. Reynolds and A. E. Walsby. (1985). The sedimentation of buoyant *Microcystis* colonies caused by precipitation with an iron-containing colloid. *Proc. R. Soc. London Ser B.* 223: 511-528.

Oliver, R. L. (1994). Floating and sinking in gas-vacuolate cyanobacteria. *J. Phycol.* 30: 161-173.

Oren, A.; E. Padan and M. Avron. (1977). Quantum yields for oxygenic and anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2152-2156.

Oren, A. and E. Padan. (1978). Induction of anaerobic, photoautotrophic growth in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *J. Bacteriol.* 133: 558-563.

Oren, A. and M. Shilo. (1979). Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*: sulfur respiration and lactate fermentation. *Arch. Microbiol.* 122: 77-84.

Oren, A.; E. Padan and S. Malkin. (1979). Sulfide inhibition of photosystem II in cyanobacteria (blue-green algae) and tobacco chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 546: 270-279.

Orion Research. (1980). Instruction manual sulfide ion electrode model 94-16. Orion Research Incorporated. Cambridge, M. A., USA.

Orion Research. (1982). Handbook of electrode technology. Orion Research. Inc. Cambridge. MA.

Orion Research. (1983). Instruction manual ammonia electrode model 95-12. Orion Research. Incorporated. Cambridge, M. A., USA.

Ormerod, J. G. (1992). Physiology of the photosynthetic prokaryotes. In: Mann, N. H. and N. G. Carr (Ed.). Photosynthetic Prokaryotes. Plenum Press. New York. 93-120.

Overmann, J. and M. M. Tilzer. (1989). Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic lake. Mittlerner Buchensee, west-Germany. Aquatic Sciences. 51: 261-278.

Overmann, J.; S. Lehmann and N. Pfennig. (1991a). Gas vesicle formation and buoyancy regulation in *Pelodictyon phaeoclathratiforme* (green sulfur bacteria). Arch. Microbiol. 157: 29-37.

Overmann, J.; J. T. Beatty, K. J. Hall; N. Pfennig and T. G. Northcote. (1991b). Characterization of a dense, purple sulfur bacterial layer in a meromictic salt lake. Limnol. Oceanogr. 36: 846-859.

Overmann, J. and N. Pfennig. (1992a). Buoyancy regulation and aggregate formation in *Amoebobacter purpureus* from Mahoney lake. FEMS Microbiol. Ecol. 101: 67-79.

Overmann, J. and N. Pfennig. (1992b). Continuous chemotrophic growth and respiration of Chromatiaceae species at low oxygen concentrations. Arch. Microbiol. 158: 59-67.

Overmann, J.; H. Cypionka and N. Pfennig. (1992). An extremely low-light-adapted phototrophic sulfur bacterium from the black sea. Limnol. Oceanogr. 37: 150-155.

Overmann, J.; J. T. Beatty and K. J. Hall. (1994). Photosynthetic activity and population dynamics of *Amoebobacter purpureus* in a meromictic saline lake. FEMS Microbiol. Ecol. 15: 309-320.

Overmann, J.; J. T. Beatty and K. J. Hall. (1996a). Purple sulfur bacteria control the growth of aerobic heterotrophic bacterioplankton in a meromictic salt lake. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3251-3258.

Overmann, J.; J.T. Beatty; H. R. Krouse and K. J. Hall (1996b) The sulfur cycle in the chemocline of a meromictic salt lake Limnol. Oceanogr. 41: 147-156

Pace, M. L. (1988). Bacterial mortality and the fate of bacterial production. Hydrobiologia. 159: 41-50.

Padan, E. (1979a). Impact of facultatively anaerobic photoautotrophic metabolism on ecology of cyanobacteria (blue-green algae). In Alexander, M. (Ed.). *Advances in Microbial Ecology*, Vol 3. Plenum Press. New York and London. 1-48.

Padan, E. (1979b). Facultative anoxygenic photosynthesis in cyanobacteria. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 30: 27-40.

Padan, E. and Y. Cohen. (1982). Anoxygenic photosynthesis. In Carr, N. G. and B. A. Whitton (Ed.). *The Biology of Cyanobacteria*. University of California Press. Berkeley.

Padan, E. (1989). Combined molecular and physiological approach to anoxygenic photosynthesis of cyanobacteria. In Cohen, Y. and E. Rosenberg (Ed.). *Microbial Mats: Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities*. ASM, Washington DC. 277-282.

Paerl, H. W. (1976). Specific associations of the bluegreen algae *Anabaena* and *Aphanizomenon* with bacteria in freshwater blooms. *J. Phycol.* 12: 431-435.

Paerl, H. W.; B. M. Bebout and L. E. Prufert. (1989). Bacterial associations with marine *Oscillatoria* sp (*Trichodesmium* sp.) populations: ecophysiological implications. *J. Phycol.* 25: 773-784.

Paerl, H. W.; B. M. Bebout; S. B. Joye and D. J. Des Marais. (1993). Microscale characterization of dissolved organic matter production and uptake in marine microbial mat communities. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1150-1161.

Pardo, L. (1948). *Catálogo de los Lagos de España*. Ministerio de Agricultura. Instituto Forestal de Investigación y Experiencias. Madrid. 41: 521 p.

Parker, R. D. and U. T. Hammer. (1983). A study of the Chromatiaceae in a saline meromictic lake in Saskatchewan, Canada. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* 68: 839-851.

Parker, R. D.; J. R. Lawrence and U. T. Hammer. (1983). A comparison of phototrophic bacteria in two adjacent saline meromictic lakes. *Hydrobiologia.* 105: 53-61.

Parkin, T. B. and T. D. Brock. (1980a). The effects of light quality on the growth of phototrophic bacteria in lakes. *Arch. Microbiol.* 125: 19-27.

Parkin, T. B. and T. D. Brock. (1980b). Photosynthetic bacterial production in lakes: the effect of light intensity. *Limnol. Oceanogr.* 25: 711-718.

- Parkin, T. B. and T. D. Brock. (1981a). Photosynthetic bacterial production and carbon mineralization in a meromictic lake. *Arch. Hydrobiol.* 91: 366-382.
- Parkin, T. B. and T. D. Brock. (1981b). The role of phototrophic bacteria in the sulfur cycle of a meromictic lake. *Limnol. Oceanogr.* 26: 880-890.
- Pedrós-Alió, C.; E. Montesinos and R. Guerrero. (1983). Factors determining annual changes in bacterial photosynthetic pigments in holomictic lake Cisó (Spain). *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 999-1006
- Pedrós-Alió, C.; J. M. Gasol and R. Guerrero. (1987). On the ecology of a *Cryptomonas phaseolus* population forming a metalimnetic bloom in lake Cisó, Spain: annual distribution and loss factors. *Limnol. Oceanogr.* 32: 285-298.
- Pedrós-Alió, C.; J. Mas; J. M. Gasol and R. Guerrero. (1989). Sinking speeds of free-living phototrophic bacteria determined with covered and uncovered traps. *J. Plankton Res.* 11: 887-905.
- Pedrós-Alió, C. (1989). Toward an autoecology of bacterioplankton. In: Sommer, U. (Ed.). *Plankton Ecology. Succession in Plankton Communities.* Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York. 297-336.
- Pedrós-Alió, C. and M. M. Sala. (1990). Microdistribution and diel vertical migration of flagellated vs. gas-vacuolated purple sulfur bacteria in a stratified water body. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1637-1644.
- Pedrós-Alió, C. and R. Guerrero. (1993). Microbial Ecology in Lake Cisó. In: Jones, J. G. (Ed.). *Advances in Microbial Ecology.* Plenum Press, New York and London. 13: 155-209.
- Pedrós-Alió, C.; J. García-Cantizano and J. I. Calderón (1993) Bacterial production in anaerobic water columns. In "Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology", Kemp, P. F.; B. F. Sherr; E. B. Sherr and J. J. Cole (Eds.). Lewis Publishers, Chelsea, Mich. pp. 519-531.
- Pentecost, A. (1984). Effects of sedimentation and light intensity of mat-forming Oscillatoriaceae with particular reference to *Microcoleus lyngbyaceus* Gomont. *J. Gen. Microbiol.* 130: 983-990.
- Peterson, B. J. (1980). Aquatic primary productivity and the ¹⁴C-CO₂ method: a history of the productivity problem. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 11: 359-385.
- Pfennig, N. and F. Widdel. (1982). The bacteria of the sulphur cycle. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 298: 433-441.

- Pibernat, I. (1995) Ecologia microbiana dels bacteris verds del sofre. Diversitat i fisiologia de *Chlorobium* sp. Ph. D. Thesis. Universitat de Girona.
- Pick, F. R.; C. Nalewajko and D. R. S. Lean. (1984). The origin of metalimnetic chrysophyte peak. *Limnol. Oceanogr.* 29: 125-134.
- Pick, F. R. and C. Bérubé. (1992). Diel cycles in the frequency of dividing cells of freshwater picocyanobacteria. *J. Plankton Res.* 14: 1193-1198.
- Pierson, B.; A. Oesterle and G. L. Murphy. (1987). Pigments, light penetration, and photosynthetic activity in the multilayered microbial mats of Great Sippewissett salt marsh, Massachusetts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 365-376.
- Porter, K. G.; E. B. Sherr; B. F. Sherr; M. Pace and R. W. Sanders. (1985). Protozoa in planktonic food webs. *J. Protozool.* 32: 409-415.
- Porter, K. G. (1988). Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia.* 159: 89-97.
- Post, A. F.; J. G. Loogman and L. R. Mur. (1985). Regulation of growth and photosynthesis by *Oscillatoria agardhii* grown with a light/dark cycle. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 97-102.
- Post, A. F.; J. G. Loogman and L. R. Mur. (1986). Photosynthesis, carbon flows and growth of *Oscillatoria agardhii* Gomont in environments with a periodic supply of light. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2129-2136.
- Post, A. F. (1987). Transient state characteristics of changes in light conditions for the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* II. Dynamics in cellular contents and growth rates. *Arch. Microbiol.* 149: 19-23.
- Potthoff, H. (1921). Zur entwicklungsgeschichte der gattungen *Chromatium* und *Spirillum*. *Zentralbl Bacteriol* II. 55: 9-13.
- Potthoff, H. (1922). Zur frage nach dem vorkommen von befruchtungsvorgängen bei bakterien. *Naturwissenschaften.* 18: 441 bis 446.
- Prézelin, B. B. (1992). Diel periodicity in phytoplankton productivity. *Hydrobiologia.* 238: 1-35.
- Raven J. A. and K Richardson. (1984) Dinoflagellate flagella: A cost-benefit analysis *New Phytologist* 98: 259-276.

Repeta, D. J.; D. J. Simpson; B. B. Jørgensen and H. N. Jannasch. (1989). Evidence for anoxygenic photosynthesis from the distribution of bacteriochlorophyll in the Black Sea. *Nature*. 342: 68-72.

Reynolds, C. S. (1984). Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. *Freshwater Biol.* 14: 111-142.

Richardson, L. L. and R. W. Castenholz. (1987a). Diel vertical movements of the cyanobacterium *Oscillatoria terebriformis* in a sulfide-rich hot spring microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2142-2150.

Richardson, L. L. and R. W. Castenholz. (1987b). Enhanced survival of the cyanobacteria *Oscillatoria terebriformis* in darkness under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2151-2158.

Richardson, L. L. and R. W. Castenholz. (1989). Chemokinetic motility responses of the cyanobacterium *Oscillatoria terebriformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 261-263.

Rippka, R.; J. Desnuelles, J. B. Waterbury; M. Herdman and R. Y. Stanier. (1979). Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.

Rippka, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria. In Palker, L. and A. N. Glazer (Ed.). *Methods in Enzymology*. Academic Press. Inc. New York. 67: 3-27.

Rodier, J. (1984). *L'analyse de l'eau*. Dunod. Berdas. Paris.

Rodrigo, M. A. (1997). *Limnología comparada de las lagunas de dos sistemas cársticos de Cuenca. Bacterias fotosintéticas de la Laguna de La Cruz y la Laguna Arcas-2* Ph. D. Thesis. Universitat de València.

Romanenko, V. I.; M. Peres Eiris; V. M. Kudryavtsev and M. A. Pubienes. (1976). Microbiological processes in meromictic lake Vae De San Juan, Cuba. *Mikrobiologiya*. 45: 539-546.

Romans, K. M.; E. J. Carpenter and B. Bergman. (1994). Buoyancy regulation in the colonial diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium tenue*: ultrastructure and storage of carbohydrate, polyphosphate, and nitrogen. *J. Phycol.* 30: 935-942.

Roser, D. J.; H. J. Bavor and J. K. McKersie. (1987). Application of most-probable number statistics to direct enumeration of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1327-1332.

Rosowski, J. R. (1992). Specificity of bacterial attachment sites on the filamentous diatom *Navicula confervacea* (Bacillariophyceae). *Can. J. Microbiol.* 38: 676-686.

Rott, E. (1981). Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43: 32-62.

Rott, E. (1988). Some aspects of the seasonal distribution of flagellates in mountain lakes. *Hydrobiologia.* 161: 159-170.

Sagert, S. and H. Schubert. (1995). Acclimation of the photosynthetic apparatus of *Palmaria palmata* (Rhodophyta) to light qualities that preferentially excite photosystem I or photosystem II. *J. Phycol.* 31: 547-554.

Salonen, K.; R. I. Jones and L. Arvola. (1984). Hypolimnetic phosphorus retrieval by diel vertical migrations of lake phytoplankton. *Freshwater Biol.* 14: 431-438.

Salonen, K. and A. Lehtovaara. (1992). Migrations of haemoglobin-rich *Daphnia longispina* in a small, steeply stratified, humic lake with an anoxic hypolimnion. *Hydrobiologia.* 229: 271-288.

Salonen, K.; L. Arvola; T. Tulonen; T. Hammar; T. -R. Metsälä; P. Kankaala and U. Münster. (1992). Planktonic food chains of a highly humic lake. I. A mesocosm experiment during the spring primary production maximum. *Hydrobiologia.* 229: 125-142.

Salonen, K.; L. Arvola and M. Rosengerg. (1993). Diel vertical migrations of phyto- and zooplankton in a small steeply stratified humic lake with low nutrient concentration. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 25: 539-543.

Sánchez-Amat, A. (1989). Contribución al conocimiento de la biología de los *Bdellovibrios* marinos. Ph. D. Thesis. Universidad de Murcia. 155 pp.

Sanchez- Amat, A. and F. Torrella. (1990). Formation of stable bdelloplasts as a starvation-survival strategy of marine *Bdellovibrios*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2717-2725.

Sartory, D. P. (1985). The determination of algal chlorophyllous pigments by high performance liquid chromatography and spectrophotometry. *Water Res.* 19: 605-610.

