

Biológicas

311

T. D

j21627047

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA
(FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS)**

**DISTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE ROTÍFEROS EN LA OXICLINA DE
LA LAGUNA DE LA CRUZ. ADAPTACIONES METABÓLICAS A LA
MICROAEROFILIA EN *BRACHIONUS PLICATILIS***

Ángeles Esparcia Collado

1993



UMI Number: U607680

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 U607680

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

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en
la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Valencia

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES
Nº Reg: <u>5572</u>
DATA <u>13.9.93</u>
SIGNATURA <u>311.T.D</u>
Nº LIBRS:

Biológicas



Fdo: Angeles Esparcia Collado

27 ms.

Tesis dirigida por María Rosa Miracle Solé
Dra. en Ciencias Biológicas y
Catedrática de Ecología en la
Universidad de Valencia



Fdo: María Rosa Miracle Solé

A mis padres

"Creo que es natural que el hombre tenga de vez en cuando dudas acerca del valor de lo que está haciendo; en cualquier caso a mí me asaltan dudas de este género. Me parece un pasatiempo fascinante estudiar el comportamiento de los animales.. Sin embargo, una y otra vez vuelve la embarazosa cuestión: ¿y qué?. Un diablillo parece mirar por encima de nuestro hombro, regocijándose en avivar esta chispa de duda. Reflexionamos sobre ello, tratando de ponderar los pros y los contras -y por lo general terminamos concluyendo que ha merecido la pena. La confianza y la tranquilidad de ánimo se restablecen- sólo durante un tiempo, pues las dudas continúan acechando... Poco a poco nos damos cuenta de que podemos rebatir al diablillo de la duda con un argumento más utilitario, de esos que atraen a ese demonio de gente que se preocupa más de la utilidad que de nuestra peculiar y personal manera de pasarlo bien.. Y es que una vez más se nos muestra que la "ciencia pura" es decir el esfuerzo por satisfacer nuestra curiosidad sobre los fenómenos que nos intrigan, puede por caminos totalmente imprevistos adquirir una firme significación práctica. En muchos aspectos, la distinción entre ciencia "pura" y "aplicada" no es realista. La ciencia "aplicada" a menudo hace grandes contribuciones a la ciencia "pura" y la curiosidad "pura" conduce con igual frecuencia a valiosas aplicaciones".

Niko Tinbergen. (*Naturalistas curiosos*)

AGRADECIMIENTOS

Escribir unos agradecimientos es algo que a primera vista parece tremendamente sencillo; Son tantas las personas a las que debo dar las gracias que con una simple lista de nombres y hechos quedaría todo resuelto. Sin embargo, es algo más complicado, porque detrás de cada nombre o incluso de unos agradecimientos generales a un Departamento, o a un grupo de personas, hay un gran número de rostros concretos, cuyo apoyo ha sido constante a lo largo de todo este trabajo. De hecho, hay un gran número de personas, tanto del ámbito universitario como del extrauniversitario, que en mayor o menor grado han colaborado en la elaboración de este trabajo, bien con sus aportaciones concretas o bien con su incondicional apoyo y espero, que aunque la enumeración no sea exhaustiva, todas ellas se sientan reflejadas en estas líneas.

En primer lugar deseo agradecer a María Rosa Miracle Solé, la dirección de esta tesis, con todo lo que esto supone, como son sus continuas orientaciones y los medios puestos a mi alcance en la realización del presente trabajo. A Manuel Serra Galindo, le debo valiosas aportaciones en la paciente corrección del primer borrador de esta memoria, correspondiente a la segunda parte del trabajo. A Eduardo Vicente Pedrós, María Rosa Miracle y Javier Armengol Díaz, les agradezco su ayuda en la recolección de las muestras. Además a Javier Armengol le estoy altamente reconocida por su colaboración en los contajes de las muestras de campo. A María José Dasi le agradezco la facilitación de los datos de las distribuciones algales. Toñi Rodrigo, Luisa Ballesteros y Toni Camacho también me facilitaron datos de gran interés. A Pierre Clément, Denis Reale, Patrick Mimouni y Walli (Laboratoire d'Ethologie, Université Claude Bernard, Lyon I) deseo agradecerles su cariñosa acogida y apoyo prestado durante mi estancia en Lyon, así como por la puesta a mi alcance de gran número de referencias bibliográficas. También han colaborado con sus orientaciones los doctores Renée Morelis (Laboratoire de Genie Enzymatique, CNRS, Lyon, Francia), Charles King y Mariá Alemany.

Además deseo agradecer a María José Carmona Navarro, Manuel Serra, Rafael Oltra, Carmen Rojo, Amparo Calero y en general a todos los miembros de los Departamentos de Ecología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas su ayuda prestada en esas pequeñas cosas cotidianas, que al enumerar aisladamente parecen ser triviales, pero que en conjunto son una gran muestra de apoyo. A Nacho Muñoz

y Lola Domenech les agradezco su asistencia técnica en la elaboración de algunas de las gráficas más laboriosas.

Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador y de estancias cortas en el extranjero, así como la concesión de un proyecto de la CAICYT a María Rosa Miracle para el estudio de las lagunas del sistema cárstico de Cuenca, también agradezco a la Consejería de Agricultura de la Junta de Castilla-La Mancha la ayuda prestada para la realización de este estudio.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
-----------------------------------	----------

I. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE ROTÍFEROS EN LA OXICLINA DE LOS LAGOS MEROMÍCTICOS

1. Presentación	7
2. Descripción general, ecología y distribución de los rotíferos	9
2.1 Morfología externa y órganos y funciones	11
2.2 Reproducción y ciclo de vida	13
2.3 Ecología y distribución	14
3. Material y métodos	19
3.1 Métodos de muestreo <i>in situ</i> y recuentos	19
3.2 Métodos de tratamiento estadístico	23
3.3 Métodos de aislamiento de algas y rotíferos y de alimentación	25
4. Descripción de la laguna muestreada	27
4.1 La laguna de La Cruz	27
5. Resultados	35
5.1 Descripción morfológica y ecológica de las principales especies de rotíferos	35
5.2 Distribuciones de rotíferos en la Laguna de La Cruz	45
-Distribución en el perfil vertical	45
-Distribución estacional	57
5.3 Relaciones de las especies de rotíferos con los parámetros físico-químicos	63
5.4 Análisis estadísticos multivariantes: asociaciones de especies	82
5.5 Relación con la comunidad fitoplactónica	93
5.6 Alimentación del rotífero <i>Anuraeopsis fissa</i>	98
6. Discusión	103

**II. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA TOLERANCIA DEL ROTÍFERO
BRACHIONUS PLICATILIS A BAJAS CONCENTRACIONES DE
OXÍGENO**

1. Presentación	113
2. Descripción de la especie y origen, descripción, selección y mantenimiento de la cepa experimental	115
2.1 Descripción de la especie	115
2.2 Origen y selección de la cepa experimental	117
2.3 Mantenimiento de la cepa experimental	118
3. Desarrollo metodológico. Estudio de la alimentación de <i>Brachionus plicatilis</i> con alimento no productor de oxígeno.....	121
3.1 Introducción	121
3.2 Material y métodos	126
-Experiencias preliminares	126
-Evaluación del crecimiento según el tipo de alimento	127
3.3 Resultados	130
3.4 Discusión	135
4. Dinámica poblacional de <i>Brachionus plicatilis</i> en condiciones limitantes de oxígeno	139
4.1 Introducción	139
4.2 Material y métodos	140
4.3 Resultados	144
-Experiencia 1	144
-Experiencia 2	150
4.5 Discusión	153
5. Adaptaciones bioquímicas de los animales a condiciones limitantes de oxígeno	157
6. Análisis del metabolismo de <i>Brachionus plicatilis</i>.....	169
6.1 Introducción	169
6.2 Material y métodos	169
6.3 Resultados	181
6.4 Discusión	186

III. CONSIDERACIONES GENERALES Y CONCLUSIONES	191
IV. BIBLIOGRAFÍA	197
V. APÉNDICES	217
Apéndice A	219
Apéndice B	239
Apéndice C	245
Apéndice D	251
Apéndice E	259
Apéndice F	263
Apéndice G	279

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los rotíferos representan una parte muy importante del zooplancton de las aguas epicontinentales, dicha importancia se da tanto en relación a la composición específica del zooplancton como al número de individuos o biomasa. Por ello, este grupo de organismos ha sido objeto de gran número de estudios biogeográficos (Green, 1967; 1972; Dumont, 1983; Pejler, 1974; 1977a) y ecológicos, tales como interacciones depredador-presa (Williamson, 1987), hábitos alimenticios (Pourriot, 1977; Bogdan y Gilbert, 1982; 1987) dinámica poblacional (King, 1967; Swift y Hammer, 1979; Hofmann, 1977; 1987) y más recientemente, comportamientos reproductivos (King y Snell, 1977; Ruttner-Kolisko, 1977; Snell y Garmnan, 1986; Snell y Hoff, 1987) y fisiología (Ruttner-Kolisko, 1972b; Pourriot y Champ; 1981; Doohan, 1973; Epp y Winston, 1978) e incluso diversos estudios aplicados enmarcados en los campos de la acuicultura (Theilacker y McMaster, 1971; Hirata, 1979; 1980; Hirayama, 1985, 1987) y la toxicología (Serrano *et al.*, 1986).

Desde el punto de vista de su distribución, las comunidades de rotíferos presentan un amplio espectro que abarca desde las pequeñas charcas y lagunas hasta las grandes masas de aguas o lagos. Las pequeñas masas de agua suelen estar sometidas a bruscas variaciones en los principales parámetros físico-químicos. Así, en las pequeñas lagunas salobres suelen producirse bruscos incrementos de las concentraciones salinas y fluctuaciones de la temperatura; condiciones que generalmente se encuentran asociadas con bajas solubilidades de oxígeno y con condiciones de oxigenación fluctuantes. Por otra parte, en las grandes masas de agua también se suelen dar fluctuaciones en los diferentes parámetros físico-químicos que se acentúan de una manera especial en los lagos meromíticos. Se trata de ecosistemas que presentan una estratificación de las aguas en su dimensión vertical que lleva asociada una serie de gradientes en dichos parámetros, tales como oxígeno, temperatura, conductividad etc. Si en general, los lagos son sistemas complejos en los cuales se interrelacionan un gran número de parámetros físico-químicos y biológicos, en particular, los lagos meromíticos o estratificados con una capa anóxica profunda, constituyen modelos especialmente adecuados para el estudio de las interrelaciones entre dichas variables físico-químicas y las comunidades que los habitan. En este sentido, se ha descrito la existencia de densas poblaciones de rotíferos en las proximidades de la oxiclina de estos lagos, tales como Banyoles (España; Miracle, 1976), Cisó (España; Alfonso *et*



al, 1987), Lunzer Obersee (Austria; Ruttner-Kolisko, 1975), Blankvatn (Noruega; Larsson, 1971). La zona correspondiente a la oxiclina constituye un ambiente de escasa oxigenación pero que presenta un gradiente de densidad muy marcado que produce una gran estabilidad y mantiene la estratificación de las aguas. Esta zona es rica en recursos pero tan solo pueden ser explotados por organismos que presenten una cierta resistencia a ambientes carentes de oxígeno. En el caso de los rotíferos su ocurrencia en estas capas, en las cuales tan solo se postulaba la existencia de organismos más simples tales como bacterias y ciliados, sugiere la existencia de algún mecanismo adaptativo a tales condiciones, haciendo de los rotíferos unos interesantes candidatos para este tipo de estudios. Sin embargo, a pesar de estos hechos, no se conocen estudios en condiciones controladas de laboratorio capaces de cuantificar la resistencia y propiedades de la vida de los rotíferos a bajas concentraciones de oxígeno, así como de las adaptaciones fisiológicas implicadas en dicha resistencia.

En general, aunque numerosos estudios describen al oxígeno como un factor importante en la distribución de los rotíferos (Larsson, 1971; Ruttner-Kolisko, 1980; Boagert y Dumont, 1989; Berzins y Pejler, 1989c;) su estudio no se ha realizado con profundidad. De hecho, existen varios trabajos en los que se estiman las tasas respiratorias de los rotíferos, habitualmente, en función de concentraciones de alimento o temperatura (Pourriot y Delucharzes, 1970; Doohan, 1973; Leimeroth, 1980), pero no existen estudios sobre las posibles adaptaciones metabólicas que pueden estar implicadas en la tolerancia a las bajas concentraciones de oxígeno. En general, el desarrollo de la vida eucariota, salvo algunas excepciones, precisa del oxígeno para la obtención de energía; no obstante, en todos los organismos se presentan adaptaciones de emergencia orientadas a mantener la vida en periodos en los que la disponibilidad de oxígeno es escasa. De esta forma, se ha prestado gran interés a la vida eucariótica en condiciones anaeróbicas y microaerófilas, existiendo evidencias de vida en anoxia por parte de algunos grupos de ciliados (Finlay *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1991), y de vida microaerófila y tolerancia a condiciones temporales de anoxia en larvas de quironómidos (Frank, 1983), bivalvos (De Zwaan y Wijsman, 1976), moluscos (Mustafa y Hochachka 1973), oligoquetos (Brinkurst *et al.*, 1983) y algunos rotíferos como *Filinia terminalis* (Ruttner-Kolisko, 1980).

El oxígeno constituye pues, un factor importante en la dinámica de los ecosistemas acuáticos y últimamente, como resultado de la acción antrópica sobre estos sistemas, el estudio de los organismos que toleran bajas tensiones de este gas ha cobrado gran relevancia debido a los

procesos de eutrofización de las aguas. Estos procesos responden a un alto contenido en nutrientes que propician un excesivo crecimiento algal en las aguas superficiales el cual es responsable de una reducción del oxígeno en las aguas profundas, limitando dramáticamente la vida. Por ello, además del interés intrínseco del tema desde el punto de vista ecológico, como es el estudio de ambientes considerados hasta muy recientemente marginales para la vida, por sus bajas tensiones de oxígeno, existen también intereses aplicados que es importante reseñar. En primer lugar, se relacionan con la dinámica de la comunidad hipolimnética. Las poblaciones bacterianas y los organismos implicados en el "microbial loop" que habitan en las oxiclinalas o zonas con un marcado gradiente de la concentración de oxígeno que finaliza con su total extinción, desempeñan una función muy relevante en determinados procesos de tipo cibernético que se contraponen a las tensiones a las que se ven sometidos los lagos contaminados. En segundo lugar, concentraciones forzosamente elevadas de organismos, como las que se pueden llegar a obtener en cultivos artificiales, pueden ocasionar caídas en los niveles de oxígeno disuelto, ya que éste es consumido por respiración. La caracterización de genotipos con diferente resistencia a la anoxia puede ayudar a la selección de individuos para cultivos de alta densidad. También puede señalarse, que el conocimiento de cuáles son las especies que toleran con menor pérdida en vitalidad concentraciones limitantes de oxígeno, podría propiciar su utilización en los procesos finales de depuración de aguas.

Este trabajo se centra en el estudio de la distribución de los rotíferos en función de los gradientes de oxígeno que se dan en la naturaleza en las lagunas meromícticas y visto esto en el estudio de los efectos metabólicos y fisiológicos que sobre los rotíferos producen las concentraciones limitantes de oxígeno. Así pues, hemos dividido el trabajo en dos partes que a pesar de sus diferencias presentan una clara conexión. La primera parte es un estudio de campo que consta del análisis de una serie de muestras tomadas a lo largo de un ciclo anual en una laguna que sufre una marcada estratificación con el consiguiente gradiente de oxígeno, mientras que la segunda, consta de una serie de ensayos realizados sobre la especie *Brachionus plicatilis*, orientados a determinar la posible relación entre la limitación de oxígeno y las adaptaciones

metabólicas que permiten tal resistencia. Ambas partes presentan una naturaleza diferente: la primera consiste en un estudio de campo, mientras que la segunda es un estudio de laboratorio. Por tanto se ha considerado oportuno posponer la introducción detallada de los diferentes apartados de que se compone cada parte para incluirla en sendas presentaciones a inicio de las mismas.

El estudio del efecto de las concentraciones limitantes de oxígeno sobre los rotíferos y su papel en la dinámica poblacional y en las posibles adaptaciones metabólicas no había sido estudiado exclusivamente hasta ahora y su estudio no es una tarea que comporte aplicaciones inmediatas a corto plazo, sin embargo, el ir tratando de solventar problemas en la medida en que estos se han ido planteando resulta ser una especie de reto, que de alguna manera despierta nuestra capacidad de asombro sobre los mecanismos que obran en la naturaleza de la que formamos parte. Es cierto que en el momento presente los rotíferos serán conocidos y estudiados por un pequeño número de personas, es cierto que su aplicación más directa se restringe al campo de la acuicultura, que actualmente se pueden ver infinitas posibilidades pero que de momento se enmarcan en el campo de las consideraciones teóricas, sin embargo, a pesar de todo me alegro de haber intentado adentrarme en el estudio de la naturaleza sea mediante rotíferos o mediante otros organismos, en el fondo todos sabemos que hasta cierto punto no importa demasiado.

**I. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE
ROTÍFEROS EN LA OXICLINA DE LOS LAGOS
MEROMÍCTICOS**



1. PRESENTACIÓN

En esta parte del trabajo se estudia la distribución vertical de las poblaciones de rotíferos en la laguna de La Cruz. Se trata de una laguna kárstica meromíctica en la que se dan una serie de gradientes en los principales parámetros físico-químicos, los cuales son responsables de las distribuciones de los organismos, constituyendo un modelo adecuado para el estudio de las interrelaciones entre las variables físico-químicas y las comunidades que la habitan. Por ello se presta una especial atención a los fenómenos de estratificación que se dan en la naturaleza y en concreto a las condiciones de oxigenación y a la manera en que dicho parámetro condiciona las distribuciones de los organismos.

En esta primera parte, pues, se hace una somera descripción de las características principales de los rotíferos identificados en las distintas muestras, para estudiar posteriormente la distribución de las especies de rotíferos en las distintas profundidades, durante dos periodos de estratificación y un periodo de mezcla, en la laguna de La Cruz. Finalmente, por medio de análisis estadísticos se buscan las relaciones entre los principales parámetros físico-químicos y las asociaciones de especies de rotíferos características de los diferentes estratos del lago en las distintas épocas del año. Se pone también de manifiesto la importancia de factores tróficos en la distribución de las poblaciones de rotíferos, y se exploran las posibles relaciones de estas poblaciones con la abundancia y composición de la comunidad fitoplanctónica.

2. DESCRIPCIÓN GENERAL, ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS ROTÍFEROS

Los rotíferos son metazoos pseudocelomados acuáticos pertenecientes al phylum Rotifera, dicho phylum agrupa a más de 2000 especies de organismos insegmentados, con simetría bilateral, los cuales poseen dos características distintivas. La primera característica es una corona de cilios en posición apical, usada generalmente para la alimentación y la locomoción, y la segunda, consiste en la posesión de una estructura formada por piezas móviles, duras y articuladas a nivel de la faringe, denominada mástax. Otras características importantes son un acusado dimorfismo sexual en algunos órdenes (clase Monogononta), la presencia de un número constante de células desde el momento de su nacimiento (eutelia) y un tamaño que oscila entre los 40 y 1000 μm , aunque algunas especies pueden sobrepasar los 2000 μm .

Debido a los cilios y a su talla microscópica, en un principio los rotíferos fueron clasificados como "infusorios", no siendo distinguidos de los organismos unicelulares, hasta que posteriormente fueron considerados un grupo aparte, incluyéndose dentro del phylum de los Asquelmintos junto con Gastrotricos y Nemátodos, entre otros; sin embargo, actualmente se les considera con entidad suficiente para constituir un phylum propio cuyas relaciones filogenéticas con otros grupos se desconocen. Una de las teorías planteadas sobre el origen de los rotíferos propone que derivarían de un turbelario primitivo (phylum platelmintos) (De Beauchamp, 1965) otros los relacionan con los Acantocéfalos postulando un antepasado común para ambos grupos (Lorenzen, 1985). Sin embargo, actualmente se cree que los rotíferos derivarían por neotenia de una larva ciliada pelágica primitiva de la cual pudieron derivarse también platelmintos, anélidos etc. (Clément, 1993).

Dentro del phylum Rotifera se pueden distinguir las clases Seisonidea, Bdelloidea, y Monogononta. La clase Seisonidea agrupa tan solo a dos especies de rotíferos marinos descritas a menudo como epizoitos de crustáceos, los cuales poseen una corona muy reducida, gónadas pares y sexos muy similares en tamaño y morfología. La clase Bdelloidea comprende unos 18 géneros que agrupan a unas 360 especies de rotíferos (Ricci, 1987) exclusivamente de sexo femenino que se reproducen por partenogénesis y que se caracterizan por poseer gónadas pares y a menudo cuerpo vermiforme. En cuanto a la clase Monogononta, agrupa al mayor número de

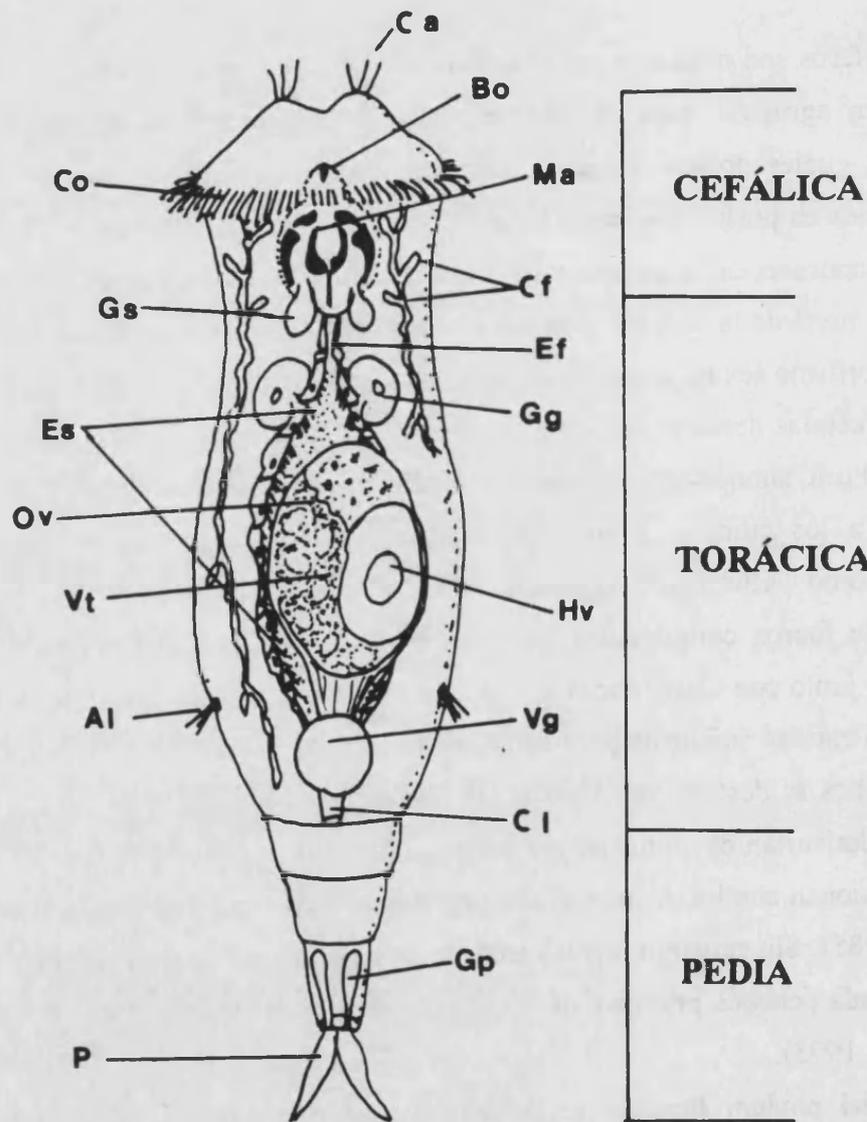


Figura 2.1. Esquema general de la morfología de una hembra de un rotífero típico (tomado de Ruttner-Kolisko, 1974; con ligeras modificaciones). Al, antena lateral; Bo, boca; Ca, cilio apical sensorial; Cf, células flamíferas; Cl, cloaca; Co, corona ciliada; Ef, esófago; Es, estómago; Gg, glándulas gástricas; Gp, glándulas pedias; Gs, glándulas salivares; Hv, huevo; Ma, mástax; Ov, ovario; P, pie; Vg, vejiga; y Vt, vitelario.

rotíferos con más de 1600 especies, que se caracterizan por la posesión de gónadas impares (un solo ovario) y la presencia de machos con un acusado dimorfismo sexual.

2.1 Morfología externa, órganos y funciones

Los rotíferos presentan una forma externa cilíndrica en la cual pueden distinguirse tres regiones, cefálica, torácica y pedia (figura 2.1). En la región cefálica se encuentra una estructura denominada corona, la cual da nombre al grupo, ésta, en la mayor parte de los rotíferos se encuentra constituida por dos anillos de cilios llamados *trochus* y *cingulum*, responsables de la producción de corrientes usadas para alimentación y nutrición, sin embargo, puede encontrarse ausente o muy reducida en algunos grupos. Además en la corona pueden estar presentes otras estructuras tales como antenas sensitivas y palpos.

La región torácica comprende el cuerpo del animal en cuyo interior se encuentran la mayoría de los órganos internos de los rotíferos. Tanto el tronco como el pie de los rotíferos se encuentran recubiertos por un tegumento sincitial, al que se la denomina lorica cuando presenta un cierto espesor. Dicho tegumento contiene una lámina intracitoplasmática de naturaleza escleroproteica que realiza la función de exoesqueleto. En el rotífero *Brachionus plicatilis* ha sido estudiada bioquímicamente por Bender y Kleinow (1988) y su trabajo revela que se trata de filamentos proteicos constituidos por fibras similares a la queratina unidas por puentes disulfuro.

El pie es un apéndice retráctil que se extiende a partir de la región torácica y que generalmente posee dos dedos, aunque el número de dedos puede variar según las especies de cero a cuatro, además posee glándulas pedias que producen un cemento que facilita la fijación de los organismos al substrato. Sin embargo, dependiendo de su forma de vida el pie puede ser más o menos prominente o incluso encontrarse ausente en los rotíferos planctónicos.

En cuanto a la organización interna, los rotíferos poseen un espacioso pseudoceloma en el cual se encuentran músculos, nervios y los órganos digestivos, excretores (protonefridios) y reproductivos, no poseyendo sistema respiratorio ni circulatorio.

El aparato digestivo comienza por una boca situada inmediatamente después de la corona y continúa por un corto tubo ciliado seguido de una faringe musculosa, en la cual se encuentra un aparato masticador o mástax, formado por varias piezas móviles de quitina (Kleinow, 1993) las

cuales tienen carácter sistemático. A continuación del mástax se encuentra el esófago, seguido por un estómago, el cual se continúa en la mayoría de las especies con el intestino y el ano. La porción posterior del intestino (cloaca) recibe los huevos provenientes del oviducto. A menudo, el tracto digestivo se encuentra pigmentado en función de la naturaleza del material ingerido.

El sistema muscular está constituido por pequeños grupos musculares longitudinales y circulares insertados en varios puntos del tegumento o entre el tegumento y las vísceras, también se encuentran presentes en el mástax y en el estómago y son responsables de los movimientos de la corona y el pie, así como del de ciertas espinas articulares, y en la retracción y alargamiento del cuerpo.

Los rotíferos poseen un sistema nervioso simple constituido por un ganglio cerebral localizado dorsalmente, también pueden poseer otros ganglios en el mástax, en el esófago y en el pie, unidos entre sí, además de tres tipos de órganos sensitivos que son mecanorreceptores, termorreceptores y fotorreceptores. Algunas especies poseen unas manchas oculares pigmentadas que suelen localizarse en el extremo apical cerca del ganglio cerebral (Clément, 1980; Clément *et al.*, 1983). Además poseen una pareja de cordones nerviosos ventrales que procedentes del cerebro se extienden hacia el pie. Una estructura interesante encontrada en la región apical de la mayoría de los rotíferos Bdeloides y Monogonontes es un órgano retrocerebral, que produce una secreción adhesiva que en algunas especies sirve para facilitar el desplazamiento. Clément (1977) ha propuesto que podría funcionar como glándula exocrina, quizás lubricando la parte anterior del cuerpo.

El sistema excretor es un sistema protonefridial constituido por células flamíferas, el cual es el encargado de la excreción y osmorregulación; en algunas especies, los conductos protonefridiales desembocan en una vejiga que se abre a la cloaca, en otras, dicha vejiga se encuentra ausente.

El sistema reproductivo de las hembras está formado por uno o dos ovarios, vitelario y una capa folicular (Amsellen y Ricci, 1982). Los ovarios y el vitelario son de naturaleza sincitial, poseyendo éste último un número de núcleos constante, lo cual constituye una característica taxonómica usada en la clasificación de algunas especies. La capa folicular tapiza el ovario y el vitelario y en algunas especies forma el oviducto.

2.2 Reproducción y ciclo de vida

Las diferencias fundamentales entre las tres clases de rotíferos se han establecido en base a sus distintos sistemas reproductivos. Tanto Seisonoideos como Bdelloideos presentan gónadas pares, pero en este último grupo no se conoce la existencia de machos, mientras que la clase Monogononta posee solamente una gónada y aunque no se han descrito machos en todas las especies, sí que se conocen en la mayoría de ellas y se asume que son capaces de producirlos si se dan las condiciones adecuadas. En general, en la clase Monogononta se presenta un acusado dimorfismo sexual, presentando los machos una estructura muy simplificada orientada exclusivamente a la reproducción, siendo características la ausencia de loriga, poseer un tubo digestivo atrofiado, sin ano, una sola corona ciliada y un prominente testículo.

Las especies pertenecientes a la clase Seisonoidea se reproducen exclusivamente de forma sexual, mientras que los individuos pertenecientes a la de Bdelloidea se cree que se reproducen exclusivamente de forma asexual por partenogénesis. Por último, en la clase Monogononta se presenta un tipo de reproducción asexual por partenogénesis en la cual ocurren, después de un número indeterminado de generaciones, episodios de reproducción sexual. Las hembras amícticas son diploides y producen a su vez huevos diploides (llamados amícticos) que se desarrollan mitóticamente dando lugar a hembras amícticas y éste constituye el ciclo de vida principal; sin embargo, bajo cierto tipo de estímulos, se producen hembras mícticas que son haploides, produciendo huevos mícticos (haploides); si dichos huevos no son fecundados, se desarrollarán partenogénicamente dando lugar a machos y si son fertilizados darán lugar a huevos de resistencia o sexuales. Los huevos sexuales son especialmente resistentes a condiciones ambientales desfavorables y sólo eclosionan después de un tiempo y cuando se producen algunos estímulos como cambios en iluminación, temperatura y salinidad (Pourriot y Snell, 1983), dando lugar a hembras diploides amícticas.

En algunos géneros (*Asplanchna*, *Conochilus* y *Sinantharina*) se han descrito hembras anfotéricas, es decir, que son capaces de producir tanto machos o huevos durables como hembras partenogénicas (Ruttner-Kolisko, 1977; King y Snell, 1977), sin embargo, su aparición en los ciclos poblacionales es extraordinariamente rara.

2.3 Ecología y distribución

Los rotíferos representan una parte muy importante del zooplancton de las aguas epicontinentales y de las lagunas costeras salobres. En general, dicho zooplancton se encuentra constituido mayoritariamente por tres grupos taxonómicos, protozoos, rotíferos y microcrustáceos (cladóceros y copépodos). Hasta la fecha, ha sido el grupo de los microcrustáceos el que ha recibido una mayor atención por parte de los investigadores, principalmente, debido a la gran proporción de organismos y a su fácil manejo y observación. Sin embargo, recientemente existen un gran número de trabajos que muestran la importancia de los rotíferos en las comunidades planctónicas.

En términos de biomasa los rotíferos no pueden competir con los crustáceos, pero su rápida tasa de reproducción y desarrollo permite que los rotíferos supongan entre un 10 y un 40% del total de la producción del zooplancton (Herzig, 1987). Además, los rotíferos juegan un importante papel trófico como consumidores de organismos y de materiales en suspensión, y como fuente de alimento esencial para otros animales (Herzig, 1987).

Rotíferos, cladóceros y copépodos a menudo compiten por los recursos alimenticios, aunque, en general, los rotíferos explotan menos eficazmente los recursos debido a que poseen tasas de filtración inferiores. Además presentan un rango más limitado de ingestión de células algales comparado con los cladóceros, no obstante, cladóceros y rotíferos solapan nichos en términos de tipo de alimento y tamaño (Bogdan y Gilbert, 1987). Sin embargo, esta competencia no solo puede ser debida a factores tróficos, sino que pueden verse implicados además otros factores más directos como interferencia mecánica (Dawidowicz y Pijanowska, 1991). Además los rotíferos pueden ejercer una gran presión sobre el fitoplancton siendo en ocasiones mayor que la ejercida por ciertos pequeños cladóceros (Bogdan y Gilbert, 1982), incluso pueden llegar a alterar la composición de especies algales en ciertos sistemas (Schlüter *et al.*, 1987). La depredación sobre los rotíferos es otro efecto importante que afecta a su dinámica poblacional, además presenta un efecto indirecto como fuerza selectiva en la morfología, fisiología y comportamiento de los rotíferos (Green y Biauwan, 1974; Gilbert y Stemberger, 1985; Williamson, 1987).

Además de los factores bióticos como pueden ser competencia, depredación y recursos alimenticios, existen un gran número de factores abióticos que influyen en la distribución de los

rotíferos siendo los más importantes temperatura, salinidad, conductividad, oxígeno, pH, y transparencia del agua.

La temperatura ha sido considerada como uno de los principales factores que controlan la ocurrencia estacional de las especies de rotíferos (May, 1983; Berzins y Pejler, 1989b). Dichos organismos generalmente poseen unos amplios rangos de tolerancia a la temperatura, sin embargo a pesar de este amplio rango la temperatura tiene una gran influencia en su tasa metabólica (Ruttner-Kolisko, 1972b; Miracle y Serra, 1989). Algunas especies de rotíferos presentan una distribución vertical y horizontal en ciertos lagos a menudo estrechamente relacionada con la temperatura (Hofmann y Krambeck, 1991). De esta forma, los cambios en los factores ambientales, especialmente la temperatura, se suelen traducir en una sucesión anual de especies de rotíferos, de manera que la mayoría de autores distinguen en sus trabajos especies perennes y especies estacionales que a su vez se dividen en formas de invierno, primavera y de verano (Hutchinson, 1967; Larsson, 1971; Herzig, 1987). La temperatura también juega un importante papel como agente de cambio, causando variaciones morfológicas en algunos rotíferos (p.e. *Keratella cochlearis*, Lindström y Pejler, 1975).

En cuanto al efecto del pH, aunque los estudios de campo son escasos, se ha demostrado una cierta influencia en la distribución y abundancia de rotíferos (Gonzalez *et al.*, 1990), así como también se ha distinguido entre especies de aguas oligotróficas y eutróficas en función del pH; de esta forma Berzins y Pejler (1987) concluyen que las especies localizadas en aguas oligotróficas poseen un pH óptimo en o por debajo de la neutralidad (pH=7), mientras que las especies comunes de aguas eutróficas poseen un pH óptimo por encima de la neutralidad. Las respuestas metabólicas específicas en función del pH, todavía han sido menos estudiadas, no obstante, Epp y Winston (1978) encontraron que la actividad natatoria y respiración de *Brachionus plicatilis* no cambiaba significativamente en un rango de pH comprendido en 6.5-8.6. Sin embargo el estudio de otros rangos ha revelado que la actividad natatoria de este organismo disminuye para valores inferiores a 5.6 y superiores a 8.7 (Snell *et al.*, 1987). Generalmente, el pH ha sido correlacionado con el grado trófico de los lagos a excepción de ciertos lagos en terrenos calizos (Pejler, 1965).

La conductividad eléctrica del agua se encuentra linealmente correlacionada con las concentraciones totales de los principales aniones (Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-) o cationes (Na^+ , Ca^{++} ,

Mg⁺⁺ y K⁺), constituyendo una buena medida del grado de salinidad de las aguas. Este factor es útil en la explicación de la distribución de especies que presentan diversos grados de tolerancia a este parámetro. No obstante, en las aguas continentales no saladas se presentan bajas conductividades que son ligeramente más elevadas en lagos de sustrato calizo como consecuencia de la disolución de la caliza (500-2000 μ S/cm), de hecho, en los sistemas de agua dulce, del conjunto de iones mencionados anteriormente prevalecen el calcio y el bicarbonato. Por lo tanto, la alcalinidad constituye un importante factor en los lagos continentales, siendo el sistema carbonato-bicarbonato el principal mecanismo de tamponamiento de las aguas dulces. Los lagos originados por disolución de la caliza, como la laguna de La Cruz, objeto de este estudio, disminuyen su productividad debido a una serie de interacciones orgánicas e inorgánicas. Los fosfatos y los micronutrientes inorgánicos esenciales, particularmente hierro y manganeso, forman compuestos altamente insolubles que precipitan; de esta forma, las aguas llamadas duras, con altas alcalinidades, son más difícilmente víctimas de la eutrofia, siendo colonizadas por zooplancton propio de lagos de carácter meso u oligotrófico.