Saunders, G. W. (1972). Potential heterotrophy in natural population of *Oscillatoria agardhii* var. *isothrix* Skuja. *Limnol. Oceanogr.* 17: 704-711.

Schaub, B. E. M. and H. Van Gernerden. (1994). Simultaneous phototrophic and chemotrophic growth in the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* M1. FEMS Microbiol. Ecol. 13: 185-196.

Schelling, M. and S. Conti. (1986). Host receptor sites involved in the attachment of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Bdellovibrio stolpii*. FEMS Microbiol. Lett. 36: 319-323.

Schindler, P. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. Science. 195: 260-262.

Schulz, S.; S. Wagener and N. Pfennig. (1990). Utilization of various chemotrophic and phototrophic bacteria as food by the anaerobic ciliate *Trimyema compressum*. Eur. J. Protistol. 26: 122-131.

Shahak, Y.; B. Arieli; B. Binder and E. Padan. (1987). Sulfide-dependent photosynthetic electron flow coupled to proton translocation in thylakoids of the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. Arch. Biochem. Biophys. 259: 605-615.

Sheridan, R. P. and R. W. Castenholz. (1968). Production of hydrogen sulfide by a thermophilic blue-green alga. Nature. 217: 1063-1064.

Sheridan, R. P. (1973). Hydrogen sulfide production by *Synechococcus lividus*. J. Phycol. 9: 437-445.

Sherr, B. F.; E. B. Sherr and J. McDaniel. (1992). Effect of protistan grazing on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2381-2385.

Shilo, M. (1984). *Bdellovibrio* as a predator. In: Klug, M. J. and C. A. Reddy (Ed.). Current Perspectives in Microbial Ecology. ASM. Washington. 334-339.

Shilo, M. and A. Fattom. (1984). The ecology and adaptative strategies of benthic cyanobacteria. In: Codd, G. A. (Ed.). Aspects of Microbial Metabolism and Ecology. SGM. Academic Press. London. 175-186.

Shoaf, W. T. and B. W. Lium. (1976). Improved extraction of chlorophyll *a* and *b* from algae using dimethyl sulfoxide. Limnol. Oceanogr. 21: 926-928.

Siefert, E. and N. Pfennig. (1984). Convenient method to prepare neutral sulfide solution for cultivation of phototrophic sulfur bacteria. Arch. Microbiol. 139: 100-101.

- Siuda, W.; R. Wcislo and R. J. Chróst. (1991). Composition and bacterial utilization of photosynthetically produced organic matter in a eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* 121: 473-484.
- Slooten, L.; H. De Smet and C. Sybesma. (1989). Sulfide-dependent electron transport in thylakoids from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Biochim. Biophys. Acta.* 973: 272-280.
- Smith, V. H. (1979). Nutrient dependence of primary productivity in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 24: 1051-1064.
- Smith, V. H. (1993). Applicability of resource-ratio theory to microbial ecology. *Limnol. Oceanogr.* 38: 239-249.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. (1980). *Introducción a la Bioestadística*. Ed. Reverté S. A. Barcelona.
- Sommer, U.; Z. Gliwicz; W. Lampert and A. Duncan. (1986). The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. Hydrobiol.* 106: 433-471.
- Sommer, U. (1988a). Does nutrient competition among phytoplankton occur in situ. *Verh. Internat. Verein Limnol.* 23: 707-712.
- Sommer, U. (1988b). Some size relationships in phytoflagellate motility. *Hydrobiologia.* 161: 125-131.
- Søndegaard, M.; B. Riemann; L. Moller Jensen; N. O. G. Jorgensen; P. K. Bjornsen; M. Olesen; S. B. Larsen; O. Geertz-Hensen; J. Hansen; K. Christoffersen; A. M. Jespersen, F. Andersen and S. Bosselmann. (1988). Pelagic food web processes in an oligotrophic lake. *Hydrobiologia.* 164: 271-286.
- Sorokin, Y. I. (1970). Interrelation between sulphur and carbon turnover in meromictic lakes. *Arch. Hydrobiol.* 66: 391-446.
- Sorokin, J. I. and N. Donato. (1975). On the carbon and sulphur metabolism in the meromictic Lake Faro (Sicily). *Hydrobiologia.* 47: 241-252.
- Sorokin, Y. I.; P. Y. Sorokin; V. A. Avdeen; D. Y. Sorokin and S. V. Ilchenko. (1995). Biomass, production and activity of bacteria in the Black Sea, with special reference to chemosynthesis and the sulfur cycle. *Hydrobiologia.* 308: 61-76.

- Spencer, C. N. and D. L. King. (1989). Role of light, carbon dioxide and nitrogen in regulation of buoyancy, growth and bloom formation of *Anabaena flos-aquae*. J. Plankton Res. 11: 283-296.
- Stal, L. J. and Krumbein, W. E. (1984a). Isolation and characterization of cyanobacteria from a marine microbial mat. Bot. Mar. 28: 351-365.
- Stal, L. J. and W. E. Krumbein. (1984b) Metabolism of cyanobacteria in anaerobic marine sediments. Deuxième Colloque International de Bactériologie Marine. Brest. Actes des Colloques, 3: 301-309.
- Stal, L. J.; H. Van Gernerden and W. E. Krumbein. (1984). The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. J. Microbiol. Methods. 2: 295-306.
- Stal, L. S.; H. Van Gernerden and W. E. Krumbein. (1985). Structure and development of a benthic marine microbial mat. FEMS Microbiol. Ecol. 31: 111-125.
- Stal, L. J.; H. Heyer; S. Bekker; M. Villbrandt and W. E. Krumbein. (1989). Aerobic-anaerobic metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limosa*. In Cohen, Y. and E. Rosenberg (Ed.). Microbial Mats: Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities. ASM, Washington DC. 255-276.
- Staley, J. T.; M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt (Eds) (1989) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 3. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Staufert, R. E. (1987). Vertical nutrient transport and its effects on epilimnetic phosphorus in four calcareous lakes. Hydrobiologia. 154: 87-101.
- Stemann Nielsen, E. (1952). The use of radioactive carbon for measuring organic production in the sea. J. Cons., Cons. Int. Explor. Mer. 18: 117-140.
- Steenbergen, C. L. M. and H. J. Korthals. (1982). Distribution of phototrophic microorganisms in the anaerobic and microaerophilic strata of Lake Vechten (The Netherlands). Pigment analysis and role in primary production. Limnol. Oceanogr. 27: 883-895.
- Steenbergen, C. L. M.; H. J. Korthals and M. Van Nes. (1987). Ecological observations on phototrophic sulfur bacteria and the role of these bacteria in the sulfur cycle of monomictic Lake Vechten (The Netherlands). Acta Acad. Aboensis. 47: 97-115.

Steenbergen, C. L. M.; H. J. Korthals; A. L. Baker and C. J. Watras. (1989). Microscale vertical distribution of algal and bacterial plankton in Lake Vechten (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.* 2: 209-220.

Steenbergen, C. L. M. and Van Den Hoven, P. (1990). A note on the measurement of production of phototrophic bacteria in deep layers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 34: 349-355.

Stewart, W. D. P. and H. W. Pearson. (1970). Effects of aerobic and anaerobic conditions on growth and metabolism of blue-green algae. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 175: 293-311.

Stolte, W. and R. Riegman. (1996). The relative preference index (RPI) for phytoplankton nitrogen use is only weakly related to physiological preference. *J. Plankton Res.* 18: 1041-1045.

Stolz, J. F. (1983). Fine structure of the stratified microbial community at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. I. Methods of *in situ* study of the laminated sediments. *Precambrian Res.* 20: 479-492.

Stolz, J. F. (1990). Distribution of phototrophic microbes in the flat laminated microbial mat at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico. *Biosystems.* 23: 345-357.

Strickland, J. P. M. and T. R. Parsons. (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Bd. Can. Bull.* 167: 310 p.

Sundh, I. (1989). Characterization of phytoplankton extracellular products (PDOC) and their subsequent uptake by heterotrophic organisms in a mesotrophic forest lake. *J. Plankton Res.* 11: 463-486.

Sundh, I. (1992a). Biochemical composition of dissolved organic carbon released from natural communities of lake phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.* 125: 347-369.

Sundh, I. (1992b). Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2938-2947.

Sundh, I. and R. T. Bell. (1992). Extracellular dissolved organic carbon released from phytoplankton as a source of carbon for heterotrophic bacteria in lakes of different humic content. *Hydrobiologia.* 229: 93-106.

Takahashi, M. and K. S. Ichimura. (1968). Vertical distribution and organic matter production of photosynthetic sulfur bacteria in Japanese lakes. *Limnol. Oceanogr.* 13: 644-655.

- Takahashi, M. and K. S. Ichimura. (1970). Photosynthetic properties and growth of photosynthetic sulfur bacteria in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 15: 929-944.
- Talling, J. F. (1984). Past and contemporary trends and attitudes in work on primary productivity. *J. Plankton Res.* 6: 203-218.
- Taylor, P.A. and P. J. LeB. Williams. (1975) Theoretical studies on the coexistence of competing species under continuous flow conditions. *Can. J. Microbiol.* 21: 90-98.
- Thiel, T.; J. Bramble and S. Rogers. (1989). Optimum conditions for growth of cyanobacteria on solid media. *FEMS Microbiol. Lett.* 61: 27-32.
- Tilman, D. (1977) Resource competition between planktonic algae: an experimental and theoretical approach. *Ecology* 58: 338-348.
- Tilman, D. (1982). Resource competition and community structure. Princeton Univ. Press. Princeton. 296 pp.
- Tilman, D.; R. Kiesking; R. Sterner; S. S. Kilham and F. A. Johnson. (1986). Green, bluegreen and diatom algae: taxonomic difference in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Arch. Hydrobiol.* 106: 473-485.
- Tilzer, M. M. (1988). Secchi disk-chlorophyll relationships in a lake with highly variable phytoplankton biomass. *Hydrobiologia.* 162: 163-171.
- Tilzer, M. M. (1989). Distinction between light mediated and light-independent variations in phytoplankton production rates. *Hydrobiologia.* 173: 135-140.
- Torrella, F.; R. Guerrero and R. J. Seidler (1978) Further taxonomic characterization of the genus *Bdellovibrio*. *Can. J. Microbiol.* 24: 1387-1394.
- Tranvik, L.J.; K. G. Porter and J. McN. Sieburth. (1989) Occurrence of bacterivory in *Cryptomonas*, a common freshwater phytoplankter. *Oecologia.* 78: 473-476.
- Trüper, H. G. and C. S. Yentsch. (1967) Use of glass filters for the rapid preparation of in vivo absorption spectra of photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.* 94: 1255-1256.
- Tulonen, T.; K. Salonen and L. Arvola. (1992). Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake. *Hydrobiologia.* 229: 239-252.

Tyler, P. A. (1992). A Lakeland from the Dreamtime. *Brit. Phycol. J.* 27: 353-368.

Utermöhl, H. (1958). Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplanktonmethodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.* 9: 38 p.

Utkilen, H. C.; O. M. Skulberg and A. E. Walsby. (1985a). Buoyancy regulation and chromatic adaptation in planktonic *Oscillatoria* species: alternative strategies for optimising light absorption in stratified lakes. *Arch. Hydrobiol.* 104: 407-417.

Utkilen, H. C.; R. L. Oliver and A. E. Walsby. (1985b). Buoyancy regulation in a red *Oscillatoria* unable to collapse gas vacuoles by turgor pressure. *Arch. Hydrobiol.* 102.

Van Den Ende, F. P.; A. M. Laverman and H. Van Gemerden.(1996) Coexistence of aerobic chemotrophic and anaerobic phototrophic sulfur bacteria under oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19: 141.

Van Der Oost, J.; B. A. Bulthuis; S. Fetiz; K. Krab and R. Kraayenhof. (1989). Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822. *Arch. Microbiol.* 152: 415-419.

Van Gemerden, H. (1968a). On the ATP generation by *Chromatium* in darkness. *Arch. Microbiol.* 64: 118-124.

Van Gemerden, H. (1968b). Utilization of reducing power in growing cultures of *Chromatium*. *Arch. Microbiol.* 64: 111-117.

Van Gemerden, H. (1974). Coexistence of organisms competing for the same substrate: an example among the purple sulfur bacteria. *Microbial Ecol.* 1: 104-119.

Van Gemerden, H. (1980). Survival of *Chromatium vinosum* at low light intensities. *Arch. Microbiol.* 125: 115-121.

Van Gemerden, H. and H. H. Beeftink. (1983). Ecology of phototrophic bacteria. In: Ormerod, J. G. (Ed.). *The Phototrophic Bacteria: Anaerobic Life In The Light*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 146-185.

Van Gemerden, H. (1984). The sulfide affinity of phototrophic bacteria in relation to the location of elemental sulfur. *Arch. Microbiol.* 149: 289-294.

Van Gemerden, H.; E. Montesinos; J. Mas and R. Guerrero. (1985). Diel cycle of metabolism of phototrophic purple sulfur bacteria in lake Cisó (Spain). *Limnol. Oceanogr.* 30: 932-943.

- Van Gernerden, H and R. De Wit. (1986). Strategies of phototrophic bacteria in sulphide-containing environments. In Herbert, R. A. and G. A. Codd (Ed.). *Microbes in extreme environments* ASM. Academic Press. London. pp. 111-128.
- Van Gernerden, H., R. De Wit; C. S. Tugman and R. A. Herbert. (1989a). Development of mass blooms of *Thiocapsa roseopersicina* on sheltered beaches on the Orkney Islands. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 111-118.
- Van Gernerden, H., C. S. Tugman; R. De Wit and R. A. Herbert. (1989b). Laminated microbial ecosystems on sheltered beaches in scapa flow, Orkney Islands. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 87-102.
- Van Gernerden, H. and J. Mas. (1995). Ecology of phototrophic sulfur bacteria. In: "Anoxygenic photosynthetic bacteria". Blankenship, R. E.; M. T. Madigan and C. E. Baver (Eds.). Kluwer Acad. Publ.
- Van Rijn, J. and Y. Cohen. (1983). Ecophysiology of the cyanobacterium *Dactylococcopsis salina*: effects of light intensity, sulphide and temperature. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1849-1856.
- Van Rijn, J. and M. Shilo. (1985). Carbohydrate fluctuations, gas vacuolation, and vertical migration of scum-forming cyanobacteria in fishponds. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1219-1228.
- Van Rijn, J. and M. Shilo. (1986). Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp) and its effect on macromolecular synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 340-344.
- Varon, M.; M. Fine and A. Stein. (1984). The maintenance of *Bdellovibrio* at low prey density. *Microbial Ecol.* 10: 95-98.
- Veldhuis, M. J. W. and H. Van Gernerden. (1986). Competition between purple and brown phototrophic bacteria in stratified lakes: sulfide, acetate, and light as limiting factors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 31-38.
- Veldkamp, H.; H. Van Gernerden; W. Harder and H. J. Laanbroek. (1984). Competition among bacteria: an overview. In: Klug, M. J. and C. A. Reddy (Ed.). *Current Perspectives in Microbial Ecology*. ASM. Washington, D.C. 279-290.
- Venkateswaran, K., A. Shimada; A. Maruyama; T. Higashihara; H. Sakov and T. Maruyama. (1993). Microbial characteristics of Palau Jellyfish Lake. *Can. J. Microbiol.* 39: 506-512.