En cuanto a las concentraciones de oxígeno del medio, la mayoría de los rotíferos requieren concentraciones superiores a 1mg/l, sin embargo, pueden llegar a tolerar condiciones anaeróbicas o cerca de la anaerobiosis por cortos periodos de tiempo. De hecho, se han descrito especies de rotíferos capaces de soportar bajas concentraciones de oxígeno, encontrándose generalmente, próximas a la oxiclina de lagos estratificados. Las especies descritas más ampliamente relacionadas con bajos valores de este parámetro han sido *Filinia terminalis*, *Filinia hofmanni*, *Anuraeopsis fissa*, *Keratella hiemalis*, *Keratella cochlerais*, *Polyarthra spp.*, *Hexarthra fennica* y *Brachionus plicatilis* (George y Ferrando, 1969; Larsson, 1971, Guerrero *et al.*, 1978, Swift y Hammer, 1979; Ruttner-Kolisko, 1980; Miracle y Vicente, 1983; Mikschi, 1989, Miracle *et al.*, 1988).

Los ecosistemas acuáticos, en general, no presentan distribuciones uniformes de las condiciones de concentración de alimento, depredadores y factores abióticos tales como oxígeno disuelto, temperatura y movimiento de masas de agua. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar que en dichos ecosistemas los rotíferos no posean una distribución homogénea. A menudo existe una considerable variabilidad respecto a sus distribuciones horizontales y verticales (Larsson, 1971; Miracle y Vicente, 1983; Norgrady, 1988). Sobre todo, estas distribuciones presentan una notable estratificación en los lagos meromícticos, los cuales poseen en su fondo capas de aguas

profundas que no se mezclan con las de arriba (monimolimnion). En general, los lagos con meromixis suelen poseer bajas tasas de renovación del agua y tienen una superficie pequeña en relación con la profundidad máxima y suelen encontrarse escasamente influidos por el viento. Factores todos ellos que favorecen una estratificación vertical estable, la cual tiene asociada una serie de gradientes verticales de los principales parámetros físico-químicos, tales como temperatura, oxígeno y potencial de óxido-reducción. Dichos gradientes generalmente se conocen con las denominaciones de termoclina, oxiclina y redoxiclina respectivamente.

Las zonas en las que se dan los gradientes de los principales parámetros físico-químicos constituyen ambientes ricos en recursos, es decir, nutrientes y materia orgánica, y son adecuadas para crecimientos espectaculares de algunos organismos estratégicos de la r. En la oxiclina, las limitaciones en la concentración de oxígeno restringen su ocupación, siendo ello posible únicamente por aquellas especies que muestran una cierta tolerancia a la microaerofilia. En cualquier caso, un descenso de nutrientes en el epilimnion conduce a una concentración del zooplancton en las zonas más profundas en las cuales el gradiente de densidad puede concentrar tanto a los organismos como a la materia orgánica; de esta forma, los gradientes físico-químicos facilitan la suspensión de los organismos y algunas poblaciones pueden llegar a estar atrapadas en ellos. Por otra parte, la gran acumulación de nutrientes en estas zonas permiten el crecimiento de bacterias quimiotrofas y cianobacterias, algunas de las cuales a su vez sirven de alimento para el zooplancton. Además, la materia orgánica también puede constituir una fuente de alimento que puede ser asimilada por el zooplancton, bien directamente o bien indirectamente a través de bacterias quimiotrofas heterótrofas (Sorokin, 1970; Culver y Brunskill, 1969). En estos lagos además se encuentran bacterias fotosintéticas pero restringidas a la zona anóxica, encontrándose por tanto debajo de las poblaciones de rotíferos.

Aunque los principales patrones de distribución son el resultado de crecimientos poblacionales diferenciados y de movimientos de agua, la distribución de los organismos también puede verse influida en menor grado por comportamientos locomotores. Un comportamiento común reconocido en zooplancton son migraciones diarias en la columna de agua en las cuales los animales generalmente suben a la superficie solamente durante la noche. Durante el día el zooplancton evita a los depredadores visuales (peces) que ocupan las capas superficiales, manteniéndose en capas profundas y migrando a la superficie durante la noche lo cual les permite explotar ricos recursos algales.

En general, la distribución de los organismos en ambientes naturales está ligada a una serie de factores bióticos y abióticos que en su conjunto pueden explicar los distintos comportamientos, sin embargo, el tratar explicar cuales son las contribuciones específicas de cada uno de dichos factores a una distribución dada, no es algo inmediato.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Métodos de muestreo *in situ* y recuentos

La toma de muestras se realizó durante el periodo comprendido entre los meses de junio de 1987 a octubre de 1988 con un total de 183 muestras (ver apéndice A). Para cada profundidad se tomaron muestras de agua de 2 a 4 litros mediante un muestreador de doble cono (Miracle *et al.*, 1992, figura 3.1), el cual se encontraba conectado a una bomba peristáltica. Dicho procedimiento permite una toma de muestras en capas finas muy precisa minimizando la alteración de los gradientes verticales (Jorgensen *et al.*, 1979; Miracle y Vicente, 1985). Simultáneamente a la toma de muestras, se realizaban perfiles de oxígeno, luz, temperatura, pH, potencial de óxido-reducción y conductividad (LF 91 WTW; Orion SA 250 pH), escogiéndose las profundidades de muestreo en función de la concentración de oxígeno. Las medidas de temperatura y oxígeno se realizaron *in situ* con un oxímetro (Oxi 92 WTW) y las de luz con un quantómetro (CRUMP Photometer UK E/m²s). También se determinó la transparencia del agua mediante un disco de Secchi. Asimismo, se tomaron algunas muestras de agua al objeto de realizar análisis de Winkler para la determinación de oxígeno con el fin de comprobar las medidas del oxímetro. Dichos muestreos se realizaron en el centro de la laguna a diferentes profundidades según los meses del año, tomándose en intervalos de 10 en 10 cm en la zona de la oxiclina (figura 3.2).

Para las medidas de pH y potencial de óxido-reducción el agua bombeada pasaba por su entrada inferior a un recipiente de metacrilato (Miracle *et al.*, 1992; figura 3.3) en el cual se localizaban los correspondientes electrodos (Radiometer-80 Orion). El zooplancton se recogía filtrando *in situ* el agua bombeada una vez medido su volumen (en general 2 l, aunque a veces eran más de 2, en función de su grado de concentración) a través de una malla de nital de 30µm de poro y 7 cm de diámetro; seguidamente el filtrado se resuspendía en un tubo de fondo plano conteniendo unos 20 ml de formaldehído al 4% al objeto de conservar a los rotíferos para su posterior recuento.

En el procesado de las muestras, los filtros eran retirados, arrastrando con formaldehído adicional los restos depositados, tras lo cual el volumen de la muestra aumentaba a aproximadamente unos 25 ml, revisándose al mismo tiempo los organismos que aún podían quedar retenidos en el filtro después de sacarlo de la solución de formol de la muestra correspondiente. Una vez realizadas dichas operaciones, las muestras se dejaban sedimentar. El uso de formaldehído presenta algunos problemas referentes al grado de contracción de los organismos, lo cual en algunas ocasiones dificulta su clasificación, y por ello, adicionalmente se ensayó una mezcla consistente en 0.04% de procaina y 4% de formaldehído (May, 1985). Sin embargo su uso no resultó mejor que el uso de formaldehído dando resultados muy semejantes.



Figura 3.1. Muestreador de doble cono usado en la toma de muestras.

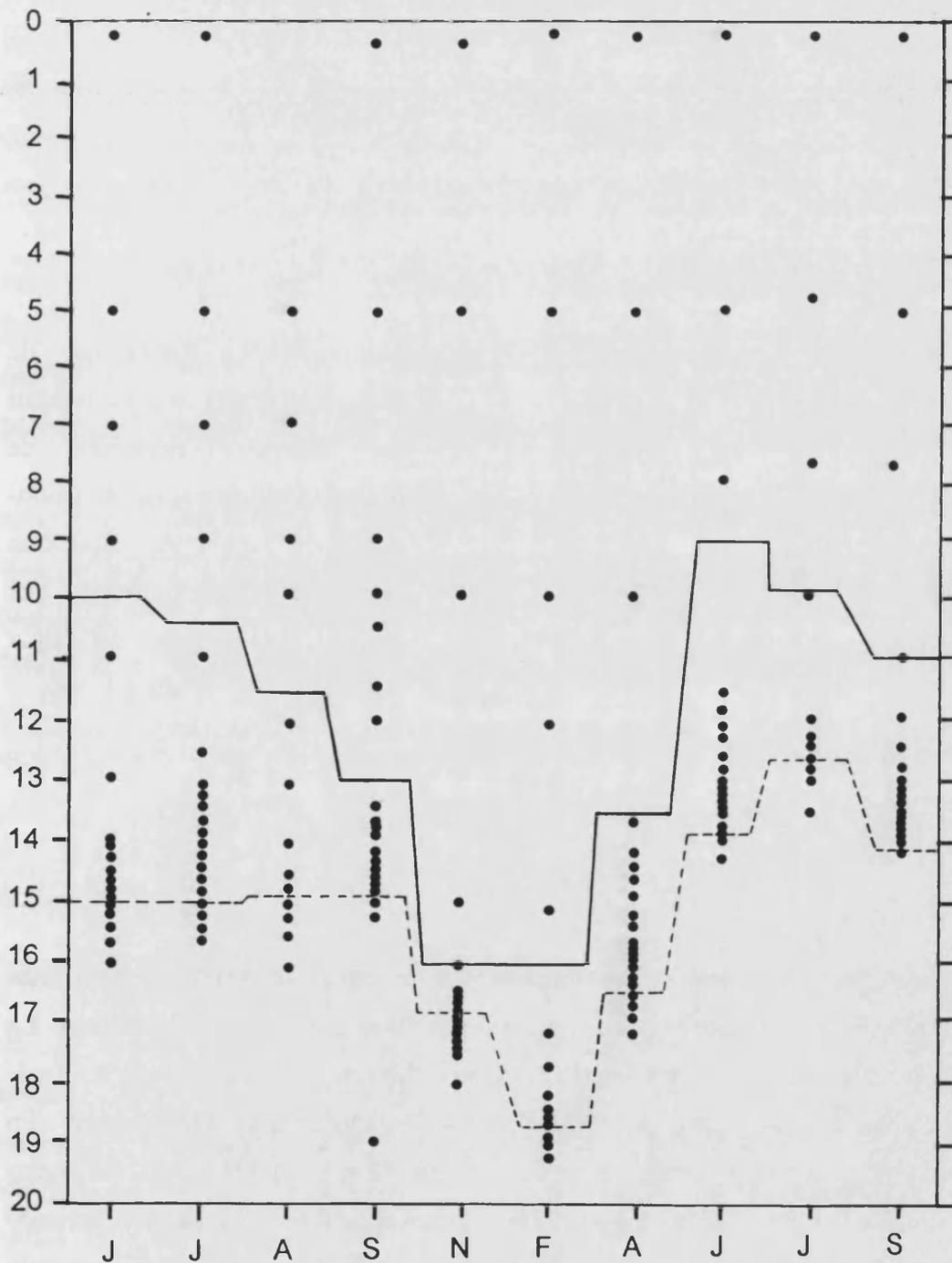


Figura 3.2. Profundidad a la que fueron tomadas las diferentes muestras de rotíferos en cada uno de los meses estudiados. Se indica con línea continua la división de la columna de agua en las dos fracciones, epi-metalimnética e hipolimnética, utilizadas en las tablas. La línea discontinua representa la profundidad de extinción del oxígeno.

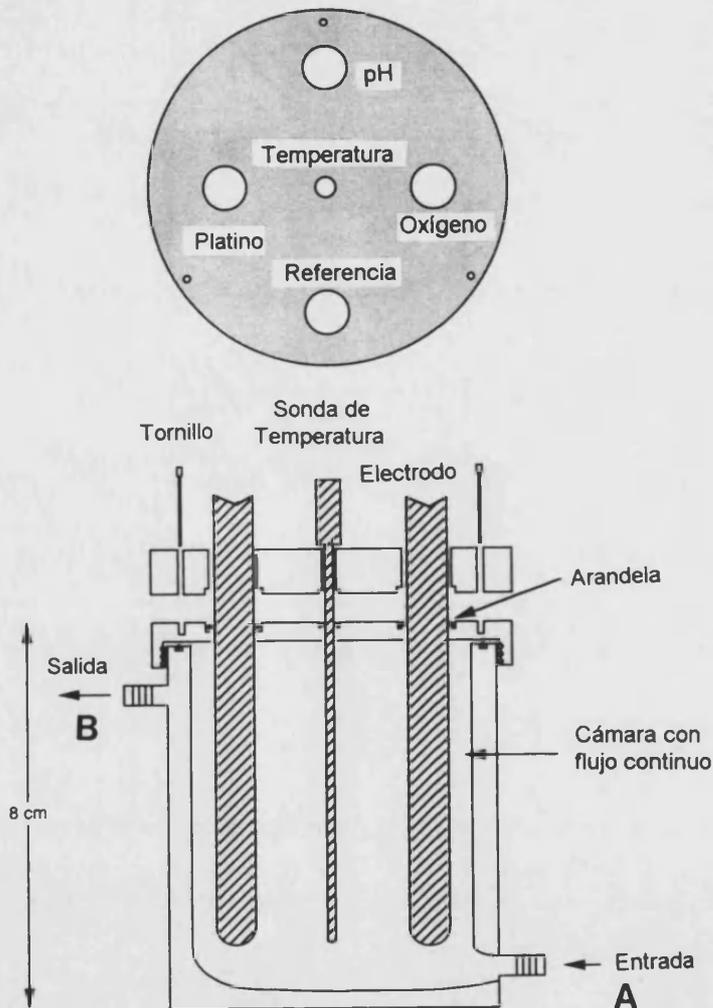


Figura 3.3. Recipiente de metacrilato en el cual se insertan los diferentes electrodos de temperatura, potencial de óxido-reducción y pH. A, Conexión con un tubo de polivinilo que permite la entrada del agua bombeada. B, Salida del agua.

Cuando se realizaba el recuento de los rotíferos, las muestras se depositaban en unas pequeñas cubetas cilíndricas utilizando un microscopio invertido a 100 ó 200 aumentos. La preparación de las cubetas se efectuó seccionando 2 a 4 cm de un tubo de polietileno de 2.5 cm de diámetro interior y adhiriendo un cubreobjetos de 3 x 4 cm mediante pegamento "Araldit". En dichas cubetas se vertían los 6-8 ml finales de la muestra previamente sedimentada, los cuales eran agitados después de separar de 17 a 19 ml de sobrenadante que a su vez era revisado mediante un estereomicroscopio al objeto de evitar las pérdidas de organismos y conservado para su posterior uso en el almacenamiento de la muestra. La muestra vertida en la cubeta se dejaba sedimentar varias horas al cabo de las cuales se procedía al recuento. Asimismo, con una lupa estereoscópica se contaban a 50 y 100 aumentos los organismos que habían quedado atrapados por tensión superficial en la película formada en la parte superior del agua de la muestra

colocada en la cubeta de sedimentación. En muy pocas ocasiones, cuando el número de individuos era muy elevado, el recuento de los organismos pertenecientes a la especie en cuestión se realizó solamente en zonas al azar, previamente delimitadas en el fondo de la cubeta, correspondientes a 1/2 ó 1/4 de la superficie según los casos. Para las demás especies se hicieron recuentos de todos los individuos de la cámara.

En el proceso de clasificación de especies, algunos organismos fueron separados mediante micropipeteo, depositados en un portaobjetos y tratados con unas gotas de lejía al objeto de facilitar la observación de los mástax, ya que su descripción constituye un criterio taxonómico y dado que están formados por piezas duras de quitina, la lejía ayuda a la disolución del organismo permitiendo la visualización de dicha estructura. Ocasionalmente se contaron los huevos.

Asimismo, se tomaron muestras de agua de las capas microaerófilas sin ser sometidas a ningún tratamiento de fijación, al objeto de poseer muestras con organismos vivos para confirmar su presencia activa en dichas capas. En algunas ocasiones, también se tomaron muestras con una doble botella de Van Dorn (5.4 l de capacidad total) del epilimnion a fin de completar datos. No se encontraron diferencias importantes en las densidades de rotíferos observadas en las muestras del epilimnion tomadas con botellas Van Dorn y las tomadas mediante el muestreador de doble cono.

3.2 Métodos de tratamiento estadístico

Los datos fueron sometidos a varios tipos de análisis estadísticos, realizándose un análisis de componentes principales (ACP) entre los datos de las especies de rotíferos previamente transformados logarítmicamente (análisis 4M; BMDP; Dixon *et al.*, 1983). El objetivo de dicho análisis es reducir la información contenida en estos datos a un número menor de nuevas variables abstractas (componentes principales), cada una de ellas combinación lineal de las variables originales, que expliquen la mayor proporción posible de la varianza de las observaciones originales. Las componentes principales ortogonales entre sí se ordenan de mayor a menor, según la fracción de varianza de los datos que pueden explicar, y son particularmente útiles en la descripción de la estructura de una comunidad y la interpretación de los factores que más influyen la variación de los datos ya que permite detectar la asociación de las variables y

llegar de esta forma a una simplificación del sistema. También se realizó un análisis de componentes principales con las principales especies de zooplancton y los principales parámetros fisicoquímicos transformados logarítmicamente.

Para poner de manifiesto las relaciones entre las distribuciones algales y las distribuciones de rotíferos se realizó un análisis de correlación canónica (ACC; análisis 6M; BMDP; Dixon et al., 1983) entre las proporciones de las especies de zooplancton y las especies algales (datos facilitados por M.J. Dasí) determinadas en el periodo de muestreo. Los datos fueron tratados utilizando la transformación $\arcsen \sqrt{P}$, donde P es un porcentaje. Dicha transformación es conocida como transformación angular y es especialmente adecuada para porcentajes y proporciones. El análisis de correlación canónica busca las interrelaciones entre dos conjuntos de variables, en este caso, entre las proporciones de las especies de rotíferos (11 especies) y la de las algas fitoplanctónicas (23 entre especies y grupos de especies relacionadas). Este análisis trata de buscar combinaciones lineales de cada uno de los conjuntos de variables observadas, de manera que el primer par de combinaciones lineales, o variables canónicas, extraído sea el de las variables cuyo coeficiente de correlación entre ellas sea máximo y los otros pares sucesivos sean también los de mayor correlación, con la condición de que sean ortogonales a todas las combinaciones lineales derivadas anteriormente.

Para comparar las diferentes distribuciones estacionales de los rotíferos los recuentos para cada especie y mes fueron convertidos a miles de organismos por m^2 en dos fracciones de la columna de agua, la primera fracción (E) corresponde a la columna comprendida desde la superficie hasta el final del metalimnion, mientras que la segunda (H) abarca desde la profundidad anterior hasta la última profundidad en la que se encontraba algún organismo que coincidía generalmente con la de la extinción del oxígeno. La integración empleada es $T_i = \sum x_{ij} (Z_{j+1} - Z_{j-1})/2$ en donde Z_j son las n profundidades en metros, a las que se han realizado los muestreos, X_{ij} es el número de individuos por m^3 de la especie i que se estima que hay en la profundidad Z_j y T_i representa el total de individuos de la especie i.

En el caso de los parámetros fisico-químicos, para cada uno de los parámetros estudiados, se ha calculado el centro de gravedad de la distribución en el perfil vertical, para cada especie de rotífero en cada fecha de muestreo. Obteniéndose una aproximación de los valores de los parámetros fisico-químicos a los que corresponden las mayores densidades poblacionales. El cálculo se realizó utilizando la siguiente expresión $\sum x_i y_i / \sum x_i$ donde x_i e y_i son respectivamente el

número de individuos y el valor del parámetro para la muestra i .

También se ha calculado el índice de diversidad para cada mes en las distintas profundidades muestradas empleándose el índice de Shannon-Weaver que responde a la expresión $D = - \sum p_i \log_2 p_i$. En donde p_i corresponde al número de individuos de la especie i dividido por el total de individuos de la muestra correspondiente, obteniéndose el resultado en bits.

3.3 Métodos de aislamiento de algas y rotíferos y de alimentación

Las experiencias de alimentación descritas en el apartado 5.6 se realizaron con *Anuraeopsis fissa* aislado de una muestra procedente de la laguna de La Cruz, recogida a 12 metros de profundidad. Para ello se filtraron 25 litros a través de una malla de nytal de $30\mu\text{m}$ de poro, el filtrado se resuspendió en 25 ml de agua de la laguna enriquecida con las soluciones de fertilización de Guillard y Ryther (1962). Después de varios días de incubación a 25°C e iluminación constante, se aislaron rotíferos de la especie *Anuraeopsis fissa*, los cuales fueron inoculados en agua filtrada de la laguna previamente fertilizada.

Por otra parte, se tomaron una serie de alícuotas del agua de la laguna, filtrada por $30\mu\text{m}$ para tenerlas libres de rotíferos y fueron enriquecidas mediante las mismas soluciones de fertilización e incubadas a 25°C . Periódicamente se observaron los cultivos mediante microscopio de contraste de fases, seleccionándose aquellos en los que predominaba una especie algal. Este proceso comporta sucesivos pases a un medio estéril enriquecido, compuesto por agua de la laguna estéril y fertilizada. Se realizaron una serie de subcultivos a partir de los viales que mostraron crecimiento algal, repitiéndose el proceso hasta la obtención de cultivos unialgales. De este modo se obtuvieron cultivos de las especies algales *Chlamydomonas sp.*, *Monoraphidium sp.* y *Monoraphidium minutum*. Dichos cultivos fueron mantenidos con aireación en cámara de cultivo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminación constante.

Con los cultivos de rotíferos de la especie *Anuraeopsis fissa*, aislados de la laguna, se realizó un estudio de alimentación, empleándose una de las especies algales aisladas de la laguna (*Monoraphidium minutum*) tanto sin tratar como sometida previamente a un tratamiento de congelación de -20°C , también se empleó levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae*,

extracto de tierra (200g/l, Pourriot 1965), así como, un alga propia de agua dulce, *Scenedesmus* sp., cedida por el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC, Castellón). También se utilizó agua de la laguna estéril y fertilizada, al objeto de comprobar si los rotíferos crecían a expensas de algún otro organismo asociado a los rotíferos que pudiera crecer bien en los medios anteriormente citados enmascarando los resultados. En esta experiencia se combinaron las fuentes de alimentación mencionadas anteriormente, con condiciones de iluminación y oscuridad. Los cultivos experimentales se iniciaron con 25 hembras del rotífero *Anuraeopsis fissa* por replicado, aisladas individualmente mediante una pipeta Pasteur bajo observación directa con un estereomicroscopio. Las hembras se depositaron en tubos con 20 ml de medio de cultivo en exceso durante 7 días, al cabo de los cuales se contó el número de hembras. Cuando se procedió al recuento, el cultivo estaba en su fase de crecimiento exponencial. Todos los cultivos se llevaron a cabo a 25°C de temperatura y en los cultivos iluminados la irradiación PAR fue aproximadamente de 35 μ E/m²s. Los cultivos fueron alimentados en el momento de su inoculación y el medio no se renovó durante la experiencia. Todo el conjunto experimental descrito anteriormente, fue repetido tres veces. Los resultados de los recuentos de las condiciones que mostraron crecimiento fueron sometidos a un análisis de frecuencias χ^2 (Sokal y Rohlf, 1979), en el que se empleó la media de los tres ensayos para cada una de las condiciones ensayadas.

4. DESCRIPCIÓN DE LA LAGUNA MUESTREADA

4.1 La laguna de La Cruz

La laguna de La Cruz (UTM 30 SWK 962272) (figura 4.1) es una pequeña laguna meromíctica formada por una dolina, localizada a 1000 metros de altitud sobre el nivel del mar en una importante área kárstica cerca de Cuenca, concretamente se encuentra emplazada en la rama castellana de la cordillera Ibérica, al S de la Serranía de Cuenca y al W de los Montes Universales, en una mesa de materiales calizos cuyo origen se remonta al Cretácico superior (Cenomanense). Dicha dolina pertenece a un conjunto de 34 dolinas denominadas torcas en el



Figura 4.1. Vista aérea de la Laguna de La Cruz.

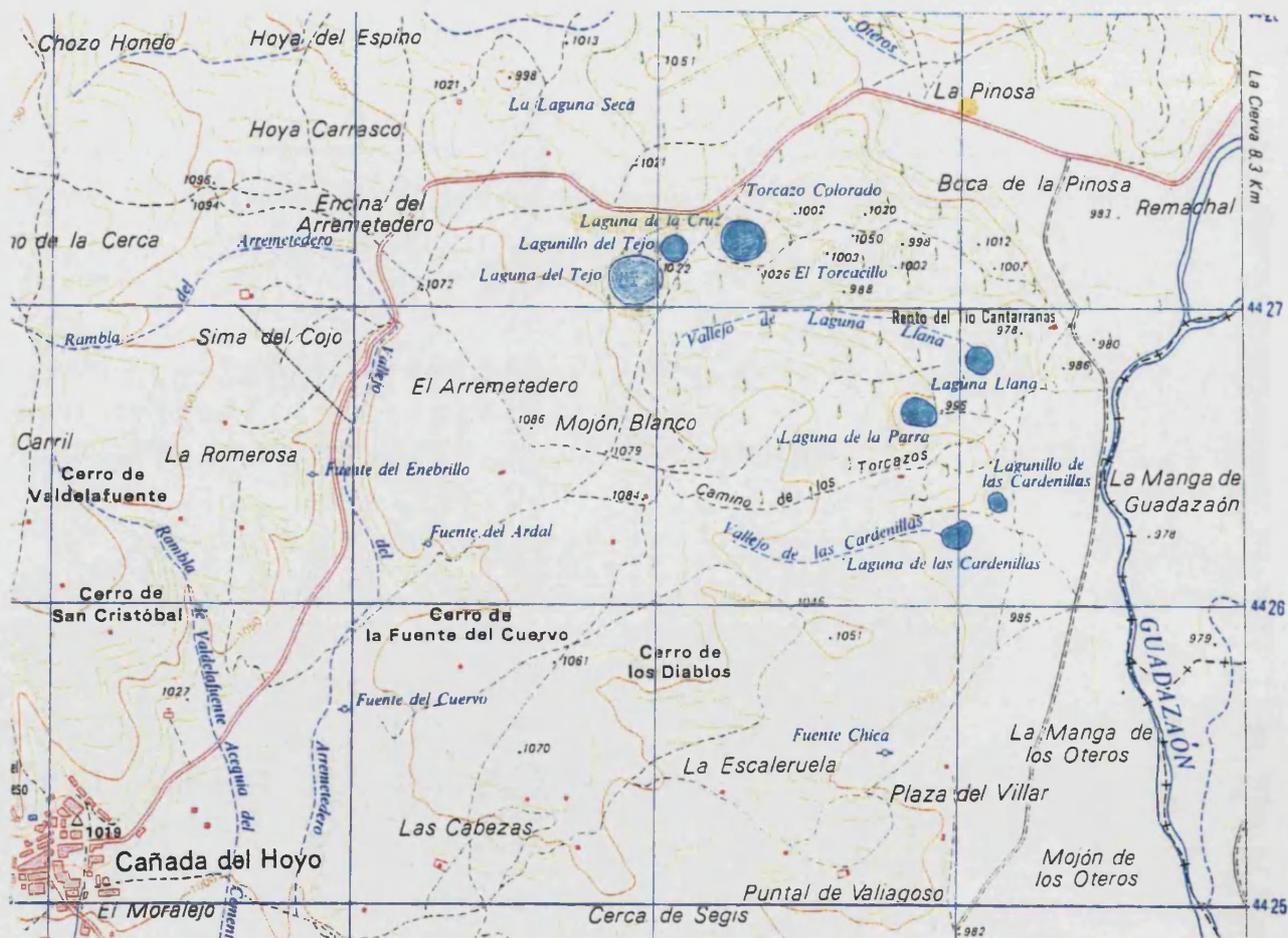


Figura 4.2. Situación geográfica de la Laguna de La Cruz. Dicha laguna pertenece a un conjunto de torcas con agua localizadas en las inmediaciones del municipio de Cañada del Hoyo (Cuenca). La cartografía corresponde al Mapa Topográfico Nacional de España (Instituto Geográfico Nacional, Hoja nº 635-II escala 1:25000, CAÑADA DEL HOYO).

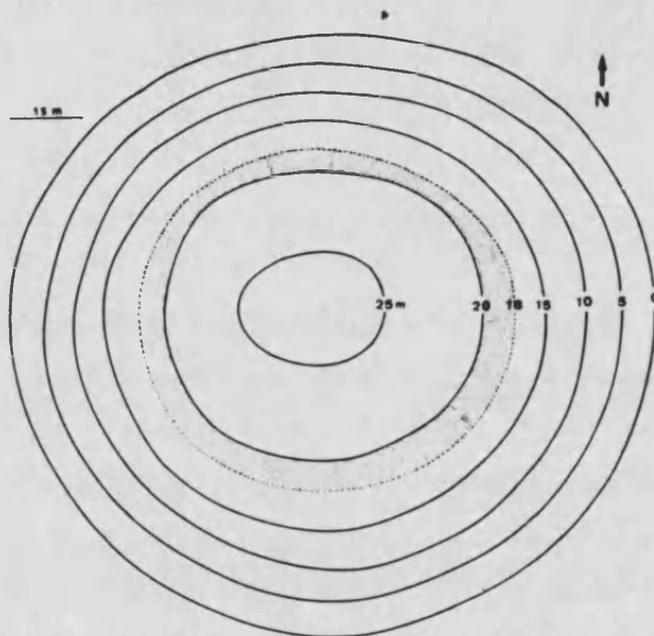


Figura 4.3. Mapa batimétrico de la laguna de La Cruz, según Vicente y Miracle (1988).

lugar, situadas a ambos márgenes del Polje del Guadazaon. Este Polje es abierto y alargado en sentido NNE-SSW y su origen parece ser estructural ya que su prolongación hacia el N-NE coincide con la importante falla de Valdemoro de la Sierra, de unos 200 m de salto (Eraso *et al.*, 1979). Sin embargo, solo una pequeña fracción de estas dolinas tienen agua, constituyendo un conjunto de 7 lagunas permanentes y 3 temporales, que se localizan todas ellas a unos 3 ó 4 km al NE del pueblo de Cañada del Hoyo (figura 4.2).

La laguna de La Cruz es una depresión circular que posee un diámetro medio de 121 m y una profundidad máxima en su centro de 24-25 m dependiendo de la estación y de la pluviosidad del año. Su morfometría (ver figura 4.3) presenta una razón superficie/profundidad pequeña y su localización en una cubeta de disolución, que posee paredes verticales de 20-30 m sobre la superficie del agua es causa de una importante reducción de la acción del viento. Sus vertientes han sido descritas como vertical la Norte, la Sur semireglada, la Este vertical y la Oeste semireglada, presenta un fondo cónico y en sus alrededores predomina el estrato arbóreo (Eraso *et al.*, 1979).

La laguna es pues de origen kárstico por lo que sus aguas son ricas en bicarbonato, presentando alcalinidades superiores a los 5 meq/l, este es el anión predominante en las aguas que por lo demás son muy pobres en sulfatos y cloruros. Esta laguna presenta una meromixis biogénica férrica (Vicente y Miracle 1988), cuya manifestación se puede observar en la figura 5.2 (A y B) dónde se representan el aumento de conductividad y la disminución de pH en profundidad, así como la posición de la oxiclina y redoxiclina. Debido al alto contenido en carbonatos y bicarbonatos, la mayoría de los veranos, hacia finales de julio, las aguas del lago toman un color blanco lechoso, propiciado por la precipitación del carbonato cálcico (figura 4.4). Este fenómeno, se produjo en 1988 los días 21 al 27 de julio, y se observó que el aumento en la producción de fitoplancton (Dasi, 1990) junto con la elevación de las temperaturas del agua, provocaban una saturación de carbonato cálcico el cual precipitaba en forma de cristales aciculares microscópicos de calcita magnesiana (Rodrigo *et al.*, 1993).

Durante el periodo de estratificación térmica del mixolimnion que comienza a mediados de la primavera y se extiende hasta bien entrado el otoño, se dan varios gradientes en los perfiles de los principales parámetros físico-químicos (fig. 5.2 A y B). Respecto a la temperatura se produce una termoclina que comienza sobre los 4 m en primavera y va profundizando a medida que avanza el verano, llegando a comenzar sobre los 9 m a principios de otoño. A su vez, durante el invierno presenta una inversión térmica similar a la que presentan otros lagos con meromixis férrica (Kjensmo, 1967). En este lago, además se observa también en verano un calentamiento de las aguas en el fondo; la temperatura desciende con la profundidad hasta un valor mínimo menor de 6°C, experimentando luego un incremento hasta algo más de 6°C en el monimolimnion, temperatura que se mantiene en esta capa prácticamente constante durante todo el año. Para explicar este tipo de fenómeno se han esgrimido dos causas: (1) la posibilidad de que el mínimo de temperatura detectado pueda deberse a un flujo de agua fría subterránea que a su vez favorecería la meromixis y (2) el mínimo de temperatura también podría ser explicado por la persistencia de agua fría de invierno en el hipolimnion (Vicente y Miracle, 1988), siendo ésta última la más probable.

En cuanto a la concentración de oxígeno se detecta también una oxiclina que presenta la extinción de oxígeno sobre los 15 m en el año 1987 y los 13-14 m en 1988. Por debajo de esta se establece una redoxiclina estrechamente relacionada con las concentraciones de Fe^{++} y H_2S , aunque las concentraciones de H_2S son relativamente bajas como corresponde al poco



Figura 4.4. Fotografías de La Laguna de La Cruz realizadas en diversos periodos de muestreo. La figura superior muestra el aspecto normal de las aguas de la laguna, mientras que en la inferior, realizada en Julio de 1988, se aprecia el color de las aguas debido a la formación de cristales de carbonato cálcico.

contenido en sulfatos. Las condiciones de bajo potencial de oxidación-reducción causan la solubilización de hierro y manganeso, con lo que se aumenta la conductividad de las aguas (Vicente y Miracle, 1988). Durante el periodo de mezcla el mixolimnion óxico se amplía hasta los 18-19 m, en esta profundidad se localiza una pycnoclina profunda y permanente en donde se da el citado incremento de la conductividad. Este incremento de la densidad del agua facilita el acúmulo de materia orgánica procedente de la producción primaria de las capas superiores y como en esta zona predomina la descomposición se propicia la ampliación de las condiciones anóxicas, produciéndose la extinción de oxígeno a profundidades cada vez menores conforme

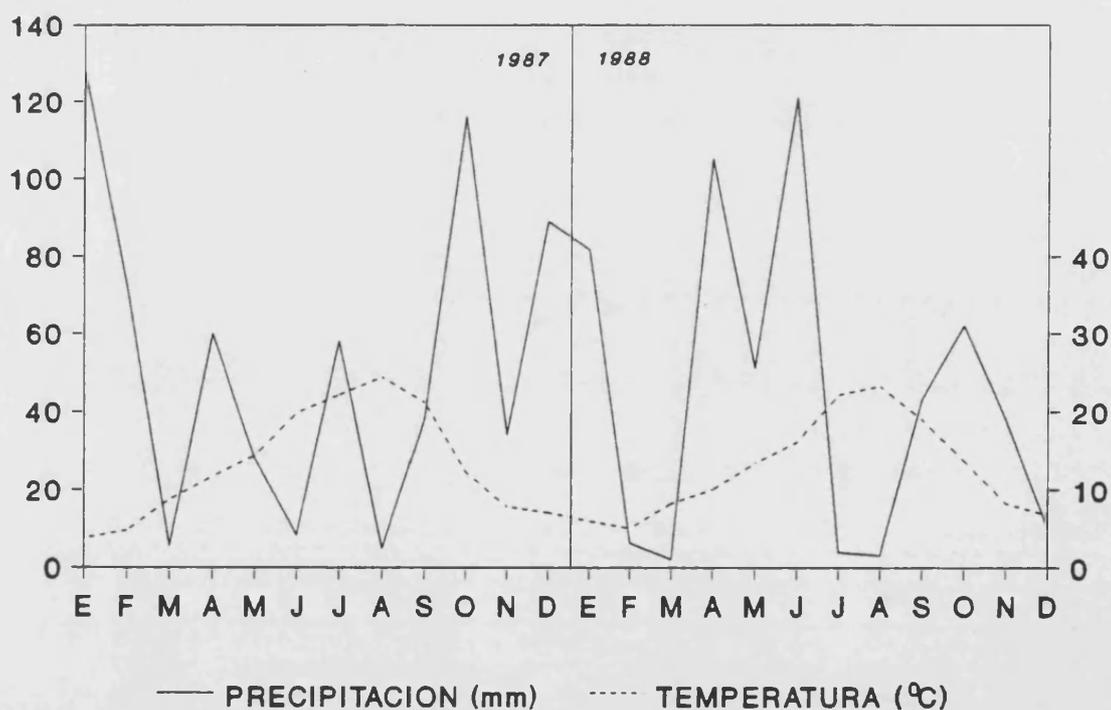


Figura 4.5. Diagrama climático con los datos del precipitación (escala situada a la izquierda) y temperatura ambiental (escala situada a la derecha) en la zona de muestreo durante el periodo de estudio; (datos cedidos por el Servicio Meteorológico de Valencia).

avanza el periodo de estratificación. Por ello encima de aquella picnoclina permanente, durante el periodo de estratificación térmica se establece otra picnoclina a nivel de la oxiclina. La laguna de La Cruz posee abundante material coloidal a nivel de la oxiclina impidiendo prácticamente la visión a 15 m; en realidad la existencia de material coloidal en esta zona está de acuerdo con un cierto gradiente de densidad en el que quedarían atrapadas las partículas, constituyendo una zona especialmente rica en materia orgánica. La laguna es totalmente cerrada, dependiendo su nivel y alimentación del nivel del acuífero, poseyendo un periodo de renovación del agua bastante lento que favorece la estratificación.