Vicente, E. and M. R. Miracle. (1984) Distribution of photosynthetic organisms in a temporal stratified karstic pond near Cuenca, Spain. Verh. Internat. Verein. Limnol. 22: 1704-1710.

Vicente, E. and M. R. Miracle. (1988a). Estructura y función de los procariotas en dos ecosistemas lagunales costeros: la Albufera de Valencia y el Estany de Cullera. Actas del Congreso de Biología Ambiental (II Congreso Mundial Vasco). Vol. I: pp.79-107.

Vicente, E. and M. R. Miracle. (1988b) Physicochemical and microbial stratification in a meromictic karstic lake of Spain. Verh. Internat. Verein. Limnol. 23: 522-529.

Vicente, E.; M. A. Rodrigo; A. Camacho and M. R. Miracle. (1991). Phototrophic prokaryotes in a karstic sulphate lake. Verh. Internat. Verein. Limnol. 24: 998-1004.

Vicente, E.; A. Camacho and M. A. Rodrigo. (1993). Morphometry and physico-chemistry of the crenogenic meromictic lake El Tobar (Spain). Verh. Internat. Verein. Limnol. 25: 698-704.

Vila, X. and C. A. Abellà. (1994). Effects of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. Photosynth. Res. 41: 53-65.

Vila, X. (1996). Ecologia microbiana de poblacions de bacteris fototròfics en el plàncton lacustre: la distribució espectral de la llum en la selecció entre espècies de diferent composició pigmentària Ph. D. Thesis. Universitat de Girona.

Vila, X.; M. Dokulil; L. J. García-Gil; C. A. Abellà; C. M. Borrego and C. Bañeras. (1996). Composition and distribution of phototrophic bacterioplankton in the deep communities of several central european lakes: the role of light quality. Arch. Hydrobiol. Advanc. Limnol. 48: 183-196.

Villareal, T. A. and E. J. Carpenter. (1990). Diel buoyancy regulation in the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. Limnol. Oceanogr. 35: 1832-1837.

Viner, A. B. (1989). Buoyancy regulation and vertical distribution of *Anabaena spiroides* in lake Okaro (New Zealand). Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 32: 221-238.

Visscher, P. T.; J. N. Nijburg and H. Van Gemerden. (1990). Polysulfide utilization by *Thiocapsa roseopersicina*. Arch. Microbiol. 155: 75-81.

- Visscher, P. T. and H. Van Gernerden. (1991a). Photo-autotrophic growth of *Thiocapsa roseopersicina* on dimethyl sulfide. FEMS Microbiol. Lett. 81: 247-250.
- Visscher, P. T. and H. Van Gernerden. (1991b). Production and consumption of dimethylsufoniopropionate in marine microbial mats. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3237-3242.
- Visser, P. M.; B. W. Ibelings and L. R. Mur. (1995). Autumnal sedimentation of *Microcystis* spp. as result of an increase in carbohydrate ballast at reduced temperature. J. Plankton Res. 17: 919-934.
- Volkman, J. K.; H. R. Burton; D. A. Everitt and D. I. Allen. (1988). Pigment and lipid compositions of algal and bacterial communities in Ace Lake, Vestfold Hills, Antarctica. Hydrobiologia. 165: 41-57.
- Vollenweider, R. A. (1974). A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook. Blackwell. Oxford. N° 12.
- Vrba, J.; V. Vyhnálek; J. Hejzlar and J. Nedoma. (1995). Comparison of phosphorus deficiency indices during a spring phytoplankton bloom in a eutrophic reservoir. Freshwater Biol. 33: 73-82.
- Vyverman, W. and P. Tyler. (1995). Fine layer zonation and shor-term changes of microbial communities in two coastal meromictic lakes (Madang Province, Papua, New Guinea). Arch. Hydrobiol. 132: 385-406.
- Walsby, A. E.; J. Van Rijn and Y. Cohen. (1983a). The biology of a new gas-vacuolate cyanobacterium, *Dactylococcopsis salina* sp. nov., in Solar Lake. Proc. Roy. Soc. London B. 217: 417-447.
- Walsby, A. E.; H. C. Utkilen and I. J. Johnsen. (1983b). Buoyancy chages of a red coloured *Oscillatoria agardhii* in lake Gjersjoen, Norway. Arch. Hydrobiol. 97: 18-38.
- Walsby, A. E. (1987). Mechanisms of buoyancy regulations by planktonic cyanobacteria with gas vesicles. In Fay, P. and C. Van Baalen (Ed.). The Cyanobacteria. Elsevier. Amsterdam. 377-390.
- Walsby, A. E. (1988). Buoyancy in relation to the ecology of the freshwater phytoplankton. In F. E. Round (Ed.). Algae and the Aquatic Environment. Biopress. Bristol. 125-137.
- Walsby, A. E.; C. S. Reynolds; R. Oliver and J. Krompkamp. (1989). The role of gas vacuoles and carbohydrate content in the buoyancy and vertical distribution

of *Anabaena minutissima* in lake Rotongaio, New Zealand. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 32: 1-25.

Walsby, A. E.; R. Kinsman; B. W. Ibelings and C. S. Reynolds. (1991). Highly buoyant colonies of the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii* form persistent surface waterblooms. Arch. Hydrobiol. 121: 261-280.

Walsby, A. E. (1994). Gas vesicles. Microbiol. Rev. 58: 94-144.

Walsby, A. E., P. K. Hayes and R. Bose. (1995). The gas vesicles, buoyancy and vertical distribution of cyanobacteria in the Baltic Sea. Eur. J. Phycol. 30: 87-94.

Wang, L. and J. C. Priscu. (1994). Stimulation of aquatic bacterial activity by cyanobacteria. Hydrobiologia. 277: 145-158.

Ward, P. R. B.; K. J. Hall; T. G. Northcote; W. Cheung and T. Murphy. (1990). Autumnal mixing in Mahoney lake, British Columbia. Hydrobiologia. 197: 129-138.

Warming, E. (1875). Om nogle ved danmarks dyster levende bakterier. Videnskabelige Meddelelser Kopenhagen. 20-28: 3-116.

Watanabe, M.; K. Kohata and T. Kimura. (1991). Diel vertical migration and nocturnal uptake of nutrients by *Chattonella antiqua* under stable stratification. Limnol. Oceanogr. 36: 593-602.

Waterbury, J. B.; J. M. Willey; D. G. Franks; F. M. Valois and S. W. Watson. (1985). A cyanobacterium capable of swimming motility. Science. 23 74-76.

Webb, D. J.; B. K. Burnison, A. M. Triembee and E. E. Prepas. (1992). Comparison of chlorophyll *a* extractions with ethanol and dimethyl sulfoxide/acetone, and a concern about spectrophotometric phaeopigment correction. Can. J. Fisheries Aquat. Sci. 49: 2331-2336.

Wetzel, R. G. (1973). Productivity investigations of interconnected marl lakes (I). The eight lakes of the Oliver and Walters Chains, Northeastern Indiana. Hydrobiol Stud. 3: 91-143.

Wetzel, R. G. and G. E. Likens. (1979). Limnological analyses. W. B. Saunders Co. Philadelphia.

Whitton, B. A. (1992). Diversity ecology and taxonomy of the Cyanobacteria. In: Mann, N. H. and N. G. Carr (Ed.). Photosynthetic Prokaryotes. Plenum Press. New York. 1-51.

Wiggins, B. A. and M. Alexander. (1985). Minimum bacterial density for bacteriophage replication: Implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 19-23.

Wilcox, L. W. and G. J. Wedemayer. (1991). Phagotrophy in the freshwater photosynthetic dinoflagellate *Amphidinium cryophilum*. *J. Phycol.* 27: 600-609.

Wilhem, C. and L. Manns. (1991). Changes in pigmentation of phytoplankton species during growth and stationary phase- Consequences for reliability of pigment-based methods of biomass determination. *J. Appl. Phycol.* 3: 305-310.

Yagi, A.; S. Miyachi and H. Terai. (1991). Vertical distribution of purple nonsulphur bacteria and their utilization of dissolved organic carbon in Lake Fukami-ike. *Arch. Hydrobiol.* 121: 307-317.

Zaiss, U. (1984). Acetate, a key intermediate in the metabolism of anaerobic sediments containing sulfate. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 19: 215-223.

Zimmermann, R. and L. A. Meyer-Reil. (1974). A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kieler Meeresforsch.* 30: 24-27.

APÉNDICE

Este apéndice únicamente recoge los datos correspondientes a las muestras de la Laguna de Arcas en los que se determinaron todos los parámetros incluidos en el análisis de componentes principales recogido en el capítulo 4, sin englobar el resto de muestras tomadas en la laguna a lo largo de los diversos muestreos, en las que se carecía de algunos de esos parámetros.

Precedida (m)	O. ornata (f/m)	Cyprina (f/m)	Theraps (f/m)	Amoebae (f/m)	Palaemon (f/m)	C. ventral (f/m)	Peronella (f/m)	O. ornata (f/m)	Cher. s (f/m)	Cher. e (f/m)	Bider s (f/m)	NH ₄ ⁺ (f/m)	NO ₂ (f/m)	NO ₃ (f/m)	N org total (f/m)	P total (f/m)	SiO ₂ (f/m)	Sulfidico (f/m)	Alcalinidad (f/m)	Oxígeno (f/m)	Saturación O ₂ (%)	Temperatura (°C)	Conductividad (f/m)	pH	Ek (f/m)	Lim (f/m)
0.5	1.7	11	0	0	0	0	0	266	3.4	2.3	0	6.2	18	0.039	78	0.03	222	0	3.05	5.2	37	16.2	2.6	7.7	2.3	6.0
4	2.36	21	0	0	0	0	0	214	4.66	2.1	0	6.7	17	0.037	77	0.03	222	0	3.1	4.8	32	15.8	2.6	7.61	196	9.1
8	1.42	39	0	0	0	0	0	235	3.55	2.7	0	6.5	16	0.029	76	0.044	222	0	3.085	4.4	48	15.7	2.6	7.38	198	1.5
9	3.12	34	0	0	0	0	0	256	2.69	2.8	0	6.7	10	0.029	70	0.03	219	0	3.2	4.4	48	15.7	2.6	7.31	5.1	10
10	3.68	91	0	0	0	0	0	260	3.23	3.1	0	6.8	3	0.01	65	0.033	237	0	3.2	3.7	40	15.7	2.6	7.21	2.1	6.4
10.5	6.23	273	4.48E+03	1.13E+04	2.82E+04	12.3	8.33	236	7	21.5	0	7.0	3	0.013	63	0.044	239	0	3.2	3.1	22	15.4	2.6	7.4	-1.7	5
10.75	3.49	330	2.84E+04	3.84E+03	1.66E+04	18	0.3	262	12.2	37.6	1.3	17.4	1	0.021	171	0.033	228	0	3.425	2	22	15.4	2.6	7.25	-20	4
10.9	1.59	1913	2.03E+04	2.56E+04	4.29E+04	15.5	1.7	296	21.3	93.2	10.8	34.3	0.5	0.01	341	0.033	226	0	3.5	1.8	20	15.4	2.6	7.2	-7.3	3.8
11	683.32	1600	1.92E+04	6.91E+04	4.29E+04	19.3	1.8	301	119.8	80	67.3	62.5	0.03	0.04	623	0.066	237	0	3.6	1.6	18	13.8	2.8	7.04	-103	2.6
11.1	843.4	1311	1.12E+04	6.31E+04	2.01E+05	15	1.646	288	123.2	66.7	64.3	63	0.03	0.01	640	0.03	237	92	3.645	0.1	13	13.8	2.8	7.01	-128	1.95
11.2	733.59	303	2.19E+04	2.34E+04	4.36E+05	12	7.04	288	137.4	31.6	45.7	69.7	0.03	0.01	680	0.117	273	112.2	4.3	0	13	12.5	2.82	6.99	-146	1.4
11.3	886.62	250	2.19E+04	1.13E+05	1.56E+05	10.5	10.66	288	123.3	30.6	45.8	70.2	0.03	0.01	700	0.143	305	133.3	5.1	0	12.5	12.5	2.84	6.99	-147	1
11.4	700.46	101	1.41E+04	2.94E+04	1.46E+04	10.3	13.33	273	123.2	26.7	43.7	75.9	0.03	0.01	720	0.149	364	240.1	6.3	0	12	11.7	2.86	6.99	-147	0.5
11.5	973.04	101	1.41E+04	3.50E+04	1.46E+04	10.3	10.33	298	123.3	23.1	31.2	75.9	0.03	0.01	750	0.149	404	291.9	7.61	0	11.9	11.7	2.91	6.98	-148	0.115
11.7	840.56	73	2.92E+04	3.46E+04	1.45E+05	7.5	15.44	310	115.6	23.1	29.8	78.1	0.03	0.01	760	0.5	421	282.0	7.61	0	11.7	11.6	2.93	6.98	-149	0.115
12	912.2	66	2.92E+05	3.46E+04	1.91E+05	11	15.44	310	113	21.4	29.8	78.1	0.03	0.01	770	1.1	445	326.2	7.73	0	11.5	11.5	2.95	6.98	-150	0
12.5	917.84	60	9.47E+04	1.19E+05	2.30E+05	10.5	15.9	304	109.5	20.9	33.2	78.6	0.03	0.01	770	1.2	444	300.0	7.8	0	11.5	11.5	2.98	6.97	-154	0
13	636.1	37	6.00E+04	1.01E+05	2.00E+05	6	13	331	103	20	31.8	78.6	0.03	0.01	774	0	437	254.4	7.9	0	11.5	11.5	2.98	6.97	-154	0
13.75	286.48	52	3.84E+04	1.13E+04	1.68E+05	4	9.9	326	85.5	19.7	28.9	90.3	0.03	0.01	903	2	614	300.4	8.03	0	11.1	11.1	2.98	6.95	-154	0

Precedida (m)	O. ornata (f/m)	Cyprina (f/m)	Theraps (f/m)	Amoebae (f/m)	Palaemon (f/m)	C. ventral (f/m)	Peronella (f/m)	O. ornata (f/m)	Cher. s (f/m)	Cher. e (f/m)	Bider s (f/m)	NH ₄ ⁺ (f/m)	NO ₂ (f/m)	NO ₃ (f/m)	N org total (f/m)	P total (f/m)	SiO ₂ (f/m)	Sulfidico (f/m)	Alcalinidad (f/m)	Oxígeno (f/m)	Saturación O ₂ (%)	Temperatura (°C)	Conductividad (f/m)	pH	Ek (f/m)	Lim (f/m)
0.5	0.189	33	0	0	0	0	0	283	3.2	1.2	0	36.24	21	0.016	37	0.03	212	0	3.305	7.2	73	13	2.76	7.8	220	7.0
1.5	0.162	80	0	0	0	0	0	169	3.1	1.3	0	42.76	21.2	0.098	63	0.03	221	0	3.1	7	72	13	2.79	7.8	220	8.9
8	0.139	68	0	0	0	0	0	236	3.6	1.7	0	39.42	21.6	0.049	60	0.03	213	0	3.085	7	72	13.9	2.79	7.8	220	10.3
11	1.176	61	0	0	0	0	0	252	3.1	1.3	0	39.1	20	0.038	60	0.03	214	0	3.2	7	72	12.9	2.79	7.8	220	3.1

Precedida (m)	O. ornata (f/m)	Cyprina (f/m)	Theraps (f/m)	Amoebae (f/m)	Palaemon (f/m)	C. ventral (f/m)	Peronella (f/m)	O. ornata (f/m)	Cher. s (f/m)	Cher. e (f/m)	Bider s (f/m)	NH ₄ ⁺ (f/m)	NO ₂ (f/m)	NO ₃ (f/m)	N org total (f/m)	P total (f/m)	SiO ₂ (f/m)	Sulfidico (f/m)	Alcalinidad (f/m)	Oxígeno (f/m)	Saturación O ₂ (%)	Temperatura (°C)	Conductividad (f/m)	pH	Ek (f/m)	Lim (f/m)
0.5	0.28	52	0	0	0	0	0	314	2.9	0.98	0	36	24.8	0.016	61	0.03	213	0	3.305	9.1	89	10.3	2.77	7.9	245	6.0
1.5	0.32	91	0	0	0	0	0	278	2.7	1.2	0	42	22.2	0.098	67	0.03	217	0	3.1	9	87	10	2.77	7.9	245	110
8	0.17	6	0	0	0	0	0	240	2.8	1.1	0	40	24.7	0.049	66	0.03	216	0	3.085	8.9	86	10	2.77	7.9	245	11
12	0.095	60	0	0	0	0	0	79	2.9	1.2	0	39	24.6	0.038	64	0.03	214	0	3.2	8.8	86	10	2.77	7.9	245	2.93
14.25	0.284	58	0	0	0	0	0	369	3.1	1.3	0	40	24.7	0.007	65	0.03	214	0	3.2	8.8	86	10	2.77	7.9	245	0.79

Precedida (m)	O. ornata (f/m)	Cyprina (f/m)	Theraps (f/m)	Amoebae (f/m)	Palaemon (f/m)	C. ventral (f/m)	Peronella (f/m)	O. ornata (f/m)	Cher. s (f/m)	Cher. e (f/m)	Bider s (f/m)	NH ₄ ⁺ (f/m)	NO ₂ (f/m)	NO ₃ (f/m)	N org total (f/m)	P total (f/m)	SiO ₂ (f/m)	Sulfidico (f/m)	Alcalinidad (f/m)	Oxígeno (f/m)	Saturación O ₂ (%)	Temperatura (°C)	Conductividad (f/m)	pH	Ek (f/m)	Lim (f/m)
0.5	0.28	52	0	0	0	0	0	314	2.9	0.98	0	36	24.8	0.016	61	0.03	213	0	3.305	9.1	89	10.3	2.77	7.9	245	6.0
1.5	0.32	91	0	0	0	0	0	278	2.7	1.2	0	42	22.2	0.098	67	0.03	217	0	3.1	9	87	10	2.77	7.9	245	110
8	0.17	6	0	0	0	0	0	240	2.8	1.1	0	40	24.7	0.049	66	0.03	216	0	3.085	8.9	86	10	2.77	7.9	245	11
12	0.095	60	0	0	0	0	0	79	2.9	1.2	0	39	24.6	0.038	64	0.03	214	0	3.2	8.8	86	10	2.77	7.9	245	2.93
14.25	0.284	58	0	0	0	0	0	369	3.1	1.3	0	40	24.7	0.007	65	0.03	214	0	3.2	8.8	86	10	2.77	7.9	245	0.79

Predefined (m)	17/1/90	Cryptomonas	Thalassiosira	Amoebae	Pseudothrix	C. wittii	Percentile col. on dir.	Percentile Infraction	O. ornata Long-Media	Chlor. a	Chlor. e	Bacter. a	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	N inorg total	P. stable	SiO ₂	Sulfuride	Alc. oxid	Oxygen	Sat. O ₂	Temperature	Conductivity	pH	EA	Lea
(m)	(fM)	cell/ml	cell/ml	cell/ml	cell/ml	cell/ml	cell/ml	cell/ml	cell/ml	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(mg/l)	(mg/l)	(%)	(°C)	(µm/cm)	(pH)	(mV)	(µM/l)
0.1	0.19	70	0	0	0	0	0	0	190	3.2	0.64	0	45.06	27.14	0.416	71	0.03	215	0	3.01	9.5	84	6.1	2.18	7.75	113	110
0.5	0.19	87	0	0	0	0	0	0	363	3.15	0.6	47.95	21.91	0.198	74	0.03	214	0	3.71	9.2	81	6.1	2.18	7.75	113	100	
1	0.07	77	0	0	0	0	0	0	100	2.45	0.43	43.94	27.16	0.149	72	0.03	214	0	2.91	9.1	80	6.2	2.18	7.75	113	75	
3	0.094	64	0	0	0	0	0	0	262	2.93	0.52	43.42	28.92	0.118	73	0.03	215	0	2.91	9	72	6.1	2.19	7.8	115	102	
12	0.094	113	0	0	0	0	0	0	21	3.28	0.57	48.11	26.5	0.077	75	0.03	215	0	2.81	8.9	78	6	2.19	7.78	113	125	
FFCTIA 14/2/90																											
0.5	0	71	0	0	0	0	0	0	150	2.49	1.22	0	87.65	28.91	0.393	117	0.03	213	0	3.01	9.9	91	8.2	2.12	7.91	110	100
3	0.19	92	0	0	0	0	0	0	119	2.33	1.57	0	69.02	30.34	0.888	100	0.03	212	0	3.71	9.7	82	7.1	2.15	7.88	116	65
7.5	0.094	90	0	0	0	0	0	0	202	3.04	1.84	0	71.53	29.54	0.765	102	0.03	213	0	2.91	9.5	86	7	2.54	7.84	110	62
9.5	0.094	103	0	0	0	0	0	0	183	3.16	1.5	0	80.95	28.65	0.786	110	0.03	214	0	2.91	9.1	84	6.9	2.54	7.84	110	62
12	0.76	120	0	0	0	0	0	0	217	3.61	1.7	0	74.67	29.15	0.705	105	0.03	214	0	2.81	8.7	79	6.9	2.54	7.82	108	8%
14	0.93	131	0	0	0	0	0	0	175	5.62	2.41	0	79.49	27.18	0.931	107	0.03	215	0	2.83	7.1	65	6.9	2.54	7.74	104	6.13
FFCTIA 11/2/90																											
0.5	0	97	0	0	0	0	0	0	30	1.96	0.19	0	60	28	0.393	89	0.03	215	0	3.01	9.8	93	10.4	2.5	7.72	129	100
4.5	0.19	49	0	0	0	0	0	0	50	2.32	0.36	0	60	27	0.888	88	0.03	215	0	3.71	9.6	88	8.1	2.5	7.79	101	59
9.5	0.28	167	0	0	0	0	0	0	262	3.66	0.43	0	60	24	0.765	85	0.03	215	0	2.91	8.2	71	7.2	2.5	7.75	108	4.3
11	1.23	210	0	0	0	0	0	0	179	3.39	0.31	0	60	10	0.786	71	0.03	215	0	2.91	6.2	55	7.1	2.5	7.64	112	2.19
12	2.84	353	0	0	0	0	0	0	166	4.37	0.71	0	60	8	0.705	69	0.03	215	0	2.81	4.9	43	7.2	2.5	7.56	111	1.1
12.5	11.03	162	0	0	0	0	0	0	197	3.72	0.32	0	71	1	0.931	73	0.03	220	0	3	0.3	3	7.2	2.5	*42	258	0%
13	31.47	157	0	0	0	0	0	0	201	4.43	0.74	1.56	79	0.5	0.1	80	0.2	225	10	3.2	0.1	1	7.2	2.5	*15	246	0.43
13.5	32.09	354	0	0	0	0	0	0	206	4.83	1.06	2.68	90	0.03	0.1	90	0.23	230	100	4	0	3	7.2	2.32	*3	165	0.19
14	51.37	476	0	0	0	0	0	0	215	4.68	0.83	4	99	0.03	0.1	99	0.3	235	200	4.5	0	0	7.2	2.32	*29	145	0.08
FFCTIA 10/3/90																											
0.5	0	90	0	0	0	0	0	0	37	3.16	1.32	0	50.5	26.2	0.393	77	0.03	221	0	3.01	10.5	96	8.6	2.4*	8	130	210
8.5	0.76	131	0	0	0	0	0	0	174	4.04	1.51	0	49.6	26.3	0.888	77	0.03	219	0	3.71	10.4	84	8.1	2.5	8	130	15
12	2.75	145	0	0	0	0	0	0	257	5.36	2	0	50.1	26	0.786	77	0.03	222	0	2.91	9.6	85	7.4	2.55	7.9	130	2.5
14	2.38	132	0	0	0	0	0	0	224	6.35	2.11	0	50.3	26.1	0.705	77	0.03	223	0	2.81	8.6	76	7.4	2.52	7.9	130	1.05
FFCTIA 23/3/90																											
0.5	0	62	0	0	0	0	0	0	130	2.74	0.54	0	35.97	26.74	0.344	63	0.03	224	0	3.01	10.2	103	12.3	2.4*	8.03	187	17
3.5	0	75	0	0	0	0	0	0	150	3.98	0.84	0	32.28	25.09	0.174	78	0.03	219	0	3.71	11	107	10.2	2.48	8.03	183	19
8	0.38	117	0	0	0	0	0	0	174	5.32	1.24	0	66.91	25.32	0.188	93	0.072	249	0	2.91	9	82	7.8	2.52	*82	183	1.15
10	0.76	103	0	0	0	0	0	0	66	6.37	1.29	0	70.86	21.81	0.361	93	0.037	240	0	2.91	6.2	56	7.4	2.52	*15	211	0.17

Predefined (m)	Crypsinase (µM)	Thymop (red)	Amantadine (red)	Penicillin (red)	C. violid (red)	Penicillin (red, m. dir.)	Penicillin (red, m. dir.)	D. oxalis (red)	Chlor. s (µg/L)	Chlor. s (µg/L)	Bitter (µg/L)	NO ₂ (µM)	NO ₃ (µM)	Alkaloid (mg/L)	Oxygen (mg/L)	Saturation O ₂ (%)	Temperature (°C)	Conductivity (µS/cm)	pH	Ex (mS)	Lat (µE/ml)				
10	0.76	103	0	0	0	0	0	65	6.27	1.29	0	70.86	21.81	0.261	55	0.057	240	0	2.91	6.7	7.7	2.52	7.32	217	0.17*
11	2.84	131	0	0	0	0	0	123	3.39	1.38	0	82.63	21.44	0.2739	164	0.031	227	0	2.81	4.3	41	2.53	7.5	200	0.07
12	3.02	119	0	0	0	0	0	169	3.84	1.33	0	84.9	20.7	0.2031	108	0.032	255	0	3	3.1	28	2.53	7.46	159	0
12.75	14.2	228	0	0	0	0	0	128	6.62	1.39	0.45	94.86	17.88	0.2272	113	0.052	258	0	3.2	3.7	16	2.53	7.42	100	0
13	21.01	287	0	0	0	0	0	184	7.23	1.39	1.15	84.24	13.39	0.2146	113	0.036	262	0	3.5	0.4	4	2.53	7.35	90	0
13.3	0.47	110	0	0	0	0	0	186	7.3	1.51	0.4	93.35	18.49	0.2182	112	0.049	225	0	4	0.2	2	2.53	7.3	80	0
14	10.1	65	1.79E+03	3.39E+03	0	2.59E+04	0	181	11.24	3.01	6.78	95.81	14.17	0.6652	112	0.055	234	100	4.1	0	0	2.53	7.29	70	0

Predefined (m)	O ₂ (mM)	Crypsinase (red)	Thymop (red)	Amantadine (red)	Penicillin (red)	C. violid (red)	Penicillin (red, m. dir.)	Penicillin (red, m. dir.)	D. oxalis (red)	Chlor. s (µg/L)	Chlor. s (µg/L)	Bitter (µg/L)	NO ₂ (µM)	NO ₃ (µM)	Alkaloid (mg/L)	Oxygen (mg/L)	Saturation O ₂ (%)	Temperature (°C)	Conductivity (µS/cm)	pH	Ex (mS)	Lat (µE/ml)			
0.5	0	70	0	0	0	0	0	150	3.49	1.35	0	16.9	10.31	0.01	47	0.0318	172	0	3	9.3	92	2.7	8.19	254	190
1.5	0.084	88	0	0	0	0	0	11	3.38	0.91	0	21.8	10.21	0.01	52	0.0477	177	0	3	9.1	94	11.7	8.15	278	33
8	0.084	123	0	0	0	0	0	149	5.21	2.09	0	46.35	27.44	0.0147	74	0.03	190	0	3	8.2	78	9.9	7.99	183	3.5
10	2.18	177	0	0	0	0	0	106	7.24	1.07	0	46.35	21.28	0.01	89	0.06	224	0	3	8.1	16	9.2	8.2	171	1.1
11	3.7	165	0	0	0	0	0	137	7.44	1.04	0	74.76	20.21	0.01	92	0.03	227	0	3	7.1	12	9.5	7.6	173	0.4
11.3	3.69	196	0	0	0	0	0	150	6.7	0.71	0.37	74.76	18.18	0.0126	92	0.03	216	0	3.91	0.5	8	9.5	7.6	178	0.4
11.6	10.44	311	0	0	0	0	0	164	6.38	0.75	0.85	81.1	17.68	0.021	99	0.03	229	0	2.94	0.2	2	9.4	7.63	172	0.2
11.9	10.44	323	0	0	0	0	0	162	8.63	1.92	2.54	89.28	15.12	0.0146	104	0.03	236	0	2.81	0.1	1	9.4	7.67	167	0.11
12.2	26.13	231	0	0	0	0	0	185	11.85	3.74	41.23	93.36	8.8	0.0148	101	0.03	240	33	4	0	0	9.4	7.77	242	0.6*
12.5	71.36	119	0	0	0	0	0	187	16.44	8.93	76.17	103.62	0.47	0.021	102	0.03	254	109	4.2	0	0	9.4	7.56	120	0
13	130.63	99	1.29E+03	1.80E+03	0	1.72E+05	0	197	18.33	9.11	76.7	102.64	0.02	0.042	103	0.03	250	123	5	0	0	9.4	7.52	100	0
13.5	173.79	91	2.12E+03	1.70E+03	0	3.11E+04	0	192	11.86	4	22.37	92.07	0.02	0.0189	92	0.03	244	260	5.2	0	0	9.4	7.51	50	0