En cuanto al régimen climático en la zona, la figura 4.5 muestra el régimen de temperaturas y precipitaciones durante el periodo de estudio observándose que, en el año 1988 las precipitaciones durante la primavera son mucho mayores que en 1987, lo cual afecta al nivel del lago, que se mantuvo unos 0.5 cm más alto durante el año 1988 con respecto al nivel máximo medido en 1987 que correspondió al mes de junio. En general, se aprecia un descenso de las temperaturas en invierno, lo cual es consistente con un clima continental suave. Este hecho, hace que la laguna nunca se hiele en invierno, manteniéndose las temperaturas del agua del periodo invernal estudiado solo ligeramente inferiores a 6 °C.

Desde 1980 esta laguna ha sido objeto de diversas caracterizaciones limnológicas que han sido objeto de varias publicaciones en las que se puede encontrar la distribución vertical de rotíferos en los años 1981 y 1982 (Miracle y Vicente, 1983), la distribución vertical del fitoplancton en muestras obtenidas desde el año 1981 al 1985 (Rojo y Miracle, 1987) y de los correspondientes estudios de parámetros físico-químicos y microbiológicos durante el mismo periodo (Vicente y Miracle, 1988). Sin embargo, éstas se habían basado en muestras tomadas en intervalos de tiempo largos e irregulares debido a lo alejada que resulta esta localidad de nuestros laboratorios. Además los perfiles verticales fueron muestreados con botellas hidrográficas, con lo que se pierde mucha precisión en la distribución vertical de los organismos en las lagunas estratificadas.

En el presente trabajo se pretende efectuar un estudio sistematizado de la distribución de los rotíferos con métodos de muestreo más finos que permitan muestrear a muchas profundidades a intervalos más regulares en el tiempo, cubriendo ciclos anuales, especialmente el periodo de la sucesión que comienza en primavera y acaba a principios de otoño. En este sentido, el presente trabajo realizado sobre la laguna de La Cruz pertenece a un proyecto de estudio más amplio en

el que participan diversos investigadores. De esta forma, este trabajo se orienta al estudio de las comunidades de rotíferos. Sin embargo, gracias a esa labor de equipo es posible relacionarlos con los parámetros físico-químicos y fitoplanctónicos, obtenidos en las campañas de muestreo comunes. Recientemente se ha elaborado un estudio de la distribución vertical y sucesión estacional del fitoplancton de dicha laguna durante los años 1987 y 1988 (Dasi, 1990; Dasi y Miracle, 1991), así como también se disponen de los datos de los parámetros físico-químicos y microbiológicos del mismo periodo, constituyendo todos estos trabajos un intento de configurar un estudio limnológico completo y coordinado.

5. RESULTADOS

5.1 Descripción morfológica y ecológica de las principales especies de rotíferos

La clasificación de los rotíferos presenta algunos problemas, generalmente asociados a su gran variabilidad intraespecífica, motivo por el cual, en algunos casos es extraordinariamente difícil delimitar las especies congénicas. Dicha variabilidad en parte es debida a su reproducción, principalmente partenogenética y a su distribución, generalmente asociada a ambientes fluctuantes; además poseen unas altas tasas reproductivas, lo cual les permite alcanzar rápidamente grandes densidades. Esta descripción corresponde a una estrategia de la *r*, que comporta gran plasticidad y poca especialización de los caracteres. En un ambiente fluctuante, donde el ciclo vital es corto, la competencia generalmente baja y la densidad de población suele experimentar cambios bruscos, la supervivencia de los rotíferos está asegurada por la producción de huevos durables que resisten los cambios ambientales y que eclosionarán cuando las condiciones sean favorables, dando lugar a una efectiva colonización de nuevos habitats. De esta manera la reproducción partenogenética junto con una reproducción sexual que tiende al cruzamiento entre individuos estrechamente emparentados hace que algunas diferencias observadas sean, en realidad, diferencias entre clones, que responden más a una variación poblacional que a una diferenciación entre especies. Además, las comunidades de rotíferos muestran una marcada tendencia a estar constituidas por una serie de especies congénicas coexistentes, las cuales presentan una fragmentación genética intraespecífica (King, 1980; Serra y Miracle, 1983) que se interpreta como distintos niveles de una jerarquía adaptativa en correspondencia con los niveles de fragmentación en los parámetros ecológicos de los ambientes que habitan. Por todo ello, las formas o especies congénicas que coexisten en la laguna de La Cruz, se ordenarán por géneros. En la muestras se han identificado un total de 26 especies de rotíferos, de las cuales tan sólo 11, se presentaron de una manera habitual en proporción importante, perteneciendo el resto a especies litorales muy escasas y ocasionales en el plancton (géneros *Lecane* (5 spp.), *Machrochaetus* (2 spp.), *Heterolepadella*, *Colurella*, *Lepadella* y *Cephalodella*). Serán por tanto estas 11 especies las que a continuación se describan, ordenadas de acuerdo con Ruttner-Kolisko, 1974.

1. *Keratella* (Bory de St. Vincent, 1822)

Keratella quadrata (Müller 1786)

Syn: *Brachionus quadratus* (Müller 1786), *Keratella quadrata* (Bory de St. Vincent 1822), *Anuraea aculeata* (Ehrenberg 1832).

Dicho género se caracteriza por presentar un caparazón, dividido en campos, abombado por el lado dorsal y curvado o ligeramente aplanado por el lado ventral; no presentan pie y la loriga posee 6 espinas en el margen anterior. En general, la taxonomía de este género se basa en características de la loriga (Ruttner-Kolisko, 1974) aunque existe gran confusión en la literatura, puesto que debido a la extraordinaria variación de la longitud de las espinas posteriores las especies de *Keratella* constituyen uno de los ejemplos clásicos ciclomorfosis en rotíferos. No obstante, a pesar del gran número de especies y formas, la especie localizada pertenece al grupo *quadrata* (Ruttner-Kolisko, 1974; Koste, 1978), en el cual se encuentra la especie típica, (*K. quadrata*) así como una gran variedad de formas (f. *frezneli* = *divergens*, f. *reticulata* = *dispersa*, f. *valga* = *valgoides* y f. *platei*).

La forma localizada en la laguna de La Cruz presenta el relieve poligonal de la loriga propio de *K. quadrata*, con dos hexágonos centrales cerrados de cuyos vértices parten prolongaciones laterales y un tercer hexágono incompleto, del que parten también prolongaciones laterales. Sus características corresponden pues a la forma considerada como típica (*K. quadrata* grupo *quadrata*); loriga de paredes delgadas y espinas posteriores arqueadas de igual o desigual longitud y un tamaño de 150-350 µm.

Keratella quadrata, en nuestras muestras, presenta una tendencia a situarse en las capas microerófilas a mediados de verano, encontrándose prácticamente ausente, a finales de verano y en los meses fríos, en general, ha sido descrita como una especie euriterma, cuyas variaciones dependen más de la disponibilidad de alimento que de factores estacionales (May, 1983). También ha sido considerada como indicadora de aguas eutróficas (Pejler 1965) sin embargo, dicho carácter ha sido puesto en duda en trabajos más recientes (Guiset, 1977). Posee unos amplios rangos de preferencia en cuanto al oxígeno y pH (5-11 mg/l de oxígeno y de 4-10 en la

escala del pH; Berzins y Pejler, 1987, 1989c) y se ha observado también en otros lagos que puede presentar una cierta tendencia a situarse en capas microaerófilas (Alfonso *et al.*, 1987).

2. *Anuraeopsis* (Lauterborn 1900)

El género *Anuraeopsis* presenta un caparazón desprovisto de espinas en el borde anterior. Dicho caparazón presenta sus placas unidas mediante una membrana cuticular extensible, y su parte dorsal es abombada mientras que la ventral es plana. Además, posee en el extremo posterior un gran órgano cuticular, llamado órgano de Weber, invaginable pero que puede sobresalir entre las placas dorsal y ventral (Koste, 1978). De este género se han reconocido tan solo 7 u 8 especies y su distribución ha sido considerada clásicamente como tropical (Pejler, 1977a; Dumont, 1983).

Anuraeopsis fissa (Gosse 1851)

Syn: *Anuraea fissa* (Gosse 1851); *Anuraea hypelasma* (Gosse 1886); *Anuraeopsis hypelasma* (Lauterborn 1900).

De las especies de *Anuraeopsis* descritas, solamente la especie cosmopolita *Anuraeopsis fissa*, es frecuente en Europa dónde tradicionalmente ha sido considerada una especie de verano o de aguas cálidas (Ruttner-Kolisko 1972a). Sin embargo, a medida en que los estudios de los perfiles verticales se han realizado de una forma más completa, se han encontrado abundantes concentraciones de esta especie en capas de agua cercanas al sedimento o fondo de lagos escandinavos (Pejler 1961), incluso bajo el hielo en condiciones de baja oxigenación (Pejler 1957a). Los estudios de la distribución de rotíferos en áreas extensas de latitudes altas caracterizan a *A. fissa* como una especie eutrófica (Mäemets 1983) o indican que puede colonizar los ambientes en los que se detectan bajas concentraciones de oxígeno (Berzins y Pejler, 1989c). También han sido encontrados individuos de dicha especie en la oxiclina de una laguna eutrófica de Inglaterra (Stewart y George 1987).

Anuraeopsis fissa se caracteriza por ser una especie de pequeño tamaño (90-110 μm), cuya distribución ha sido asociada a ambientes subtropicales (Pant *et al.*, 1985), pequeños estanques o zonas litorales de lagos, durante el verano (Pejler, 1957b; Ruttner-Kolisko, 1972a). En España,

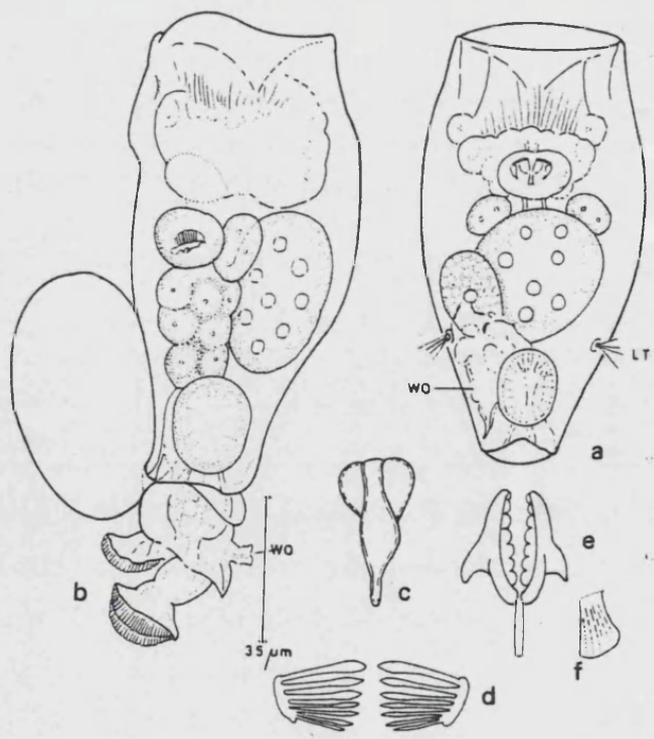
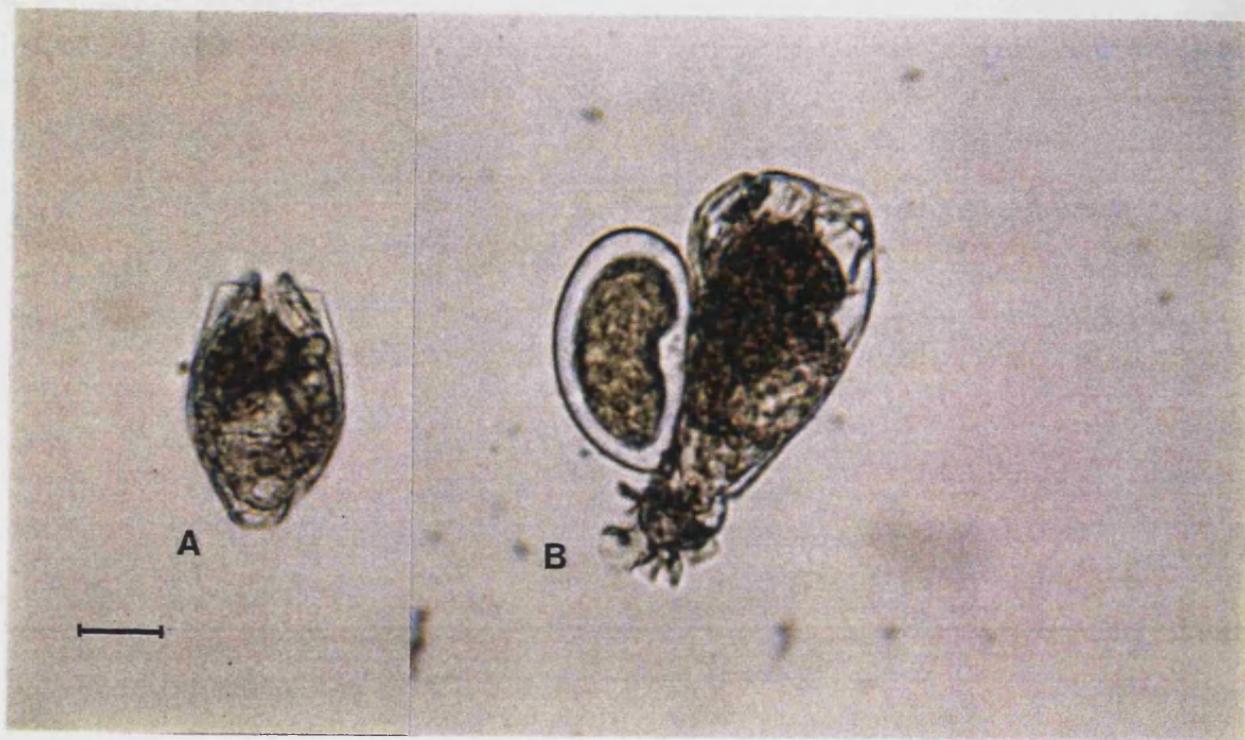


Figura 5.1. Parte superior: microfotografía de dos hembras de las especies *Anuraeopsis fissa* (A) y *Anuraeopsis miraclei* (B). Parte inferior: *A. miraclei*, dibujos tomados de Koste (1991). Vista ventral (a) y lateral (b) con el órgano de Weber (35 μ m) y las piezas del mastax: (c) manubrium, (d) unci, (e) uncus y (f) fulcrum. La barra horizontal equivale a 29 μ m.

es una especie típica de la oxiclina de lagos kársticos meromícticos o de lagos kársticos que sufren una estratificación en verano (Miracle, 1976; 1977; Miracle y Vicente, 1983) así como también está presente en el lago del Cisó, que posee un gran hipolimnion anóxico, siendo anaeróbico hasta la superficie en invierno (Alfonso y Miracle 1987).

Anuraeopsis miraclei (Berzins-Koste, 1991)

La especie *Anuraeopsis miraclei* (figura 5.1) ha sido descrita recientemente como una nueva especie localizada en la laguna en estudio y lagunas de las inmediaciones. La morfología de dicha especie llamó la atención a M.R. Miracle cuando la recogió por primera vez en el Lagunillo del Tejo, en el año 1980, de manera que algunas de las muestras fueron enviadas a B. Berzins, quien confirmó la nueva morfología como una nueva especie a la que denominó *A. miraclei*. Desgraciadamente los resultados no fueron publicados y recientemente, W. Koste realizó una descripción de dicha especie a partir de muestras procedentes de la laguna de La Cruz (Koste, 1991), donde se reafirma su situación como especie nueva. *Anuraeopsis miraclei* tan solo se había encontrado en la laguna de La Cruz y el lagunillo del Tejo próxima a ella, sin embargo recientemente también se ha encontrado en los Alpes (Austria), en un habitat similar: la oxiclina de finales de invierno del lago kárstico Grosser Feichtauersee (Koste, *comunicación personal*). Sus principales características que la diferencian de la especie *A. fissa fissa*, son un mayor tamaño (125-169 μm), una forma rectangular frente a la forma ovalada de *A. fissa fissa*, diferencias en la morfología del órgano de Weber, así como diferencias en la forma del huevo y en el tamaño del mástax, entre otras.

3. *Trichocerca* (Lamarck 1801).

Trichocerca similis (Wierzejski 1893)

Syn: *Coelopus similis* (Wierzejski 1893); *Rattulus bicornis* (Western 1893).

Las especies de este género presentan un cuerpo cilíndrico más o menos alargado, y algunas veces retorcido asimétricamente. Sobre el dorso en posición oblicua existe un campo estriado delimitado por quillas. La especie localizada aquí es reconocible fácilmente de entre las demás de

este género debido a la presencia de dos espinas de la misma longitud en el borde anterior de la loriga y por poseer longitudes casi iguales en los dos dedos del pie y un tamaño medio de 150-200 μm . En las muestras también se encontraron unos pocos individuos de la especie *T. rattus*, cuya mayor proporción se detectó en el mes de julio de 1987.

Trichocerca similis, en nuestras muestras, se presenta como una especie de verano que se encuentra a concentraciones de oxígeno superiores a 8 mg/l, no obstante, sólo en una única ocasión, se encontraron algunos individuos de dicha especie en zonas deficientes de oxígeno, sin embargo, parece ser que muestra una cierta tendencia a situarse en capas epimetalméticas (Matveeva, 1986). Esta especie se ha encontrado en rangos de temperatura que oscilan entre los 9 y los 21°C (Berzins y Pejler, 1989a). También se ha descrito en gran cantidad de ambientes, por ejemplo, ha sido encontrada incluso en aguas ricas en humus, con bajos valores de pH (Pejler, 1965; Berzins y Pejler, 1987), así como en aguas cálidas tales como lagos de Uganda y Brasil (Green, 1967; Green, 1972) y parece característica del plancton de verano de las lagunas kársticas, es decir en lugares con pH altos.

4. *Asplanchna* (Gosse 1850)

Asplanchna girodi (de Guerne 1888)

Se trata de organismos de gran tamaño (500-700 μm) y aspecto vesiculoso, por lo general completamente transparentes. Poseen una cutícula muy fina con ausencia de loriga. No presentan, pie, ni intestino, ni ano y poseen dos pequeñas manchas oculares rojas. La especie localizada en la laguna de La Cruz corresponde a *A. girodi* perteneciente al grupo *girodi-brightwelli-sieboldi* en el que se incluyen una serie de formas muy parecidas (*A. intermedia*, *A. sylvestris* y los sinónimos de *sieboldi*: *amphora*, *leydigi* y *ebbesborni*). *A. girodi* se distingue de las otras formas por su mástax sin apófisis en la base de las ramas y la ausencia o debilidad, si existe, del diente interno de las ramas (De Beauchamp 1951).