Predefined (m)	O ₂ (mM)	Crypsinase (red)	Thymop (red)	Amantadine (red)	Penicillin (red)	C. violid (red)	Penicillin (red, m. dir.)	Penicillin (red, m. dir.)	D. oxalis (red)	Chlor. s (µg/L)	Chlor. s (µg/L)	Bitter (µg/L)	NO ₂ (µM)	NO ₃ (µM)	Alkaloid (mg/L)	Oxygen (mg/L)	Saturation O ₂ (%)	Temperature (°C)	Conductivity (µS/cm)	pH	Ex (mS)	Lat (µE/ml)			
0.5	0	131	0	0	0	0	0	120	4.63	3.22	0	44.11	21.21	0.01	65	0.03	161	0	3.2	9	103	2.11	8.03	272	870
4	0	132	0	0	0	0	0	150	7.28	2.23	0	48.1	19.44	0.01	49	0.036	162	0	3.16	11.4	120	2.12	8.1	279	80
8	0.18	112	0	0	0	0	0	23	7.84	3.4	0	44.35	11.78	0.019	66	0.059	217	0	3.2	6.8	67	2.17	7.86	243	8
8.5	0.47	109	0	0	0	0	0	214	8.45	2.25	0	49.96	18.97	0.01	68	0.059	226	0	3.2	4.9	48	11	7.77	241	6.8
9	3.41	65	2.34E+03	2.14E+03	0	4.27E+03	0	130	7.26	1.42	0.33	76.49	4.51	0.01	81	0.037	253	0	3.92	1.3	11	10.4	7.33	189	3.3
9.2	4.16	248	2.56E+03	4.29E+03	0	4.48E+04	0	172	5.66	0.91	0.37	76.49	4.7	0.01	81	0.045	238	20	3.7	0.2	2	10.4	7.31	107	4.3
9.4	4.17	492	8.54E+03	6.40E+03	0	6.02E+04	0	143	6.04	2.85	8.37	84.32	0.037	0.032	84	0.033	236	66	3.7	0	0	10.2	7.28	731	28
9.6	13.45	293	1.72E+03	2.54E+03	0	6.02E+04	0	118	6.78	2.97	8.04	88.65	0.02	0.01	89	0.037	270	69	3.66	0	0	10.2	7.47	22	3.3
9.8	2.27	346	1.24E+03	1.69E+03	0	4.22E+04	0	118	5.32	1.38	2.35	94.18	0.02	0.01	98	0.032	250	27	3.8	0	0	10.1	7.48	20	2.3
10	49.41	145	2.99E+03	2.97E+03	0	4.18E+04	0	194	6.09	2.63	3.09	94.18	0.02	0.01	98	0.032	250	27	3.8	0	0	10.1	7.48	20	2.3
10.3	70.43	150	3.42E+03	3.19E+03	0	3.50E+04	0	229	8.62	3.55	5.57	98.11	0.02	0.013	98	0.042	240	212	3.8	0	0	10	7.42	48	1.1
11	81.78	166	7.68E+03	9.19E+03	0	2.18E+04	0	191	7.5	2.14	6.79	109.49	0.02	0.017	110	0.032	280	206	3.74	0	0	9.9	7.4	20	0.7
11.3	104.3	183	5.97E+03	2.09E+04	0	2.99E+04	0	217	6.76	2.79	6.86	114.41	0.02	0.014	113	0.048	264	200	4	0	0	9.9	7.4	20	0.42
12	39.07	147	2.14E+03	8.54E+03	0	3.00E+04	0	254	8.62	2.66	4.32	104.47	0.02	0.01	104	0.048	252	193	4.5	0	0	9.9	7.37	24	0.22
12.5	71.36	156	1.39E+03	3.41E+03	0	2.32E+04	0	277	7.8	2.75	4.31	102.23	0.02	0.021	102	0.138	245	195	4.5	0	0	9.9	7.4	24	0.14
13	74.67	134	4.16E+02	1.22E+04	0	2.22E+04	0	226	8.27	3.16	4.31	104.37	0.02	0.055	106	0.085	260	197	5.0	0	0	9.9	7.4	20	0.05
13.5	81.78	150	8.31E+02	7.24E+03	0	4.03E+04	0	239	6.33	2.87	3.2	146.13	0.02	0.023	146	1.57	235	300	5.82	0	0	9.9	7.39	75	0.005
14	139.15	120	5.00E+02	5.00E+03	0	8.32E+03	0	187	16.66	7.64	9.19	861.8	0.02	0.01	862	2.86	439	6	6	0	0	9.9	7	128	0

FCCHA		7/6/20		FCCHA		24/7/20	
Problematika (m)	O. emats (Bibla)	C. emats (Bibla)	Percentaj (rel. m. dir.)	Percentaj (rel. m. dir.)	Percentaj (rel. m. dir.)	Percentaj (rel. m. dir.)	Percentaj (rel. m. dir.)
0.5	0	0	0	0	0	0	0
1	33	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0	0	0
76	0	0	0	0	0	0	0
77	0	0	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	0	0	0	0
83	0	0	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0	0	0
86	0	0	0	0	0	0	0
87	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0	0
91	0	0	0	0	0	0	0
92	0	0	0	0	0	0	0
93	0	0	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0	0
97	0	0	0	0	0	0	0
98	0	0	0	0	0	0	0
99	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0

Prehabilitad (m)	O. omnia (fM)	Cryptosporidium (cell/ml)	Thiospiras (cell/ml)	Amoebae (cell/ml)	Paradictyon (cell/ml)	C. redii (cell/ml)	Percentage col. in dir.	Percentage Infected	O. omnia Long. Media	Chlor. a (µg/l)	Chlor. c (µg/l)	Bacter. a (µg/l)	NH ₄ ⁺ (µM)	NO ₂ ⁻ (µM)	NO ₃ ⁻ (µM)	N urea total (µM)	P. nitro (µM)	SiO ₂ (µM)	Sulfuric (µM)	Alcalinidad (meq/l)	Ozigeno (mg/l)	Saturacion O ₂ (%)	Temperature (°C)	Conductividad (µS/cm)	pH	Es. (mV)	Lim (µS/cm)
0.3	1.14	89	0	0	0.00E+00	0	0	0	264	4.76	1.08	0.97	45.1	13.28	0.029	55	0.044	222	0	3.17	6	68	17.5	2.64	7.63	373	650
0.4	2.27	217	0	0	0.00E+00	0	0	259	5.72	1.36	1.17	20.91	13.17	0.037	34	0.03	219	0	3.18	5.6	63	16.9	2.67	7.69	377	90	
7.5	2.41	382	0	0	0.00E+00	0	0	276	5.77	1.25	2.07	45.46	13.26	0.039	59	0.033	227	0	3.18	3.8	42	16.6	2.67	7.61	381	16	
8.3	6.63	414	0	0	0.00E+00	0	0	216	5.61	1.16	2.3	67.16	12.7	0.039	80	0.044	229	0	3.76	2.4	28	16.6	2.67	7.51	380	10	
9	2.45	275	0	0	0.00E+00	0	0	218	5.41	1.09	2.3	75.73	12.4	0.01	88	0.033	228	0	3.78	1.3	17	16.3	2.67	7.47	344	8	
9.4	4.92	342	0	0	0.00E+00	0	0	322	6.86	1.47	2.82	64.7	8.77	0.013	73	0.03	226	0	3.67	0.3	6	16.4	2.67	7.39	36	8	
9.6	9.09	1093	1.78E+03	1.02E+03	0.00E+00	1.12E+03	18.2	4	272	10.38	2.21	5.1	113.44	0.021	113	0.066	237	0	3.79	0.3	3	16.4	2.67	7.38	47	5.7	
9.8	11.36	972	4.18E+04	2.12E+03	0.00E+00	9.03E+03	17	4	276	8.06	1.18	2.01	94.08	0.02	94	0.03	237	92	3.81	0.1	1	16.4	2.67	7.2	117	4.3	
10	176.38	999	5.76E+04	8.48E+03	0.00E+00	9.44E+03	16	4	289	18.91	2.21	6.84	156.43	0.02	156	0.17	143	305	3.84	0	0	16	2.67	7.2	117	4.3	
10.23	380.32	979	6.07E+04	3.07E+04	0.00E+00	7.30E+04	15	8.3	288	15.32	2.21	6.84	216.67	0.02	217	0.143	305	364	3.84	0	0	15.4	2.69	7.14	142	3.6	
10.75	976.87	307	6.66E+04	1.82E+04	0.00E+00	6.53E+04	14.3	7.84	437.4	3.35	39.25	288.71	0.02	0.01	289	0.115	364	2401	3.99	0	0	14.7	2.71	7.02	137	1.2	
10.75	947.79	327	6.49E+04	3.89E+03	0.00E+00	6.53E+04	17.6	7.84	260	47.73	6.31	47.98	390.32	0.02	0.01	290	0.1	404	2939	4.43	0	0	14.7	2.71	7.02	137	1.2
11	812.98	44	1.78E+04	6.32E+03	0.00E+00	3.38E+04	7.2	4.76	232	4.5	4.7	322.58	0.02	0.01	323	1.5	421	2820	4.78	0	0	13	2.82	7	176	0.11	
11.5	1192.68	15	3.46E+04	3.97E+04	2.30E+02	1.03E+03	7	7.32	251	40.06	5.56	48.03	319.89	0.02	0.01	320	2	445	3000	5.4	0	0	12.1	2.88	7	173	0
12	984.44	19	7.43E+04	1.15E+04	2.20E+02	9.47E+04	9.1	8.11	252	36.23	7.21	62.34	320.43	0.02	0.01	320	2.2	444	3000	5.82	0	0	11.9	2.88	6.99	182	0
12	843.64	18	7.04E+04	7.00E+03	2.40E+02	3.97E+04	11.6	6.43	263	38.03	4.22	44.47	322.58	0.02	0.01	323	2.3	437	3000	6.02	0	0	11.9	2.88	6.99	182	0
13.75	831.07	12	2.01E+04	3.84E+04	3.16E+02	3.46E+04	5.7	22.22	276	72.25	10.72	75.44	455.91	0.02	0.01	456	2.4	614	3004	8.02	0	0	11.7	2.88	6.88	182	0

Prehabilitad (m)	O. omnia (fM)	Cryptosporidium (cell/ml)	Thiospiras (cell/ml)	Amoebae (cell/ml)	Paradictyon (cell/ml)	C. redii (cell/ml)	Percentage col. in dir.	Percentage Infected	O. omnia Long. Media	Chlor. a (µg/l)	Chlor. c (µg/l)	Bacter. a (µg/l)	NH ₄ ⁺ (µM)	NO ₂ ⁻ (µM)	NO ₃ ⁻ (µM)	N urea total (µM)	P. nitro (µM)	SiO ₂ (µM)	Sulfuric (µM)	Alcalinidad (meq/l)	Ozigeno (mg/l)	Saturacion O ₂ (%)	Temperature (°C)	Conductividad (µS/cm)	pH	Es. (mV)	Lim (µS/cm)
0.3	0	10	0	0	0	0	0	0	150	2.79	0.61	0	111.11	10.91	0.1029	122	0.033	127	0	3.1	9.4	100	14.8	2.36	8	331	1650
0.4	0.93	71	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0	150	4.39	1.03	0	66.83	16.01	0.0756	93	0.03	133	0	3.12	10.2	105	12.8	2.41	8.04	316	210
7.5	0.3	190	0	0	0	0	0	81	6.83	1.52	0	83.14	26.31	0.042	109	0.033	153	0	3.13	9	89	10.8	2.47	7.9	342	22.1	
8.75	0.46	244	0	0	0	0	0	106	8.72	2.06	0.86	157.78	10.73	0.0861	169	0.033	193	0	3.13	2.1	20	8.6	2.49	7.44	322	12	
9	1.98	1361	0	0	0	0	0	112	10.78	2.23	4.19	161.12	3.37	0.147	165	0.03	229	0	3.1	0.4	4	8.3	2.51	7.36	263	18.3	
9.2	1.83	389	0	0	0	0	0	71	7.91	1.56	2.13	157.8	5.23	0.0924	163	0.03	229	0	3.1	0.3	3	8.3	2.51	7.35	234	9	
9.4	6.09	6665	0	0	0	0	0	129	28.59	7.36	17.04	159.5	0.49	0.0315	160	0.045	223	20	3.12	0.2	0.1	8.2	2.51	7.35	179	8	
9.5	9.13	6783	5.03E+03	2.10E+04	0	2.03E+03	44.9	5	188	63.62	15.86	42.86	144.43	0.24	0.0244	145	0.066	233	67	3.2	0.1	8.1	8.1	2.51	7.3	25	6.8
9.6	6.62	3104	5.33E+03	2.97E+03	0	8.83E+04	33	2.9	149	15.18	9.29	71.57	165	0.02	0.0399	165	0.11	232	129	3.3	0	8.1	8.1	2.51	7.34	31	5.8
9.7	13.84	1806	5.14E+03	2.40E+03	0	2.47E+03	36.5	4.66	144	19.23	14.54	149.13	190.02	0.02	0.0733	190	0.1155	235	154	3.5	0	8	8	2.51	7.34	35	4.8
9.8	27.84	1727	5.01E+03	1.69E+03	0	1.85E+03	32.5	2.82	172	15.5	12.06	124.64	194.56	0.02	0.01	196	0.03	239	160	3.7	0	8	8	2.51	7.33	3	1.2
9.9	31.95	972	6.43E+03	1.22E+03	0	1.69E+03	32.2	4.55	201	13.93	10.45	107.05	194.43	0.02	0.01	194	0.099	233	160	3.8	0	8	8	2.51	7.3	7	2.6
10	45.64	363	5.14E+03	1.81E+04	0	1.23E+03	29.6	3.13	207	11.84	8.56	83.74	178.9	0.02	0.1428	179	0.077	228	160	4	0	8	8	2.51	7.29	3	1.8
10.1	17.84	1433	4.00E+03	1.80E+04	0	1.20E+03	27	3	153	15.11	12.43	134.23	168.91	0.02	0.0388	169	0.275	234	167	4.21	0	8	8	2.51	7.29	3	1.4
10.25	36.51	893	3.30E+03	1.60E+04	0	1.13E+03	23	3	203	11.48	8.49	91.14	163.34	0.02	0.01	163	0.03	236	200	4.41	0	8	8	2.51	7.27	32	0.9
10.5	34.91	396	3.00E+03	1.76E+04	4.03E+03	1.04E+03	22.5	2.45	185	9.72	6.26	64.1	200.03	0.02	0.0333	200	0.0601	243	229	4.5	0	8	8	2.51	7.27	36	0.22
11.23	81.01	1209	2.60E+03	6.32E+03	3.10E+03	7.30E+04	22	5.27	196	11.71	5.08	44.28	167.78	0.02	0.01	168	0.045	239	230	4.52	0	8	8	2.51	7.26	34	0.14
12	84.43	1211	1.31E+03	6.32E+03	3.10E+03	9.22E+04	19.5	6.95	206	12.62	4.47	41.58	183.33	0.02	0.01	183	0.33	248	300	5.04	0	8	8	2.51	7.22	43	0.04
13	103.82	1849	1.17E+03	2.03E+04	4.10E+03	6.73E+04	14.3	3.78	149	13.31	4.67	42.3	192.76	0.02	0.0388	193	0.539	239	400	5.5	0	8	8	2.51	7.21	45	0

Profundidad (m)	24/5/91										pH	Eh (mV)	Lea (µMol/L)														
	O. amara (0.001)	Cryptosporidium	Thalassiosira	Amoebae	Picozoos	C. rotundifolius	Peridinium	Peridinium	O. amara	Chlor. s.				Chlor. s.	Bacter. s.	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	N Inorg total	P. soluble	SiO ₂	Sulfato	Alcalinidad	Oxigeno	Saturacion O ₂	Temperatura	Conductividad
0.5	0	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	106	19.1	2.51	8.07	118	1000
3.5	0	147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	118	15	2.51	8.08	101	170
7.5	0	193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	11.9	2.54	8.07	100	37
9	1.34	202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	10.4	2.6	7.6	207	163
9.4	3.4	437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.1	10.1	2.6	7.42	147	3
9.7	19.12	782	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.9	9.9	2.6	7.42	147	3
9.8	79.43	1693	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.8	9.8	2.6	7.19	21	1
9.7	19.15	742	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.8	9.8	2.6	7.19	21	1
9.8	136.16	1467	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.8	9.8	2.6	7.12	-17	1.3
9.9	186.79	1632	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.7	9.7	2.6	7.23	-47	1.05
10	144.67	7373	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.5	9.5	2.6	7.27	-72	0.79
10.1	136.24	2676	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.5	9.5	2.6	7.24	-71	0.4
10.2	146.04	2476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.3	9.3	2.6	7.22	-41	0.4
10.4	130.98	877	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	2.6	7.19	-97	0.24
10.75	141.12	2498	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.8	8.8	2.6	7.18	-83	0.06
11.5	197.95	3129	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.7	8.7	2.6	7.18	-93	0
12.25	117.48	2506	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.6	8.6	2.6	7.17	-104	0
13.9	92.44	8293	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.6	8.6	2.6	6.88	-122	0

Profundidad (m)	28/6/91										pH	Eh (mV)	Lea (µMol/L)														
	O. amara (0.001)	Cryptosporidium	Thalassiosira	Amoebae	Picozoos	C. rotundifolius	Peridinium	Peridinium	O. amara	Chlor. s.				Chlor. s.	Bacter. s.	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	N Inorg total	P. soluble	SiO ₂	Sulfato	Alcalinidad	Oxigeno	Saturacion O ₂	Temperatura	Conductividad
1	0.115	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	106	23.1	2.3	7.99	413	210
4	0.19	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	146	15.9	2.49	7.92	396	35
6	0.33	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15.1	14.9	2.49	8.13	396	18
8	0.42	121	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.6	9.6	2.52	7.79	401	7.4
8.3	0.7	121	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	11.6	2.52	7.63	407	4.3
8.5	0.78	187	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	11.4	2.52	7.32	417	4
8.7	24.61	445	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11.1	2.52	7.4	409	3.3
8.8	91.43	987	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	11.1	2.52	7.27	353	2.1
8.9	167.04	18173	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	11.1	2.54	7.16	433	1.4
9	212.62	19214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	11.1	2.55	7.15	210	0.8
9.1	213.94	19214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	10.9	2.55	7.21	47	0.2
9.2	184.37	2374	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10.8	2.55	7.21	47	0.2
9.3	104.79	1498	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10.6	2.55	7.21	43	0.12
9.4	231.76	7941	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.3	2.56	7.24	27	0.09
9.5	131.19	1428	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.3	2.56	7.24	27	0.09
9.7	151.19	1428	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	2.56	7.16	20	0
10.3	92.44	1413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.8	9.8	2.57	7.1	-15	0
11.5	86.18	2406	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.7	9.7	2.5	7.09	-23	0
12.3	70	1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.7	9.7	2.62	7.1	-31	0

Profundidad (m)	6/8/91										pH	Eh (mV)	Lea (µMol/L)														
	O. amara (0.001)	Cryptosporidium	Thalassiosira	Amoebae	Picozoos	C. rotundifolius	Peridinium	Peridinium	O. amara	Chlor. s.				Chlor. s.	Bacter. s.	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	N Inorg total	P. soluble	SiO ₂	Sulfato	Alcalinidad	Oxigeno	Saturacion O ₂	Temperatura	Conductividad
0.5	0	131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	101	23.8	2.52	7.9	343	1000
3.5	0	133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96	24.4	2.52	7.9	335	215
6.25	0.02	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.6	17.2	2.52	7.88	335	60
8	0.07	68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.8	13.6	2.52	7.53	343	19
8.25	0.88	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1	13.3	2.53	7.48	344	15

Profundidad (m)	768.24	1708	2.48E+03	1.11E+03	4.01E+03	5.21E+04	14.3	4.88	229	44.05	13.72	51.26	722.85	0.02	0.0273	723	9.75	434	2820	4.4	0	0	11.7	2.64	6.91	-2.7	0.22	
11	654.9	1331	7.72E+03	1.07E+03	1.41E+04	1.17E+04	12.3	2.2	223	23.18	9.69	48.78	750.37	0.02	0.01	750	3.87	469	3262	4.35	0	0	11.3	2.65	6.91	-2.2	0.1	
11.1	839.09	1489	2.57E+03	2.43E+03	1.29E+04	1.24E+04	14.6	2.06	223	26.03	10.47	52.72	777.89	0.02	0.0063	778	5.9	499	3000	5.05	0	0	11.3	2.65	6.92	-2.0	0.16	
11.1	978.17	1419	6.91E+03	3.92E+03	1.97E+03	8.94E+04	14.5	5.71	233	60.99	15.79	63.2	789.64	0.02	0.042	790	7.78	513	2344	6.34	0	0	11.3	2.69	6.92	-2.4	0.1	
11.35	700	1500	6.91E+03	3.92E+03	1.97E+03	8.94E+04	14.5	5.71	233	33.42	17.32	92.73	795.38	0.02	0.0756	796	8.11	530	3004	6.8	0	0	11.2	2.72	6.92	-2.7	0.001	
12.35	664.03	1719	2.44E+04	1.42E+03	1.77E+04	1.09E+05	13.8	3.33	262	32.21	15.32	91.21	791.65	0.02	0.01	792	8.11	549	2421	7	0	0	11	2.86	6.91	-2.7	0	
PECTIA																												
Profundidad (m)	0.5	0.23	141	0	0	0	0	0	109	4.02	1.2	0	161.34	17.54	0.01	179	0.038	219	0	3.5	8.9	79	6.7	2.62	7.9	443	80	
0.5	0.23	141	0	0	0	0	0	109	4.02	1.2	0	161.34	17.54	0.01	179	0.038	219	0	3.5	8.9	79	6.7	2.62	7.9	443	80		
1	1.04	149	0	0	0	0	0	206	3.6	1.56	0	152.66	16.93	0.0903	170	0.03	217	0	3.5	8.8	78	6.8	2.63	7.92	443	23		
7	0.1	113	0	0	0	0	0	200	3.81	1.53	0	162.21	15.66	0.0399	177	0.03	214	0	3.5	8.8	77	6.7	2.65	7.7	441	4.4		
10	1.6	160	0	0	0	0	0	225	3.79	1.26	0	165.34	20.73	0.0819	186	0.03	214	0	3.5	8.8	77	6.7	2.65	7.7	443	1.2		

Addendum

Adaptation to sulfide and to the underwater light field in three cyanobacterial isolates from Lake Arcas (Spain)

Antonio Camacho ^{a,b,*}, Ferran Garcia-Pichel ^{b,1}, Eduardo Vicente ^a,
Richard W. Castenholz ^b

^a Department of Microbiology and Ecology, Faculty of Biology, University of Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Department of Biology, University of Oregon, Eugene, OR 97403, USA

Received 3 July 1996; revised 2 September 1996; accepted 3 September 1996

Abstract

Three strains of cyanobacteria isolated from karstic Lake Arcas were tested for photosynthetic adaptations to soluble sulfide. One of them, AO11, was identified as *Oscillatoria* cf. *ornata*, and forms dense populations in the sulfide-rich anoxic hypolimnion of this lake. This cyanobacterium was able to perform sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis and its oxygenic photosynthesis was relatively insensitive to sulfide. The other strains studied were AP1 and AO21, identified respectively as *Pseudanabaena* sp. and *Oscillatoria* cf. *tenuis*, populations of which were present only in epilimnetic waters at low population densities. *Pseudanabaena* sp. also carried out anoxygenic photosynthesis, but oxygenic photosynthesis was totally inhibited by 0.5 mM sulfide. *Oscillatoria* cf. *tenuis* lost most of its oxygenic photosynthetic capacity when submitted to 0.1 mM sulfide and anoxygenic photosynthesis accounted for less than 20% of sulfide-free controls. In addition to different photosynthetic capabilities, the three cyanobacteria exhibited differences in light-harvesting photosynthetic accessory pigments. Pigment analysis of cultures grown under different light conditions showed the capacity of *Oscillatoria* cf. *ornata* AO11 to produce phycoerythrin under low light intensity or under predominantly green light, while neither *Pseudanabaena* sp. AP1 nor *Oscillatoria* cf. *tenuis* AO21 produced this pigment. The complementary chromatic adaptation of *Oscillatoria* cf. *ornata* correlates well with its summertime distribution under the dim light field of the hypolimnion. The distribution and abundance of specific cyanobacterial populations in Lake Arcas can thus be explained by the interplay of light regime and presence of sulfide as some of the most determinant ecological parameters.

Keywords: Cyanobacteria; Sulfide adaptation; Chromatic adaptation

1. Introduction

Sulfide is poisonous to most oxygen-evolving photosynthetic organisms by specifically inhibiting

photosystem II (PSII) activity [1]. However, some cyanobacteria thrive in environments containing high sulfide concentrations [2,3]. The mechanisms by which cyanobacteria tolerate sulfide have been reviewed by Cohen et al. [4]. These mechanisms include PSII insensitivity to sulfide, sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis and simultaneous operation of both oxygenic and anoxygenic photosynthesis. Sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis in

* Corresponding author. Tel.: +34 (6) 386 4388; fax: +34 (6) 386 4372.

¹ Present address: Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Celsiusstr. 1, 28359 Bremen, Germany.

cyanobacteria was first described in *Oscillatoria limnetica* from Solar Lake, Sinai [5,6]. Subsequent studies demonstrated the ability of cyanobacteria isolated from other environments such as hot springs [2,7], submerged hypersaline ponds [8] and coastal microbial mats [9,10], to perform this process in laboratory experiments. A comparison between different strains of cyanobacteria isolated from hot springs showed great differences in sulfide adaptability among different isolates depending on the sulfide content of the springs [11].

Lake Arcas is a freshwater sink of 14.2 m depth, situated in the karstic region of Cuenca (Central Spain). Located on a gypsum substrate, its waters contain high concentrations of sulfate (14 to 17 mM sulfate, on average). A summer stratification period involving the formation of a sulfide-rich anoxic hypolimnion usually occurs from April to October [12]. Three strains of filamentous cyanobacteria were isolated from this lake. Two of them, AO21 and AP1, identified respectively as *Oscillatoria* cf. *tenuis* and *Pseudanabaena* sp., were present only in the epilimnetic oxic waters accompanying the dominant diatom population. The third strain, AO11, identified as *Oscillatoria* cf. *ornata*, grew to high population densities throughout the whole sulfide-rich anoxic hypolimnion, playing a major role in the phototrophic community in this area.

We have studied the ability of these cyanobacterial strains to carry out anoxygenic photosynthesis, and determined tolerance of their PSII to sulfide. Analysis of photosynthetic pigments was also performed from cultures grown under different light conditions in order to further understand how these cyanobacteria may acclimate photosynthetically to their natural light environments.

2. Material and methods

2.1. Field measurements

Oxygen measurements were carried out with a WTW Oxi91 field oxymeter. Sampling was done at close intervals (10 cm at the redoxline) by using an improved version [13] of a fine-layer sampler described by Jørgensen et al. [14]. Soluble sulfide was determined by the method of Cline [15] by adding

the appropriate reagent immediately after sample collection. Light penetration (photosynthetically active radiation, 400–700 nm) in the lake was measured in situ by a 4π scalar irradiance sensor. The numbers of phototrophic sulfur bacteria were determined as described by Jones [16], by filtration on 0.2 μm pore diameter cellulose acetate filters (Sartorius) and subsequent treatment with erythrosine. Dried filters were observed in a Zeiss phase contrast microscope. Cyanobacterial biomass was determined by the Utermöhl sedimentation method [17] in iodine fixed samples using an Olympus inverted microscope. Bergey's manual of systematic bacteriology [18] was used to identify the phototrophic sulfur bacteria and the different strains of cyanobacteria were assigned to their respective 'botanical' species according to Geitler [19], on the basis of morphology.