Asplanchna girodi, es una especie de rotífero depredadora, descrita en aguas alcalinas (Guiset, 1977) que ha sido localizada en el mixolimnion de verano de lagos de zonas templadas (Miracle y Vicente, 1983), mostrando amplios rangos de tolerancia a la temperatura (Mikschi, 1989). Aunque se ha dicho de su distribución que es independiente del oxígeno (Matveeva,

1986), algunos autores la relacionan con concentraciones altas de oxígeno, superiores a 8 mg/l (Mikschi, 1989), y ésto parece consistente con nuestros resultados.

5. *Synchaeta* (Ehrenberg 1832)

Synchaeta pectinata (Ehrenberg 1832)

Syn: *Synchaeta mordax* (Gosse 1851)

Son animales de forma cónica o acampanada (300-500 μm), presentando una región cefálica abombada, un órgano rotatorio con aurículas ciliadas laterales y cuatro membranelas sensoriales largas y rígidas entre otras características distintivas. Las especies de *Synchaeta* son muy difíciles de distinguir una vez han sido fijadas con formol debido a que sufren un fuerte grado de contracción que afecta gravemente a su morfología, siendo necesario el realizar un estudio de los mástax para proceder a su identificación. En todos los casos donde dicho estudio ha sido realizado los individuos pertenecieron a la especie *S. pectinata*.

A *Synchaeta pectinata*, al igual que otros autores (Berzins y Pejler, 1989c; Mikschi, 1989) la encontramos como una especie que muestra preferencia por altos rangos de oxígeno. Es característica su aparición en primavera y otoño en muchos de los lagos en donde se ha estudiado el ciclo anual (Miracle, 1976). También ha sido localizada en aguas alcalinas (Guiset, 1977) y en amplios rangos de pH (5-9; Berzins y Pejler, 1987).

6. *Polyarthra* (Ehrenberg 1834)

Polyarthra dolichoptera (Idelson 1925)

Syn: *P. platyptera* var. *dolychoptera* (Idelson 1925); *P. dolichoptera* (Carlin 1943).

Dicho género se caracteriza por la ausencia de pie y la posesión de cuatro penachos con tres aletas o palas torácicas cada uno, entre otras características. Los criterios de clasificación se suelen basar en tres aspectos, que son, la morfología de las palas, el número de núcleos del vitelarium y la antena lateral. No obstante, resulta particularmente difícil distinguir especies entre una serie de poblaciones más o menos diferentes, no siendo evidente la interpretación de hasta qué punto las especies son o no capaces de intercambio genético.

Un carácter adecuado para la distinción de las especies del género *Polyarthra* es el número de núcleos del vitelario, puesto que este número es bajo y constante en todas las formas de este género, siendo de 8 en *P. dolichoptera* y en otras especies relacionadas tales como *P. vulgaris* y *P. major* (Ruttner-Kolisko, 1974). Otros caracteres utilizados en la distinción de dichas formas son la longitud y anchura del cuerpo y de las aletas, pero existe toda una serie de grados intermedios, por lo que Pejler (1956) hipotetizó que existía introgresión. Debido a ello en trabajos antiguos se consideraron *dolichoptera* y *vulgaris* como subespecies (Sudzuki 1964; Pourriot, 1965) y *major* como variedad (Sudzuki 1964). Sin embargo, actualmente se describen como especies bien diferenciadas. Dada la dificultad de diferenciar las especies de *Polyarthra* durante los recuentos, los individuos de este género fueron contados juntos. Sin embargo, los especímenes aislados para su identificación de un gran número de muestras pertenecieron siempre a la especie *Polyarthra dolichoptera* (90-120 μm).

En cuanto a la distribución de *Polyarthra dolichoptera*, la encontramos durante todo el periodo de estudio, apareciendo en los meses más fríos en todo el perfil y en capas más profundas durante la estratificación, formando poblaciones de gran densidad. De hecho, tradicionalmente, ha sido considerada como una especie estenoterma fría, muy dispersa en la escala de pH, (May, 1983; Berzins y Pejler, 1987), tolerante a amplios rangos de temperatura y oxígeno, siendo capaz de migrar hacia las zonas de la oxiclina donde presenta frecuentemente abundancias elevadas (Culver y Brunskill, 1969; Miracle y Vicente, 1983; Alfonso *et al.* 1987; Mikschi, 1989). Se ha puesto de manifiesto en multitud de ocasiones su alimentación con criptomonas ya que frecuentemente se encuentra en zonas en las que abundan dichas algas (Edmonson, 1965; Stewart y George, 1987) y además, éstas, se utilizan en los cultivos experimentales de *Polyarthra* (Gilbert y Bogdan, 1984).

7. *Filinia* (Bory St. Vincent 1824)

Syn: *Triarthra* (Ehrenberg 1832); *Tetramastix* (Zacharias 1898); *Fadeewella* (Smirnoz 1928).

Filinia hofmanni (*F. cf. longiseta* nach. Hofmann, 1979).

Se trata de organismos iloricados con ausencia de pie, que poseen tres apéndices sediformes, dos anteriores, situados por debajo de la corona, y un apéndice caudal. La taxonomía de este grupo se ha basado principalmente en unas pocas características morfológicas, tales como, medidas de los apéndices, distancia de la inserción del apéndice posterior al extremo caudal del cuerpo, índice de la longitud de los apéndices etc. La especie encontrada pertenece al grupo de especies *longiseta-terminalis-hofmanni* (Koste, 1980b; Ruttner-Kolisko, 1974). *Filinia hofmanni* ha sido descrita recientemente y se distingue de *F. longiseta* en la constitución del mástax (15/15 dientes en el unci en *F. hofmanni* frente a 21/21 en *F. longiseta*) y de *F. terminalis* en la inserción del apéndice caudal, así como en sus requerimientos ecológicos (Koste, 1980b). *Filinia hofmanni* es la especie identificada en la laguna de La Cruz, sin embargo, es poco abundante en ella, a diferencia de lo de lo que ocurre en otros lagos estratificados, en los que forma también importantes poblaciones en la oxiclina (Hofmann, 1987).

8. *Hexarthra* (Schmarda 1854)

Syn: *Pedalion* (Hudson 1871); *Pedalia* (Barrois 1878).

Hexarthra mira (Hudson 1871)

Syn: *Pedalion mira* (Hudson 1871); *Pedalia mira* (Barrois 1878); *Pedalion mirum* (Hudson y Gosse 1886).

Los individuos pertenecientes a este género se caracterizan por poseer seis apéndices de diversa longitud terminados en sedas plumosas dispuestas en abanico. Dichos apéndices se encuentran insertados en potentes músculos. La especie observada en la laguna de La Cruz, *H. mira*, se caracteriza por la presencia de dos apéndices caudales tentaculiformes, posee *uncus* con 6 dientes, brazo ventral largo algo superior a la longitud del cuerpo, corona de cilios con doble labio y un tamaño medio de 250 μm .

Las especies de *Hexarthra* son más bien de aguas cálidas. *H. mira* es la más frecuente y presenta una amplia distribución en muchas clases de aguas. Otras especies del género se encuentran con preferencia en aguas alcalinas o ligeramente salinas y cálidas, tal es el caso de *H. fennica*.

H. mira, ha sido descrita tradicionalmente como una especie metalimnética de verano (Miracle, 1976; Miracle y Vicente 1983; Alfonso *et al.*, 1987). Dicha especie ha sido localizada también en lagos africanos altamente alcalinos y en ríos de Brasil (Pejler, 1974; Green, 1972), corroborando el hecho de que se trata de una especie que muestra una cierta preferencia por altos rangos de temperatura. En nuestro caso aparece como una especie de verano, mostrando rangos de temperatura que oscilan entre los 8 y los 24°C, aunque sus rangos de preferencia se sitúan en el entorno de los 18 a los 24°C, intervalo que está de acuerdo con las observaciones de Berzins y Pejler (1989b; 15-23°C). En cuanto al rango de preferencia de pH descrito para esta especie en Suecia se localiza entre 6.9 y 7.8 (Berzins y Pejler, 1987); sin embargo, en España se encuentra en un amplio rango de valores (Margalef *et al.*, 1976). Su distribución respecto al oxígeno parece encontrarse en el rango de 8 a 12 mg/l aunque puede tolerar valores más bajos de este parámetro (Berzins y Pejler, 1989c).

9. *Ascomorpha*

Ascomorpha ecaudis (Perty 1850)

syn: *Sacculus viridis* (Gosse 1851); *Ascomorpha helvetica* (Perty 1852), *Ascomorpha germanica* (Leyding 1854) *Sacculus germanicus* (H. & G. 1889).

Ascomorpha saltans (Bartsch 1870)

Syn: *Sacculus hyalinus* (Kellicott 1988?); *Ascomorpha agilis* (Zacharias 1893); *Ascomorpha hyalina* (Jennings 1901?).

Las especies de *Ascomorpha*, poseen forma de saco ovalado ausencia de pie, un trophi virgado. La especie *A. ecaudis* (130-200 µm) se caracteriza por poseer cuatro manchas periféricas de excrementos y coronas con membranelas ciliadas, mientras que *A. saltans* se caracteriza por la posesión de un tentáculo sobre la corona y una mancha central de excrementos

y un tamaño menor que la anterior (100-150 μm).

Las especies de *Ascomorpha* localizadas, *A. ecaudis* y *A. saltans* han sido descritas como especies típicas de verano (Berzins y Pejler, 1989b) sin embargo, según la literatura, la gran diferencia en la distribución entre *A. saltans* y *A. ecaudis* radica en los rangos de preferencia a las condiciones del pH siendo *A. ecaudis* típica de lagos escandinavos acidificados (Berzins y Pejler, 1987), mientras que *A. saltans* muestra sus máximos desarrollos para valores de 7-9 en la escala del pH. En nuestro caso dicha diferencia no parece tan acusada, aunque el rango de pH en el que se presenta *A. saltans* es mucho más estrecho que el de *A. ecaudis*, siendo considerada como especie indicadora de aguas oligotróficas (Matveeva, 1986). Ambas especies han sido descritas como tolerantes a un amplio rango de concentración de oxígeno, pero que muestran sus preferencias por altas concentraciones (Berzins y Pejler, 1989c; Mikschi, 1989). Además *A. saltans* ha sido descrita como una especie que se presenta principalmente a principio de verano y otoño coincidiendo con las máximas poblaciones de *Ceratium* (Ruttner-Kolisko, 1974).

5.2 Distribuciones de rotíferos en la Laguna de La Cruz

Distribución en el perfil vertical

La laguna de la Cruz, tal y como se ha indicado anteriormente, es una laguna meromíctica que presenta una estratificación, que lleva asociada un gradiente en los principales parámetros físico-químicos tales como temperatura, pH, conductividad, potencial de óxido-reducción y oxígeno (figuras 5.2A y 5.2B). De ellos resultan particularmente interesantes los perfiles referentes a la temperatura y al oxígeno, ya que muestran grandes variaciones y es en las profundidades de máximos gradientes de estos parámetros donde se establecen poblaciones muy densas de rotíferos.

Respecto al perfil de temperatura, cabe destacar que presenta una distribución más o menos homogénea en los meses más fríos (noviembre, febrero y abril; figura 5.2) durante los cuales la laguna no presenta una estratificación vertical en el mixolimnion, mostrando tan solo una ligera variación térmica al alcanzar las capas anóxicas profundas. Como es típico de los lagos

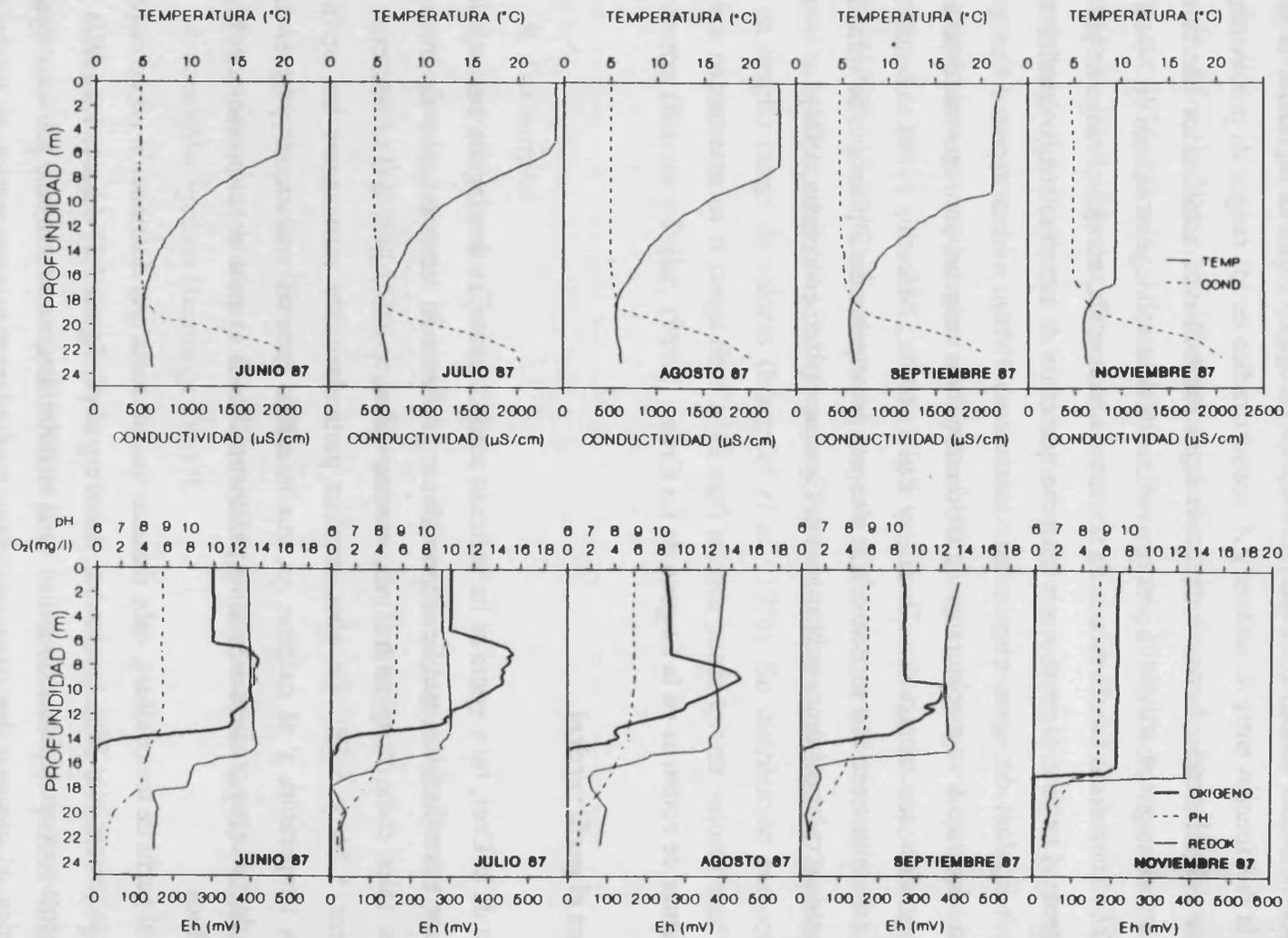


Figura 5.2A. Perfiles verticales de los principales parámetros fisicoquímicos (temperatura y conductividad (figura superior) y oxígeno potencial redox y pH (figura inferior) determinados en la laguna de La Cruz durante el año 1987.

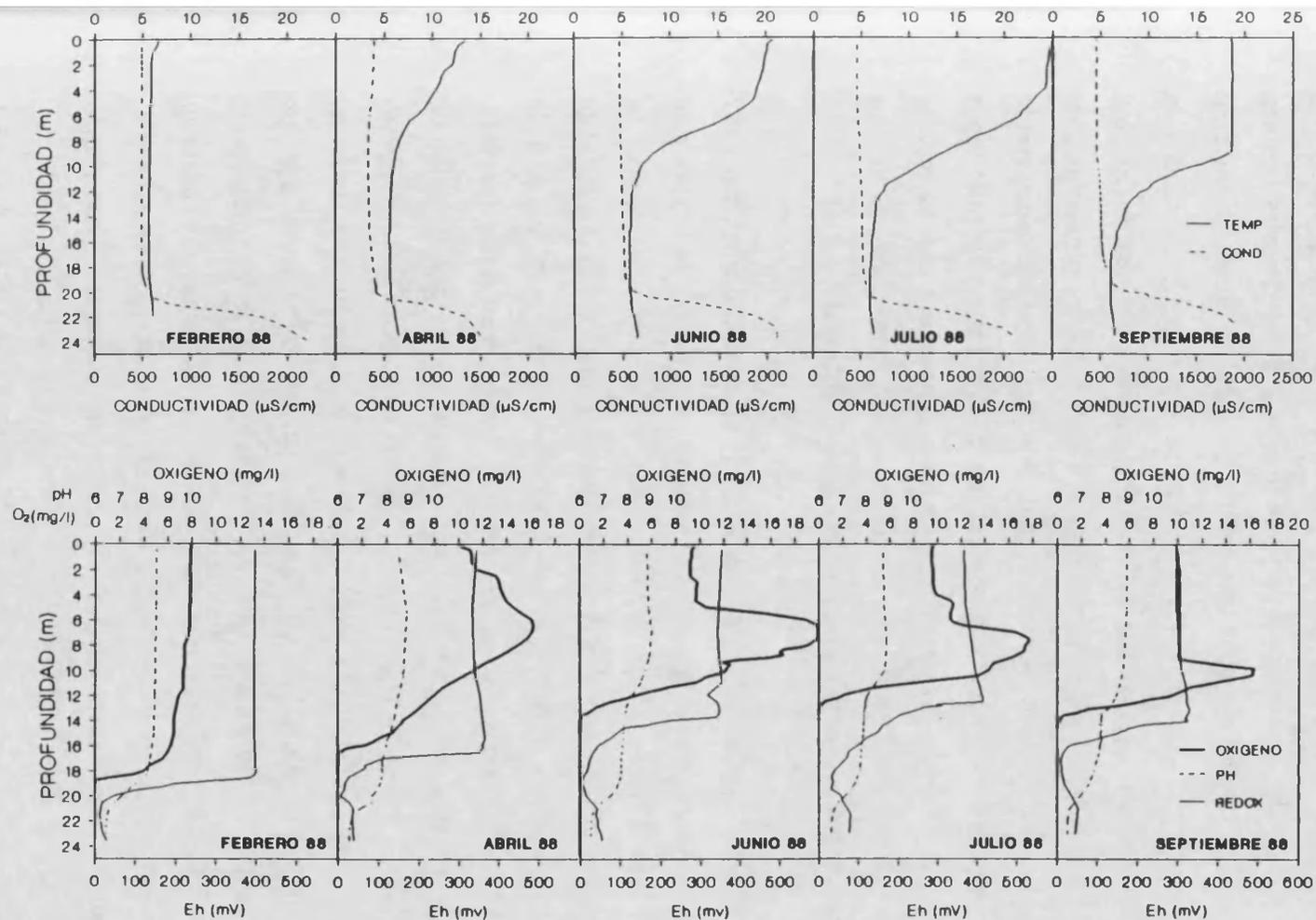


Figura 5.2B. Perfiles verticales de los principales parámetros fisicoquímicos (temperatura y conductividad (figura superior) y oxígeno potencial redox y pH (figura inferior) determinados en la laguna de La Cruz durante el año 1988.

meromícticos en el molimolimnion la temperatura se mantiene constante, en este caso de 6 a 6.5°C, por lo que en invierno y primavera se da una inversión de temperatura en la zona anóxica. El gradiente es muy acusado en los meses de verano en los cuales la laguna presenta una termoclina o metalimnion bien marcado. Asimismo, el perfil vertical de oxígeno muestra también grandes cambios estacionales, siendo más o menos homogéneo durante los meses de invierno hasta llegar a la profundidad de extinción, mientras que durante los meses más cálidos la concentración de oxígeno muestra un espectacular máximo metalimnético a partir del cual comienza una oxiclina que delimita la interfase óxico-anóxica. Estos picos metalimnéticos de oxígeno presentan valores muy superiores al porcentaje de saturación y están relacionados con la actividad fotosintética de la población fitoplanctónica presente en las diversas capas; tales picos se sitúan a más profundidad conforme va avanzando el verano, desaparecen con la mezcla vertical de las aguas, resurgiendo en primavera. En el periodo estudiado alcanzaron sus valores máximos en junio de 1988, periodo en el cual la producción primaria es máxima.