2.2. Isolation and culture

Fresh samples from Lake Arcas were plated on agar BG-11 medium [20] and maintained under low light conditions ($10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) under coolwhite fluorescent lamps (Sylvania). When growth was observed, isolated filaments were transferred to BG-11 liquid medium and unicyanobacterial cultures were obtained. Several transfers on plates were necessary in some cases. Cultures were maintained under coolwhite fluorescent light ($40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 20°C and transferred every four weeks to 50 ml fresh BG-11 liquid medium. Even though the strains were not axenic, microscopic examination (including counting and measuring for determination of biomass) of actively growing cultures revealed that contaminant heterotrophic bacteria accounted for only 0.1 to 0.01% of the cyanobacterial biomass. Thus, the results of physiological experiments presented here can, with all confidence, be assigned to the cyanobacterial components.

2.3. Culture experiments

All photoincorporation experiments were carried out at a temperature of 23°C and a light intensity of $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ supplied by a high output coolwhite fluorescent lamp (Sylvania). Soluble sulfide was quantified by the method of Cline [15] and sulfide stock solutions (10 mM) were pre-

pared as described in Castenholz and Utkilen [21]. DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), from E.I. Dupont de Nemours, Wilmington, DE, was used at a final concentration of 10 μM . CAM (chloramphenicol) stock was prepared as an aqueous solution of 2 g l⁻¹ and was used at a final concentration of 50 mg l⁻¹. Chlorophyll *a* was determined by extraction in MgCO₃ saturated methanol with the absorbance of the filter-clarified extracts measured at 665 nm, by using a specific absorption coefficient $\alpha(1 \text{ cm}) = 75 \text{ l g}^{-1}$ [22]. NaH¹⁴CO₃ (New England Nuclear) was added in the experiments to reach a final specific activity of 0.05 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$, which was controlled by using standards of radiolabel. Sterile N₂ was bubbled for 5 min in all the incubation vials prior to the addition of sulfide and radiolabel in order to avoid non-biological sulfide oxidation.

For the photoincorporation experiments, homogenized exponential cultures of each strain were filtered and washed with sterile BG-11 medium to reduce the heterotrophic bacterial contamination. All the experiments were carried out in BG-11 liquid medium buffered with HEPES (10 mM final concentration) at pH = 7.4, prepared with deaerated distilled water. Carbonate content was the same for all the incubations and did not change significantly during bubbling with N₂, because of the buffer capacity of the medium. For the facultative anoxygenic photosynthesis experiments, vials (25 ml) plugged with a rubber serum cap punctured with two syringe needles were used. A 20 gauge needle was tightly fitted to a polyethylene tube which extended to the bottom for sampling during the course of the incubation. Cultures were divided into two batches, one of which was supplied with sulfide (Na₂S · 9H₂O) to 0.5 mM final concentration (which was maintained during the incubation by additions of sulfide when necessary) and allowed to stand in the light at 23°C for a period of 4 h for acclimation (pre-adapted culture). After this period, sulfide was removed by 10 min of sparging with sterile N₂ and the cells were transferred to fresh medium. This treatment did not result in changes in the viability of the culture. A similar set of conditions for incubation was used for both pre-adapted and non pre-adapted cultures. Conditions included: (i) an oxygenic photosynthesis control in the light with no additions, (ii) incubation in the light with sulfide added to a final concentration of 0.5

mM, (iii) incubation in the light with 10 μM DCMU, (iv) incubation in the light with 0.5 mM sulfide and 10 μM DCMU, (v) incubation in the light with 0.5 mM sulfide, 10 μM DCMU and 50 mg l⁻¹ chloramphenicol. Dark controls were also used for each of the conditions indicated, and their results (accounting normally for less than 1% of light incubations) were subtracted from the light incubated ¹⁴C assimilation. Sampling (two replicates) was done at time intervals and mean values are presented. Subsamples were used to determine, by the method of Cline [15], if the sulfide concentrations were at the desired levels (minimum measured sulfide concentrations during incubation were 0.42 mM). Sulfide was added to restore initial levels if necessary. Relative photosynthetic rates were determined by incorporation rates of NaH¹⁴CO₃.

Photosynthetic tolerance to different sulfide concentrations was estimated using 10 ml serum tubes (Vacutainer) punctured with two syringe needles. Cultures were divided into two batches, one of which was pre-adapted by incubating overnight at 0.5 mM sulfide (initial concentration) in the light. Both were then submitted to the same ¹⁴C incubation protocol as for the anoxygenic photosynthesis experiments. Incubations were done for 2 h at sulfide concentrations of 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.8 and 1.2 mM, either with and without DCMU. Sulfide concentration was controlled during the incubation (as well as during preadaptation) as previously described, to insure the maintenance of the proper levels. A photosynthesis versus sulfide concentration relationship was then determined. Oxygenic photosynthesis was estimated by calculating the difference in the rates of ¹⁴C incorporation between the incubations with sulfide and those with sulfide + 10 μM DCMU.

Samples of both types of experiments were filtered using 0.45 μm pore diameter cellulose acetate filters (Gelman Sciences), washed with a solution of 2% HCl (v/v) to remove possible ¹⁴C-carbonate precipitates, and washed again with distilled water. Filters were dried overnight, placed in 20 ml scintillation vials containing 8 ml of Ecolume scintillation cocktail (ICN Biomedicals) and counted using a Beckman LS6800 scintillation counter.

All experiments were performed twice with virtually identical results. The data shown correspond to one set of experiments.

2.4. Pigment analysis

In vivo pigment determinations were done to show the adaptation capacities of each strain to different light intensities as well as to two different spectral regimes. All the strains studied were incubated at high ($180 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), moderate ($32 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and low ($2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) intensities, and under $32 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ green or red light. In vivo absorption spectra of the strains cultured under these five different light conditions were done on $0.45 \mu\text{m}$ glass fiber filters GF/F (Whatman) and measured in a Beckman DU65 spectrophotometer as described [23].

3. Results

3.1. Field parameters and natural populations

Typical oxygen-sulfide profiles in Lake Arcas during the summer stratification period are shown in Fig. 1. Fig. 1a shows a profile in early morning, while an afternoon profile is shown in Fig. 1b. A well-defined peak of oxygen could be repeatedly be

detected in the afternoon between 8–9 m, which indicates that oxygenic photosynthesis was taking place within the top of the hypolimnion. Fig. 2 shows the distribution of hypolimnetic *Chromatium weissei* and *Oscillatoria cf. ornata*, which accounted for the majority of the total photosynthetic prokaryotic biomass in the anoxic and microoxic zones of the lake. Biomass of these species, determined microscopically by counting and measuring [16], was 55–70% for *Chromatium weissei* and 25–35% for *O. cf. ornata*, of the total photosynthetic prokaryotic biomass (mean of a long term survey). Both, *O. cf. tenuis* and *Pseudanabaena sp.* had low population densities (less than 50 filaments per 100 ml), and were present only in the oxic epilimnetic waters as companion organisms to the dominant diatom population. The data given are a typical set of a long-term survey of Lake Arcas carried out from 1987 to 1991. The total light available for photosynthesis at the cyanobacterial plate was low (Fig. 1a), due to the strong absorption by an overlying diatom population. Maximal measured values were around $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the top of the plate (Fig. 1a). That light was extinguished extremely fast within the cyanobacterial plate.

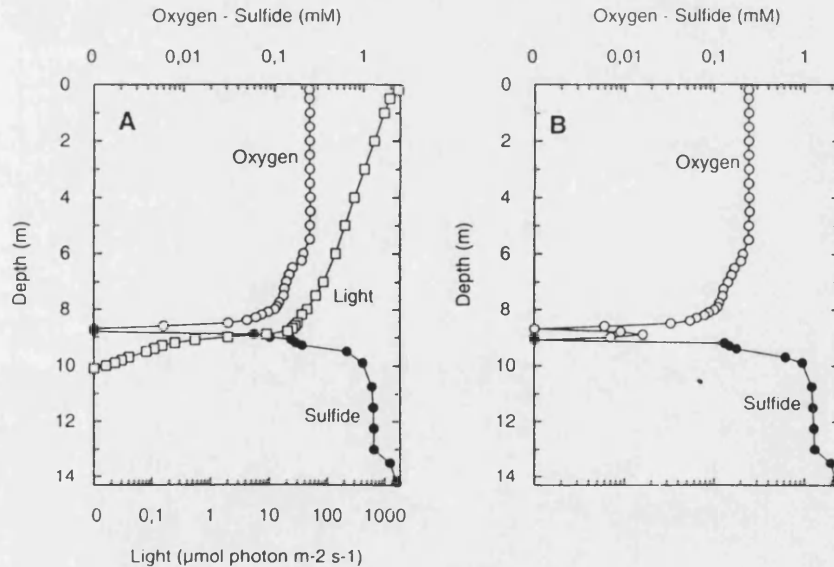


Fig. 1. Typical oxygen and sulfide profiles during summer stratification period; (A) 7.30 a.m., (B) 4.00 p.m., on September 12, 1991. Light penetration profile, measured at 11.30 a.m., is drawn in (A).

3.2. Bicarbonate photoassimilation activity of cyanobacterial strains at 0.5 mM sulfide

The time course of $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ photoassimilation for *O. cf. ornata* AO11 incubated at 0.5 mM sulfide is shown in Fig. 3a and b. In the unadapted cells, sulfide caused an important decrease in the photosynthetic rate over a 4 h time course with or without DCMU, or with sulfide, DCMU and CAM (Fig. 3a). However, a pretreatment with sulfide for 4 h allowed the cells to photosynthesize at a substantial rate in the presence of sulfide, even with DCMU (Fig. 3b), indicating that a sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis was then taking place. A somewhat higher rate took place with sulfide but without the PSII inhibitor DCMU, indicating that some oxygenic photosynthesis was continuing. Photosynthetic activity was dramatically inhibited by the presence of sulfide in the non adapted culture of *O. cf. tenuis* AO21 (Fig. 3c). When the culture was pre-adapted, both sulfide-tolerant oxygenic photosynthesis and sulfide-dependent photosynthetic activity occurred, but they were at much lower levels than in the controls (Fig. 3d). In *Pseudanabaena* sp. API a period of more than 1 hour seems to be necessary for

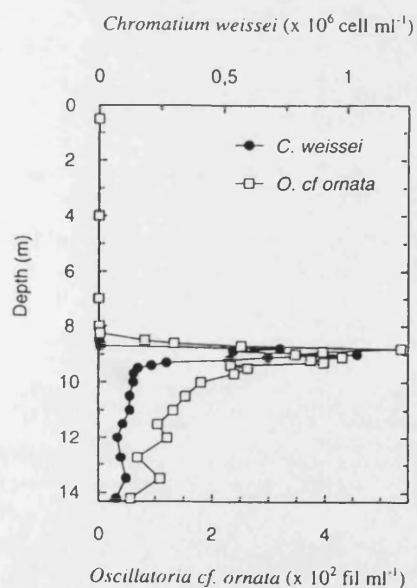


Fig. 2. Distribution of the main phototrophic microorganisms in the anoxic hypolimnion of Lake Arcas on September 12, 1991.

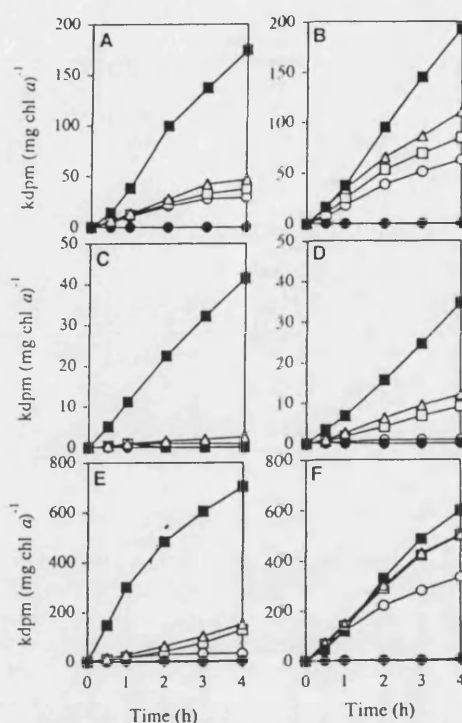


Fig. 3. Time course of $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ photoassimilation in the different cyanobacterial isolates. (A) *Oscillatoria cf. ornata* AO11, unadapted; (B) *Oscillatoria cf. ornata* AO11, pre-adapted; (C) *Oscillatoria cf. tenuis* AO21, unadapted; (D) *Oscillatoria cf. tenuis*, pre-adapted; (E) *Pseudanabaena* sp. unadapted; API (F) *Pseudanabaena* sp. API, pre-adapted. Control (■), 0.5 mM sulfide (Δ), 10 μM DCMU (\bullet), 0.5 mM sulfide + 10 μM DCMU (\square), and 0.5 mM sulfide + 10 μM DCMU + 50 mg l^{-1} chloramphenicol (\circ).

photosynthesis to occur (Fig. 3e), but this adaptation was sensitive to CAM. If *Pseudanabaena* sp. API was pre-adapted, a high sulfide-dependent anoxygenic photosynthetic activity occurred, with no time lag, even in the presence of chloramphenicol added after preadaptation (Fig. 3f).

3.3. Photosynthetic activity under different sulfide concentrations

Fig. 4a shows the photosynthetic activity of *O. cf. ornata* AO11 under different sulfide concentrations. ^{14}C incorporation by anoxygenic photosynthesis increased rapidly with increasing sulfide concentrations, showing saturation kinetics with apparent K_m

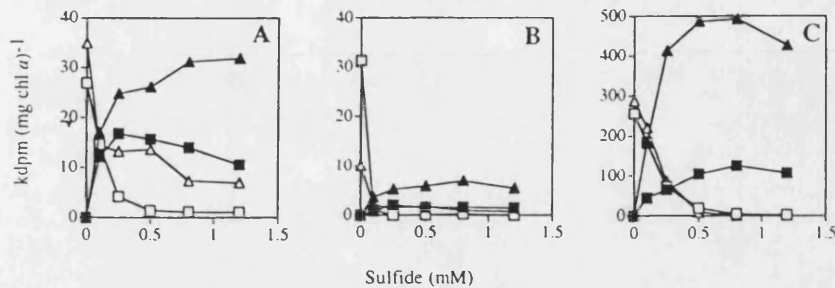


Fig. 4. $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ photoincorporation at different sulfide concentrations of (A) *Oscillatoria cf. ornata* AO11, (B) *Oscillatoria cf. tenuis* AO21, and (C) *Pseudanabaena* sp. API. Unadapted culture, oxygenic photosynthesis (\square); unadapted culture, anoxygenic photosynthesis (\blacksquare); pre-adapted culture, oxygenic photosynthesis (\triangle) and pre-adapted culture anoxygenic photosynthesis (\blacktriangle).

of ca. 0.1 mM. Anoxygenic photosynthesis reached 92% (pre-adapted) and 63% (unadapted) of the total photosynthetic activity in the sulfide free controls (oxygenic photosynthesis). When cells have been pre-adapted, the oxygenic photosynthesis of *O. cf. ornata* appears to be fairly resistant to sulfide, with more than 40% of oxygenic photosynthesis remaining at 0.5 mM sulfide and even 20% at 1.2 mM.

O. cf. tenuis AO21 required preadaptation before exhibiting photoincorporation of $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in the presence of sulfide (Fig. 3c and d) but even then, the photosynthetic activity due to anoxygenic photosynthesis was less than 25% of the total activity in the sulfide-free controls (Fig. 3d and Fig. 4b). Oxygenic photosynthesis was inhibited by sulfide during the 4 h of pre-treatment and more than 67% of the activity was lost during this period; the remaining activity disappeared when 0.1 mM sulfide was added again to the incubation culture.

In *Pseudanabaena* sp. API, oxygenic photosynthesis presented a significant inhibition by sulfide, but not as strong as in *O. cf. tenuis*; in *Pseudanabaena* sp. sulfide concentrations of ca. 0.5 mM resulted in virtual disappearance of oxygenic photosynthesis with or without previous exposure to sulfide (Fig. 4c). Anoxygenic photosynthesis showed marked increases after adaptation periods to sulfide and maxima at sulfide concentrations of 0.6–0.8 mM. Interestingly, optimal anoxygenic photosynthetic rates were very high, ca. 170% of control oxygenic photosynthetic rates in the absence of sulfide. The K_m for anoxygenic photosynthesis was reached at 0.1–0.2 mM.

3.4. In vivo absorption spectra of the different strains

In vivo absorption spectra of the three cyanobacterial isolates, grown at the typical light intensity reaching the hypolimnetic bloom of cyanobacteria ($2 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), show the presence of phycoerythrin in *O. cf. ornata* AO11 with a maximum absorption in vivo at 559 nm. However, this pigment was produced only when incubated at low light intensities or under green light. *Pseudanabaena* sp. API and *O. cf. tenuis* AO21 lack phycoerythrin under all conditions tested.

4. Discussion

Sulfide concentration is an important factor in the physiological ecology of cyanobacteria that inhabit sulfide rich ecosystems. We observed different types of adaptation to sulfide among the three planktonic filamentous cyanobacteria present in Lake Arcas. At least one of them, *O. cf. ornata*, presents a similar pattern of photosynthetic response to sulfide to those cyanobacteria that show type 3 of adaptation as described by Cohen et al. [4]. Type 3 group of adaptation includes that of cyanobacteria which have the capacity to perform anoxygenic photosynthesis using sulfide as electron donor and presents an important resistance of oxygenic photosynthesis to sulfide poisoning. This results in the capacity for the simultaneous, or alternative, operation of both oxy-

genic and anoxygenic photosynthesis in the presence of sulfide. This kind of responses have been observed previously in several strains of *Oscillatoria* cf. *amphigranulata* [11,21] and in *Microcoleus chthonoplastes* [4]. Assuming that DCMU has no effect on the photoassimilation of carbon via anoxygenic photosynthesis [24], PSII of *O.* cf. *ornata* shows a high resistance to sulfide. On the other hand, no observable induction period is necessary in *O.* cf. *ornata* to start anoxygenic photosynthesis and this activity took place even in a medium containing chloramphenicol, showing that protein(s) involved in this activity are probably constitutive in this organism.

In the field site, the bloom of *O.* cf. *ornata* occupied the hypolimnion, where sulfide concentrations reached 1.5–1.6 mM, albeit the depth of maximal biomass was immediately below the metalimnetic zone with concentrations of sulfide below 0.5 mM, where the light available is much higher than at 10 m (Figs. 1 and 2). Under these conditions, extrapolations from the culture experiments suggest that *O.* cf. *ornata* could be able to perform both anoxygenic and oxygenic photosynthesis, at least if one only looks at its photosynthetic behavior under sulfide. The presence of a secondary peak of oxygen in the afternoon (Fig. 1b) where the main *O.* cf. *ornata* plate resided, supports the fact that some oxygenic photosynthetic activity is taking place.

Pseudanabaena sp., unlike *O.* cf. *ornata*, did not form a dense bloom in the anoxic hypolimnion. However, it also showed a potential for efficient sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis in culture, whereas oxygenic photosynthesis activity was strongly reduced by the presence of sulfide. De novo synthesis of proteins was probably necessary in this cyanobacterium to start anoxygenic photosynthesis, since very little and probably not significant activity was detected in unadapted cultures incubated with chloramphenicol, and a period of more than 1 hour was necessary for adaptation.

The third strain studied, *O.* cf. *tenuis*, was only detected in the epilimnetic oxic waters, at very low population densities (less than 10 filaments per 100 ml). It had a very limited capacity for anoxygenic photosynthesis, less than 25% of the normal oxygenic carbon fixation rate. Moreover, oxygenic photosynthesis was totally inhibited at 0.1 mM sul-

fide, a concentration reached in the upper centimeters of the Lake Arcas hypolimnion.

A variety of responses to sulfide are thus found among the isolates from Lake Arcas. However, the distribution and abundance of filamentous cyanobacteria in the water column cannot be explained solely on the basis of the physiological responses to sulfide obtained in the isolates. There is, for example, no reason to believe that *O.* cf. *ornata* is more adapted to cope with sulfide than *Pseudanabaena* sp. If one looks at their photosynthetic ability, the latter displays greatly enhanced photosynthesis under sulfide, whereas *O.* cf. *ornata* only slightly (Fig. 4a and c). Moreover, *O.* cf. *ornata* presents much lower photosynthetic yield than *Pseudanabaena* sp. (note the difference in scales of ^{14}C photoincorporation in Figs. 3 and 4). Thus, *Pseudanabaena* sp. should be expected to perform better under sulfide than *O.* cf. *ornata*. Clearly, *O.* cf. *tenuis* would not be a good competitor in environments such as the hypolimnion of Lake Arcas, due to its low anoxygenic photosynthetic capacity and to the low tolerance of oxygenic photosynthesis to sulfide.

A relevant ecophysiological feature of *O.* cf. *ornata* is the capacity to produce phycoerythrin in conditions of low light intensity. This pigment probably enables this organisms to live in the hypolimnion of the lake, where light intensity is low. Because in cyanobacteria light harvested by the phycobiliprotein complement is mainly funneled to PSII, much may not be available for anoxygenic photosynthesis [24]. Given that the characteristics of the hypolimnetic light field are such that low intensities penetrate into the sulfide-rich depths, it follows that an organism with optimal oxygenic photosynthesis under sulfide, rather than one with optimal anoxygenic photosynthetic capacity should become dominant. The presence of afternoon's peaks of oxygen, which have been detected repeatedly in the different samplings at the top of the hypolimnion, where *O.* cf. *ornata* and *Chromatium weissii* were the dominating organisms, suggests that carbon fixation in *O.* cf. *ornata* is mostly on account of oxygenic photosynthesis at this place, which is consistent with the results of the culture experiments.

On the other hand, it has been demonstrated in a filamentous cyanobacterium [9,10] that oxygen is a nutrient necessary for growth. Although this have not

been proved for the cyanobacteria isolated from Lake Arcas, we did not succeed in growing them under strictly anaerobic conditions. If oxygen was also an essential nutrient for growth in these cyanobacteria, then, the capacity of *O. cf. ornata* to produce oxygen under sulfide could be an additional advantage.

The ability of *O. cf. ornata* to perform oxygenic photosynthesis under sulfide at low light intensities is also advantageous as avoiding competence for sulfide with *C. weissei*. It has been shown in isolates from microbial mats [9,10] that yield and growth rate under sulfide of purple sulfur bacteria are far superior to those of cyanobacteria. If PSII of *O. cf. ornata* was completely inhibited by sulfide at the concentrations reached in the top of the hypolimnion of Lake Arcas, its chances of coexisting with purple sulfur bacteria under sulfide would be quite low, because of its lower affinity for sulfide. This is not the case, since PSII resistance to sulfide allows this organism to occupy sulfide-rich areas in which phototrophic sulfur bacteria are present. *O. cf. ornata* can not be outcompeted by the higher affinity for sulfide of *C. weissei*, because of its ability to use an additional substrate (water) as electron donor, as it has been shown in theoretical and experimental studies [25–28].

During summer stratification the highest population densities of *O. cf. ornata* are reached at the redoxcline level, where sharp chemical gradients, including that of sulfide and oxygen, are usually found. Anoxygenic photosynthesis, either of *C. weissei* or *O. cf. ornata*, could consume sulfide reducing the concentration of this substance. Moreover, oxygen produced by the cyanobacterial oxygenic photosynthesis could oxidize abiotically sulfide, with a rate of $45 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [14]. Then, both oxygenic and anoxygenic photosynthesis, taking place at the top of hypolimnion, contribute to reduce sulfide concentration during the day, by acting as a detoxification process [29].

In conclusion, the adaptations shown by *O. cf. ornata* are advantageous to dominate in the micro-aerophilic and anoxic zone of Lake Arcas, because they may allow this organism to live under sulfide at the light regime present in the top of the hypolimnion of this lake during the summer stratification period. Further studies on the strategies of phototrophic sulfur bacteria and cyanobacteria thriv-

ing together in sulfide-rich habitats would be important for the knowledge of the dynamics of sharply stratified phototrophic communities.

Acknowledgements

We thank Dr. Lucas J. Stal for helpful assistance on the isolation of cyanobacteria. This work was partially supported by DGICYT grant NT89-1124 and by the Consejería de Agricultura of the Castilla-La Mancha Autonomous Government. AC was recipient of a F.P.I grant from the Spanish Ministry of Education and Science.

References

- [1] Oren, A., Padan, E. and Malkin, S. (1979). Sulfide inhibition of Photosystem II in Cyanobacteria (blue-green algae) and tobacco chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 546, 270–279.
- [2] Castenholz, R.W. (1977) The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs. II. Yellowstone National Park. *Microb. Ecol.* 3, 79–105.
- [3] Cohen, Y., Krumbein, W.E. and Shilo, M. (1977) Solar Lake (Sinai). 2. Distribution of photosynthetic microorganisms and primary production. *Limnol. Oceanogr.* 22, 609–620.
- [4] Cohen, Y., Jørgensen, B.B., Revsbech, N.P. and Poplawski, R. 1986. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 398–407.
- [5] Cohen, Y., Padan, E. and Shilo, M. (1975) Facultative anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *J. Bacteriol.* 123, 855–861.
- [6] Cohen, Y., Jørgensen, B.B., Padan, E. and Shilo, M. (1975) Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature* 257, 489–492.
- [7] Castenholz, R.W. (1976) The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs. I. New Zealand and Iceland. *J. Phycol.* 12, 54–68.
- [8] Jørgensen, B.B., Cohen, Y. and Revsbech, N.P. (1986). Transition from anoxygenic to oxygenic photosynthesis in *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 408–417.
- [9] De Wit, R. and Van Gernerden, H. (1987) Oxidation of sulfide to thiosulfate by *Microcoleus chthonoplastes*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 7–13.
- [10] De Wit, R., Van Boekel, W.H.M. and Van Gernerden, H. (1988) Growth of the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* on sulfide. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 203–209.
- [11] Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R.W. (1990) Comparative anoxygenic photosynthetic capacity in 7 strains of a thermophilic cyanobacterium. *Arch. Microbiol.* 153, 344–351.
- [12] Vicente, E., Rodrigo, M.A., Camacho, A. and Miracle, M.R.

- (1991). Phototrophic prokaryotes in a karstic sulphate lake. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 24, 998–1004.
- [13] Miracle, M.R., Vicente, E. and Pedrós-Alió, C. (1992). Biological studies of spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica* 8, 59–77.
- [14] Jorgensen, B.B., Kuenen, J.G. and Cohen, Y. (1979). Microbial transformations of sulfur compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai). *Limnol. Oceanogr.* 24, 799–822.
- [15] Cline, J.D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14, 454–458.
- [16] Jones, J.G. (1979) A Guide to Methods for Estimating Microbial Numbers and Biomass in Freshwaters, 112 pp. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 39.
- [17] Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9, 38 pp.
- [18] Pfennig, N. and Trüper, H.G. (1989) Anoxygenic Phototrophic Bacteria. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 3, 1st edn. (Staley J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G., eds.), pp. 1635–1709, William and Wilkins Co, Baltimore, Hong Kong, London, Sidney.
- [19] Geitler, L. (1932) Cyanophyceae. In: *Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz*, Vol. XIV (Rabenhorst, Ed.) Akademische Verlags, Leipzig. Johnson Reprint Co., New York, London, reprinted in 1971.
- [20] Rippka, R., Deruelles, Y., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1–61.
- [21] Castenholz, R.W. and Utkilen, H.C. (1984) Physiology of sulfide tolerance in a thermophilic *Oscillatoria*. *Arch Microbiol.* 138, 299–305.
- [22] Lenz, J. and Zeitzschel, B. (1968) Zur Bestimmung des Extinktionkoeffizienten für Chlorophyll a in Methanol. *Kieler Meeresforsch.* 24, 41–50.
- [23] Garcia-Pichel, F. and Castenholz, R.W. (1991) Characterization and biological implications of Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J. Phycol.* 27, 395–409.
- [24] Oren, A., Padan, E. and Avron, M. (1977) Quantum yields for oxygenic and anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2152–2156.
- [25] Taylor, P.A. and Williams, P.J.LeB. (1975) Theoretical studies on the coexistence of competing species under continuous flow conditions. *Can. J. Microbiol.* 21, 90–98.
- [26] Tilman, D. (1977) Resource competition between planktonic algae: an experimental and theoretical approach. *Ecology* 58, 338–348.
- [27] Gottschal, J.C., de Vries, S. and Kuenen, J.G. (1979) Competition between the facultatively chemolithotrophic *Thiobacillus* A2, and an obligately Orchemolithotrophic *Thiobacillus* and a heterotrophic *Spirillum* for inorganic and organic substrates. *Arch. Microbiol.* 121, 241–249.
- [28] Gottschal, J.C. and Thingstad, T.F. (1982) Mathematical description between two and three bacterial species under dual substrate limitation on the chemostat: a comparison with experimental data. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1403–1418.
- [29] Van Gernerden, H and De Wit, R. (1986). Strategies of phototrophic bacteria in sulphide-containing environments. In: *Microbes in Extreme Environments* (Herbert, R.A. and Codd, G.A., Eds.), pp 111–128. American Society for Microbiology, Academic Press. London.

Reunido [redacted] que suscribe, en el día de la fecha acordó otorgar [redacted] unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Antonio Camacho Gonzalez

la calificación de Apto "cum laude" por unanimidad

Valencia, a 3 de Septiembre de 1917

El Secretario,

MR Mirach

El Presidente



[Handwritten signature]