En los perfiles correspondientes al potencial de óxido-reducción se puede observar una doble redoxiclina en verano; la primera se detectó hacia los 15 m de profundidad en el año 1987 y hacia los 13 m en 1988 coincidiendo su inicio con la extinción de oxígeno; la segunda se encuentra alrededor de los 18-22 m y presenta una menor variación en el rango de profundidades. En la época de mezcla las dos redoxiclinas se funden en una sola. El potencial de óxido-reducción experimenta un ligero aumento en el fondo debido en gran parte a la disminución del pH. En nuestro caso, dado que no se han detectado rotíferos en capas anóxicas, los cambios de los diversos parámetros que se den a profundidades superiores a la extinción de oxígeno, como los mencionados del potencial de óxido-reducción, no serán considerados, puesto que sólo se tendrán en cuenta las profundidades hasta donde se hayan encontrado rotíferos. Igualmente en los perfiles para los valores de conductividad, se puede observar que los gradientes más acusados se dan a profundidades que por lo dicho caen fuera de los intereses de este estudio, permaneciendo los valores de las profundidades sometidas a estudio bastante constantes a lo largo de todo el perfil. El perfil vertical de los valores correspondientes al pH, también presenta valores más o menos homogéneos en las capas oxigenadas, mostrando discontinuidades a partir de las capas en las que se produce la extinción de oxígeno.

En cuanto a la distribución de los organismos en el perfil vertical, las figuras 5.3 y 5.4 muestran los perfiles verticales de las 11 especies más importantes localizadas en la laguna de

La Cruz. Además se ha representado conjuntamente el perfil de oxígeno correspondiente para cada una de las profundidades y meses en los que se realizaron los muestreos. En dichas figuras, puede apreciarse una distinción entre especies epi-metalimnéticas (fig. 5.4) situadas por encima del gradiente que lleva a la extinción del oxígeno y especies hipolimnéticas (fig. 5.3) cuyos máximos se sitúan en dicho gradiente.

Dentro de segundo grupo de especies mencionado, es decir el de las especies hipolimnéticas se encuentran *A. miraclei*, *A. fissa*, *F. hofmanni*, *P. dolichoptera* y *K. quadrata*. *A. miraclei* en la laguna de La Cruz se encuentra restringido en las capas más profundas, en las cuales las concentraciones máximas de oxígeno se sitúan por debajo de 1 mg/l. Durante los periodos de mezcla, aunque su distribución era más dispersa en la columna de agua, y se encontraba en bajas proporciones, siempre mantenía densidades superiores en la oxiclina, de aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que en las capas superiores. En general, las especies que mostraron una mayor tendencia a situarse en la oxiclina además de *Anuraeopsis miraclei* (Koste 1991), fueron *A. fissa* y *Filinia hofmanni*.

Filinia hofmanni es una especie que muestra generalmente sus máximos a las mismas profundidades que *A. miraclei*, aunque más dispersa en el perfil vertical. Sin embargo, los datos revelan que durante el periodo estudiado fue bastante escasa, no mostrando grandes densidades en ninguna capa.

La distribución de *Anuraeopsis fissa* es más amplia que la de las dos especies mencionadas anteriormente, puesto que aunque presenta una tendencia a situarse en la oxiclina, manteniendo abundantes poblaciones en capas profundas, principalmente durante finales de verano y principios de otoño del año 1988, también se encuentra en capas más superficiales, siendo especialmente abundante en el metalimnion, a principios de verano y siempre se sitúa a profundidades por encima de *A. miraclei*, cuando esta última es abundante.

Las otras dos especies hipolimnéticas, *Polyarthra dolichoptera* y *Keratella quadrata* presentan poblaciones más superficiales, sobre todo durante invierno y primavera, pero muestran una migración hacia capas profundas en el verano, presentando entonces una distribución hipolimnética.

Los resultados a partir del muestreo a pequeña escala en la oxiclina muestran que existe una segregación entre los picos de densidad de las especies hipolimnéticas. A finales de primavera y verano (junio y julio) *K. quadrata* presentaba su máximo 10-20 cm por encima de *P.*

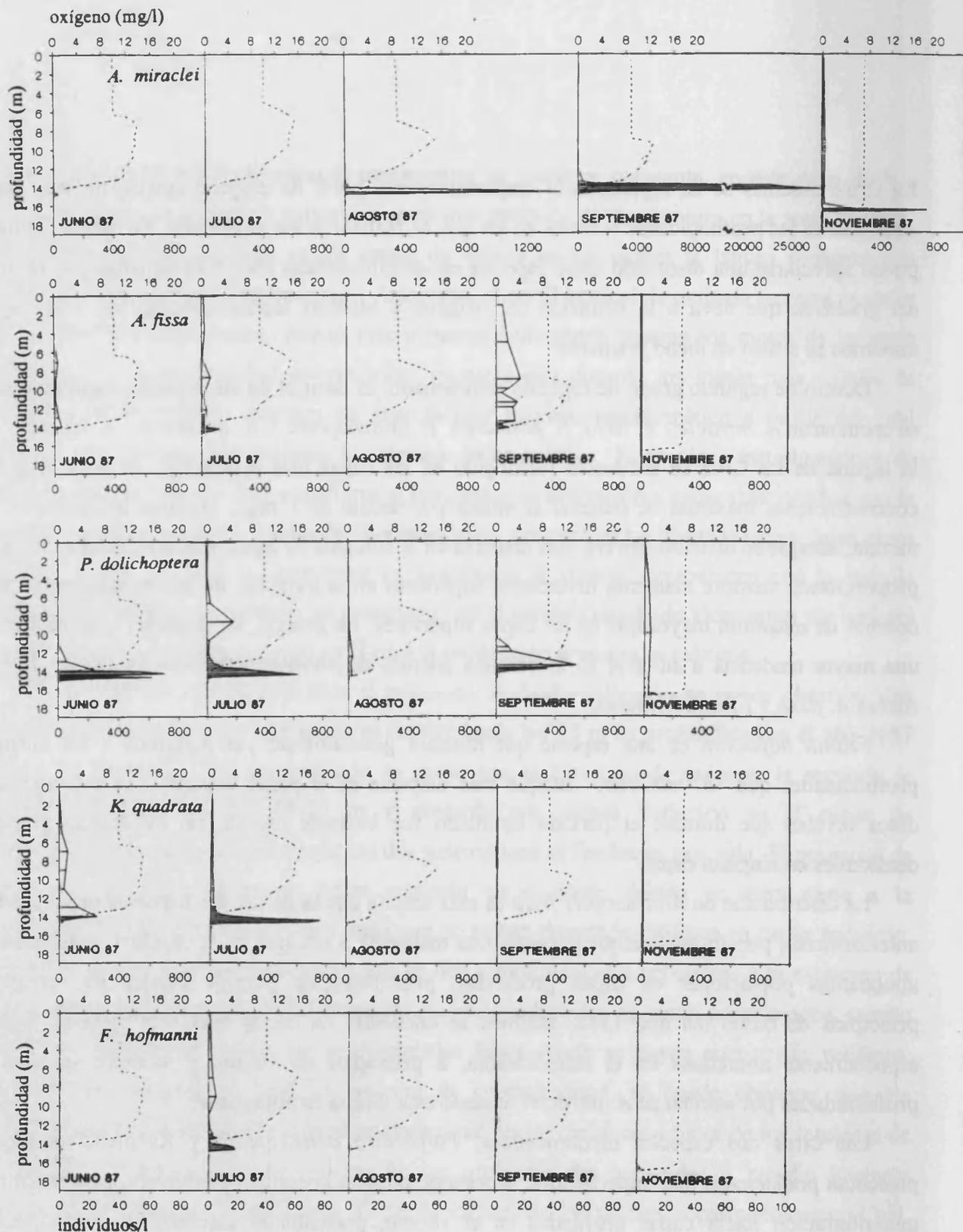


Figura 5.3, A y B. Distribución vertical de las especies de rotíferos *Anuraeopsis miraclei*, *Anuraeopsis fissa*, *Polyarthra dolichopectera*, *Keratella quadrata* y *Filinia hofmanni* en la laguna de La Cruz. En trazo discontinuo se muestra la concentración de oxígeno correspondiente. La escala de *Filinia hofmanni* es 10 veces mayor respecto de las otras especies, debido a su escasa abundancia. (Nótese que la escala de la especie *A. miraclei* ha tenido que ser reducida 10 veces en el mes de septiembre de 1987 debido a la gran cantidad de individuos). A. Año 1987.

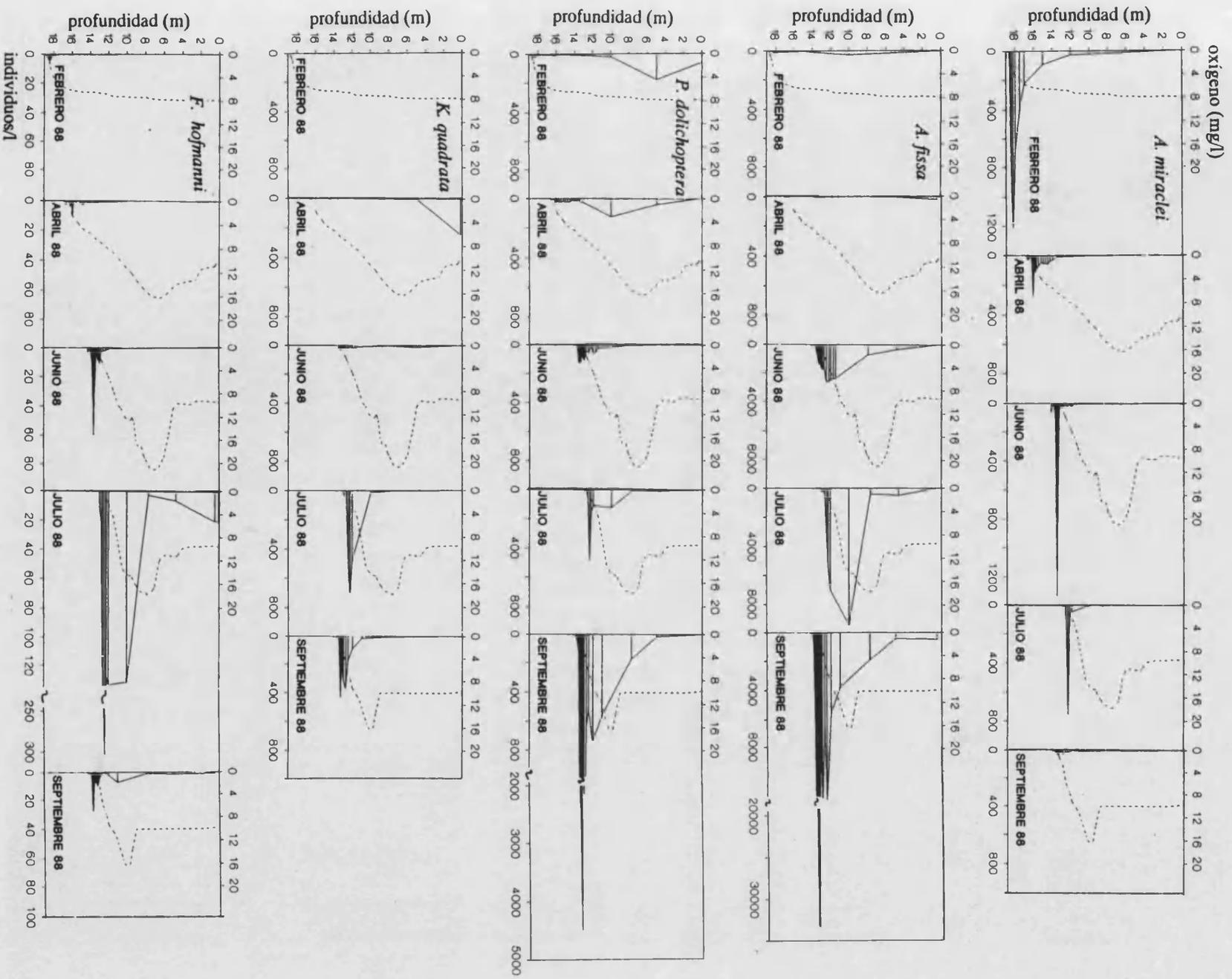


Figura 5.3, B. Año 1988.

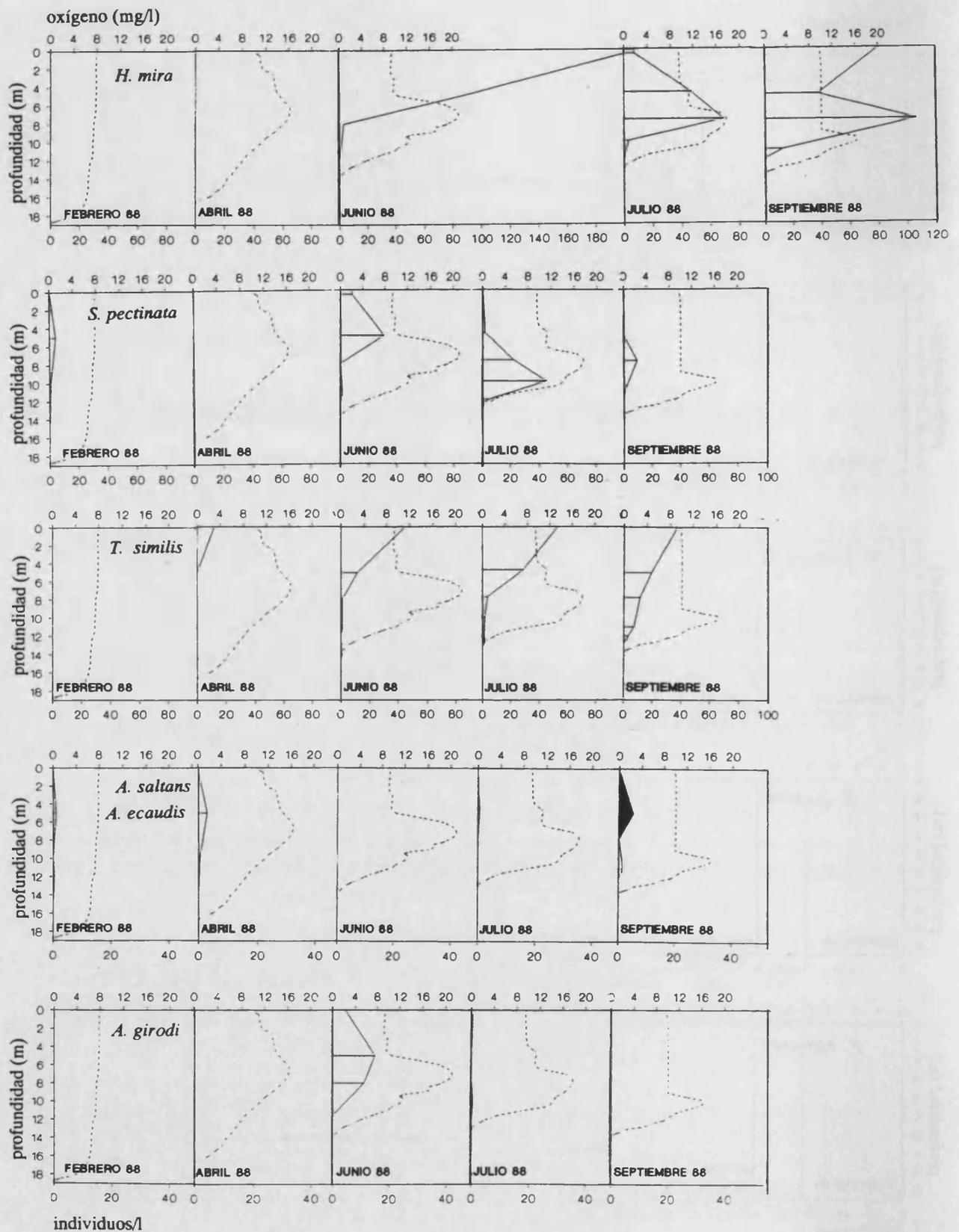


Figura 5.4, A y B. Distribución vertical de las especies de rotíferos *Hexarthra mira*, *Synchaeta pectinata*, *Trichocerca similis*, *Ascomorpha ecaudis*, *Ascomorpha saltans* (negro) y *Asplanchna girodi* en la laguna de La Cruz.. En trazo discontinuo se muestra la concentración de oxígeno correspondiente. (Las dos especies de *Ascomorpha* y *A. girodi* están representadas a una escala dos veces mayor). A. Año 1987.

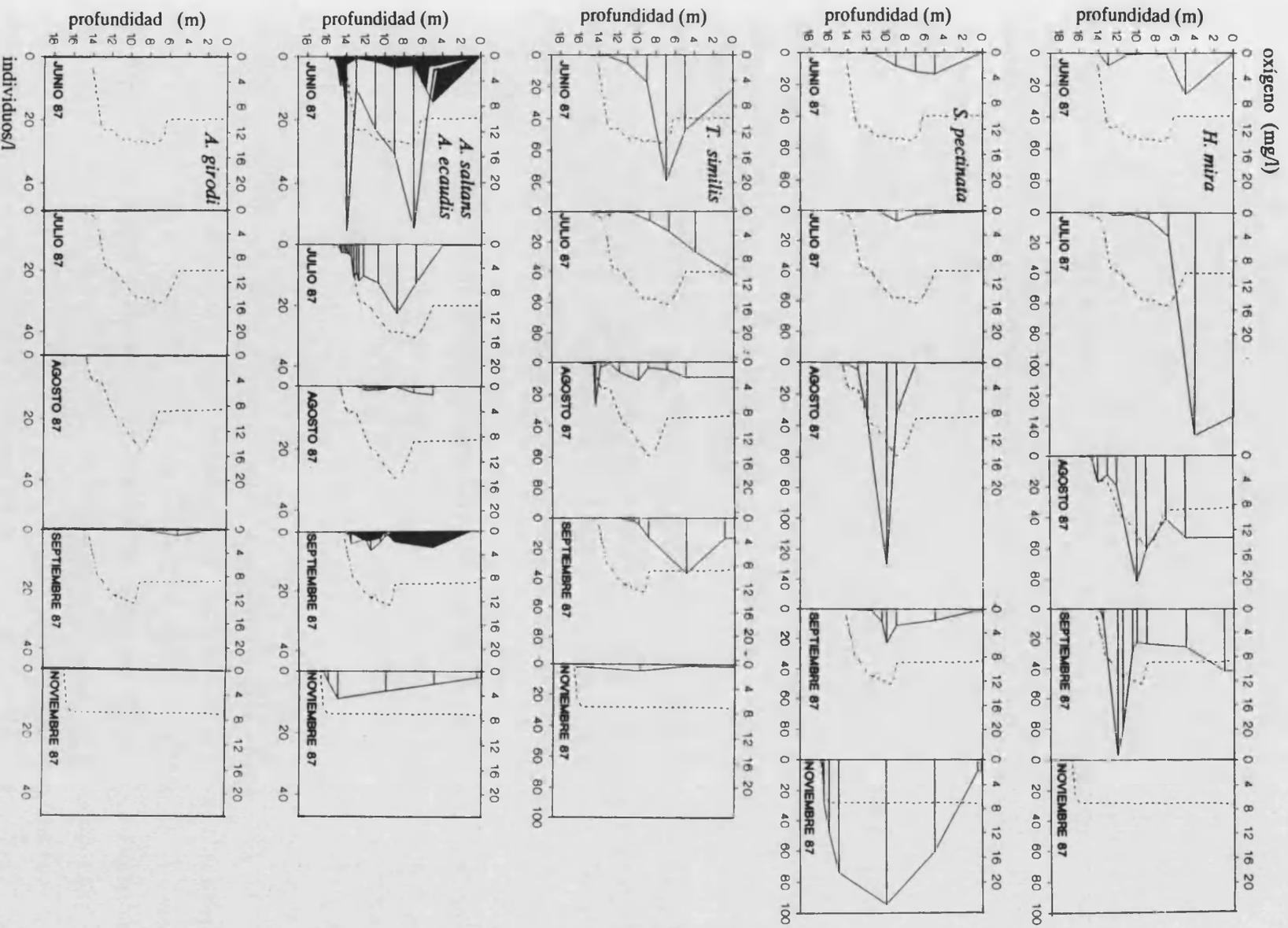


Figura 5.4, B. Año 1988.

dolichoptera y esta última en la misma profundidad o en ocasiones 10 cm por encima, que *A. fissa* y 10-20 cm por encima de *A. miraclei* o *F. hofmanni* (ver apéndices A y B). Sin embargo, *P. dolichoptera* es capaz de pequeñas migraciones diarias las cuales podrían cambiar ligeramente la distribución durante la noche. *P. dolichoptera* asimismo, muestra en algunos casos picos secundarios en el metalimnion (por ejemplo en julio de 1987). Esto puede ser debido a otros ecotipos o incluso a alguna proporción de especies relacionadas con ella tal y como *P. vulgaris* muy difícilmente distinguible en los recuentos.

Los perfiles verticales de las especies que muestran desarrollos máximos en las capas más superficiales y bien oxigenadas corresponderían a las figura 5.4. Sus densidades poblacionales fueron mucho menores que las de las especies hipolimnéticas (Obsérvese que la escala en estas figuras es inferior que las de las otras especies, a excepción de *F. hofmanni*). *Hexarthra mira* es una especie que ocupaba el epilimnion a principios del verano pero que conforme avanzaba la estación situaba su máxima densidad en el metalimnion, ocasionalmente con un pico secundario en superficie. *Trichocerca similis* ocupaba preferentemente el epilimnion. *Synchaeta pectinata* se presentó a lo largo de todo el periodo de estudio mostrando sus máximos desarrollos en noviembre. Durante el verano fue claramente metalimnética. *Ascomorpha ecaudis*, *A. saltans* y *A. girodi* fueron bastante escasas. *A. girodi* fue exclusiva de epilimnion y *A. ecaudis* apareció frecuentemente en verano de 1987 ocupando el metalimnion pero mostrando también un pico de densidad profundo.

Los perfiles estudiados corresponden a muestras tomadas siempre a primeras horas de la tarde (12-16 h); sin embargo, experiencias de migración vertical hechas en esta laguna sugieren que los perfiles del grupo 1 de especies hipolimnéticas-oxiclinales presentan solo cambios diarios muy pequeños. Es decir, el máximo se mantiene a la misma profundidad y los movimientos parecen restringidos dentro de una estrecha franja alrededor de ella. Resultados similares han sido encontrados en otros lagos (Stewart y George, 1987, Bogaert y Dumont, 1989). Las especies epimetalmnéticas tienen una variación diaria algo mayor pero siempre dentro de esta zona epi-metalimnética. Lo que se observa, en general es que una pequeña proporción de individuos asciende a la parte alta del epilimnion durante la noche, es decir, el número de individuos por litro se incrementa un poco en superficie durante la noche.

Respecto a la población total de rotíferos presente en la laguna a lo largo de todo el periodo de estudio (figura 5.5), es destacable el pico profundo de densidad de población que se observa

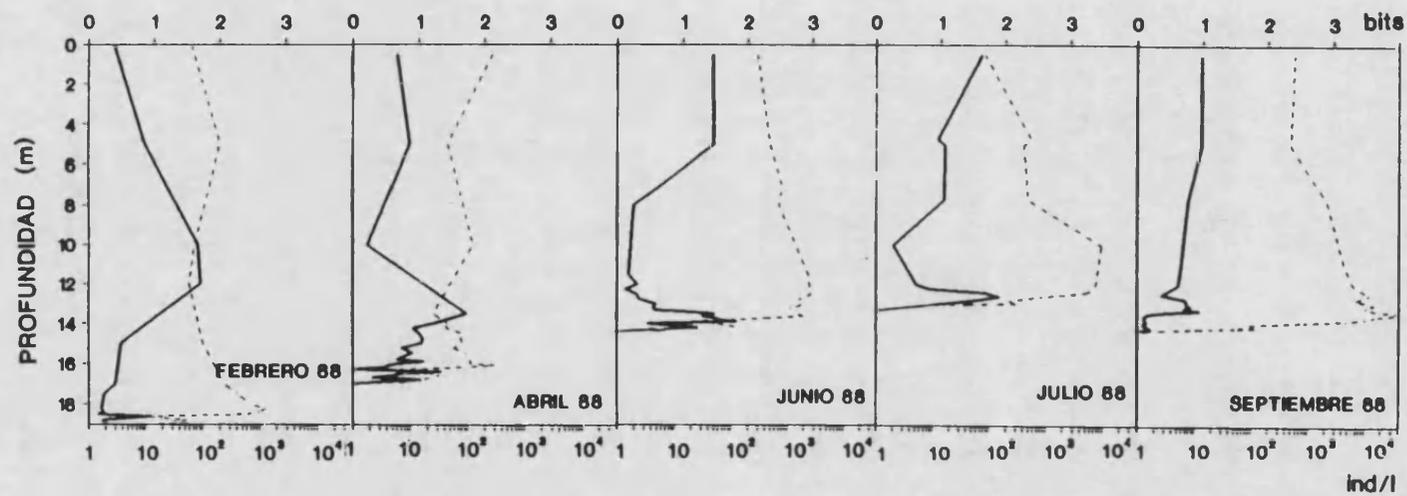
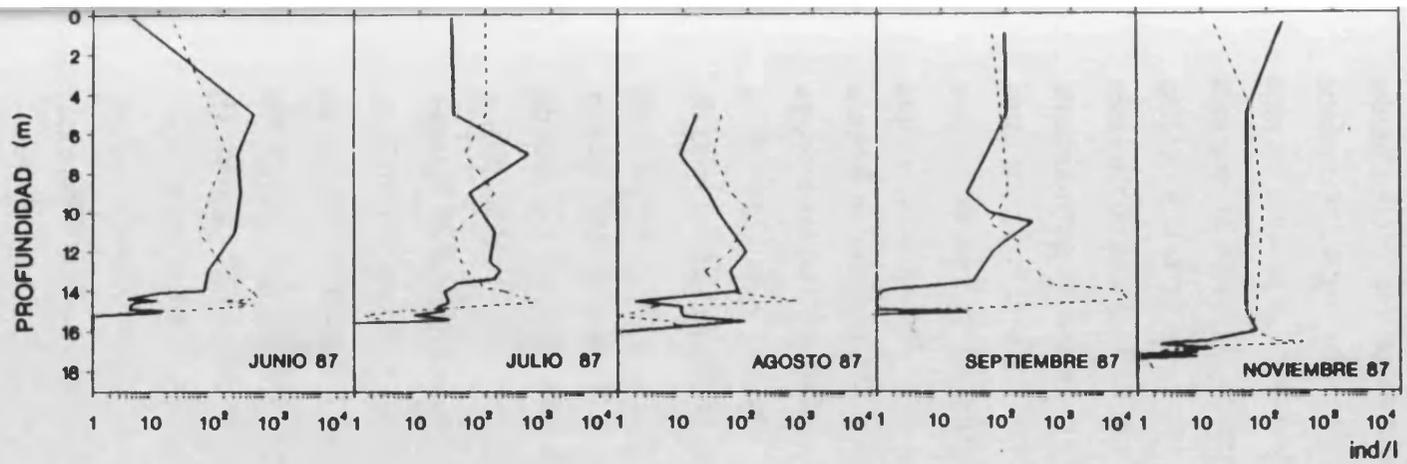


Figura 5.5. Variación de la diversidad (bits) y del número total de rotíferos a lo largo del perfil vertical en los distintos meses estudiados.

durante todo el año. En la primera estratificación se observa además un pico secundario en el metalimniom que a finales de verano pierde importancia, estando constituido el perfil por un aumento hipolimnético que termina en un marcado máximo situado en las profundidades inmediatas a la extinción de oxígeno. Durante la mezcla vertical de otoño el pico secundario desaparece pero no el ligado a la oxiclina que es permanente. En primavera se produce un pico adicional en el epilimniom además del del metalimniom y oxiclina. Durante la segunda estratificación los picos epi y metalimnético se van desplazando hacia abajo, siendo la población hipolimnética muchísimo más abundante, produciéndose de hecho una fusión de las poblaciones del metalimniom inferior y oxiclina dando un amplio máximo. Estos máximos generalmente corresponden a crecimientos de una o pocas especies según se puede observar al comparar estos perfiles (figura 5.5) con los de cada una de las especies por separado (figuras. 5.3 y 5.4).

Se observa una clara relación inversa entre la diversidad y el número de individuos ya que normalmente los claros incrementos de densidad de población, tal y como se ha dicho, se deben a proliferaciones de una o pocas especies. En general, si consideramos la diversidad de las especies de rotíferos para cada uno de los meses estudiados a lo largo de la columna de agua (figura 5.5), nos encontramos con diferentes pautas según los meses. Así, en los meses de junio y julio de 1987 las mayores diversidades se dan en la parte alta del metalimniom, mientras que ésta es menor en el hipolimniom y en capas más profundas de la oxiclina. Como hemos mencionado anteriormente, la diversidad disminuye correspondiéndose con los máximos del número de individuos. A medida que avanza la estación los valores máximos de diversidad se desplazan a las capas hipolimnéticas pero disminuyen dramáticamente en la oxiclina justamente en el lugar en que se encuentra el pico de población. Por debajo de éste, se incrementa, pero es debido al efecto del escaso número de individuos que se encuentran en la profundidad donde empieza la anoxia. En noviembre la diversidad es todavía alta a lo largo de todo el perfil y disminuye en invierno. En el segundo periodo de estratificación la diversidad es mucho menor que en el primero; en abril se observa un pico al principio del epilimniom y principio del hipolimniom pero luego este desaparece debido a la gran proliferación de una sola especie *A. fissa*, convirtiéndose en un acusado mínimo; también se observan varios picos correspondientes al principio de la zona anóxica, como en el año anterior.

Distribución estacional

La figura 5.6A y B muestra las abundancias de las distintas especies de rotíferos en la laguna de La Cruz, en los diferentes meses estudiados. En ellas se han considerado los valores integrados de estas especies en las diferentes fechas de muestreo para una columna de agua de un m² de sección. Dicha columna a su vez ha sido dividida en dos fracciones separando las capas epi-metalimnéticas de las hipolimnéticas-oxiclinales durante la estratificación térmica, de forma que la epi-metalimnética (E) corresponde a la columna de agua comprendida entre la superficie y la profundidad metalimnética indicada en la figura 3.2 y en la tabla del apéndice C, mientras que la hipolimnética (H) corresponde a la columna de agua comprendida desde la profundidad antedicha y el molimolimnion ya que en éste no se encuentran rotíferos por ser anóxico. La profundidad de separación entre las dos fracciones de la columna coincide más o menos con la isolínea de 12°C (figura 5.18) de temperatura. Para los muestreos correspondientes a la época de mezcla (noviembre, febrero y abril), la columna de agua se separó en la fracción correspondiente al mixolimnion superior hasta la profundidad de la oxiclina y la fracción restante hasta el monimolimnion. Los rotíferos muestran concentraciones altas en la oxiclina pero no aparecen por debajo de la profundidad de extinción del oxígeno, por ello el número de rotíferos integrado correspondiente a la zona de abajo corresponde a una fracción menor de la columna de agua. Las profundidades consideradas son distintas para cada fecha de muestreo y se listan en las tablas del apéndice C.

De este apéndice (C) y de las figuras 5.6A y B pueden hacerse cuatro grupos de especies según su abundancia en el ciclo anual: 1) especies permanentes, que aparecen durante casi todo el periodo de estudio tales como *A. miraclei*, *F. hofmanni*, *P. dolichoptera*, y *A. fissa*, las cuales migran a lo largo de la columna de agua en función de las condiciones ambientales y la ocurrencia de especies relacionadas con fuerte interacción competitiva; 2) especies estivales tales como *T. similis*, *H. mira*, *A. saltans* y *A. girodi*; 3) especies con máximos en primavera y verano, tales como *K. quadrata* y *A. ecaudis*; y 4) especies permanentes con máximos otoñales tales como *S. pectinata*. En el caso de las especies que se puede considerar que aparecen a lo largo de todo el periodo de estudio las más permanentes fueron *Polyarthra dolichoptera* y *Anuraeopsis miraclei*, si bien la distribución de *Polyarthra dolichoptera* es mucho más homogénea mostrando un pico en septiembre del año 1988, mientras que la distribución de *A.*

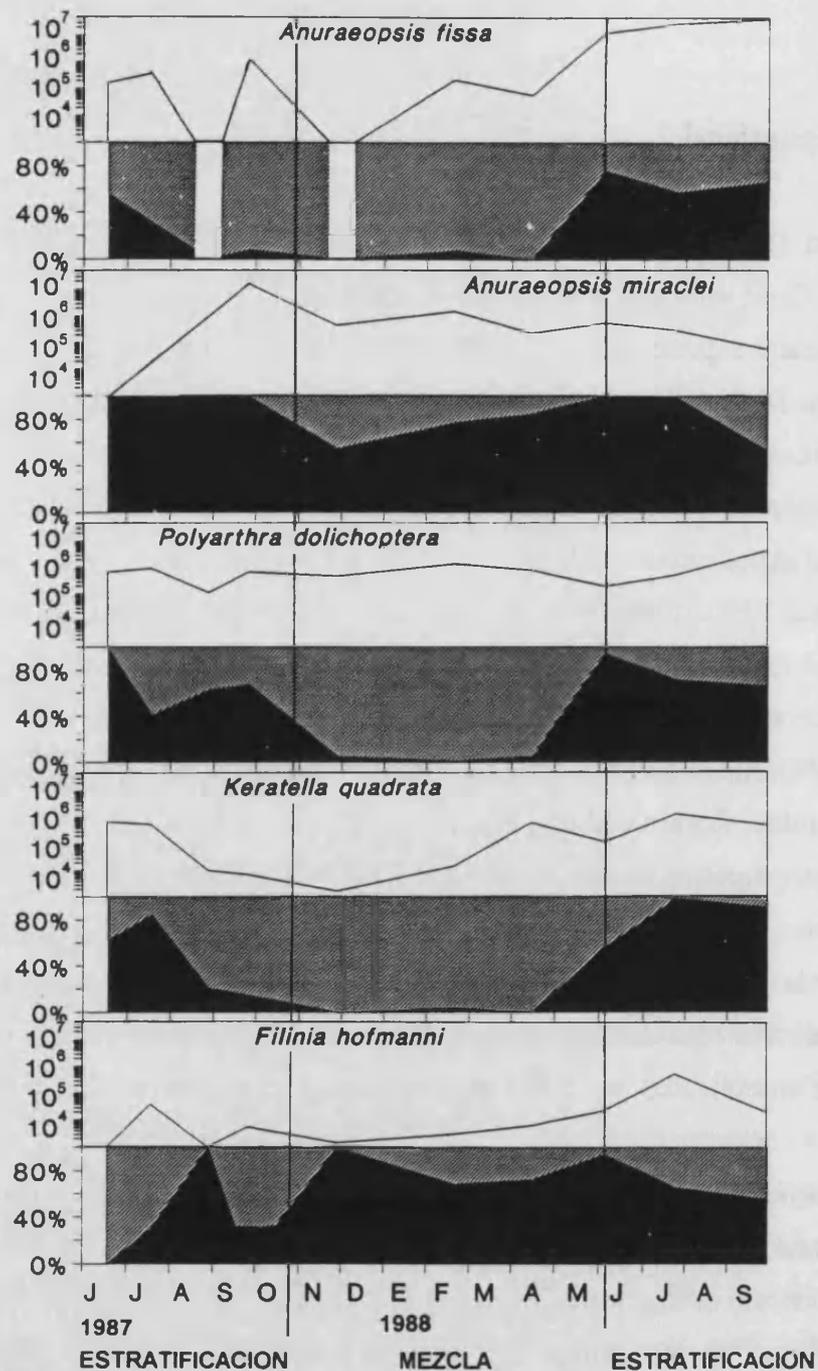
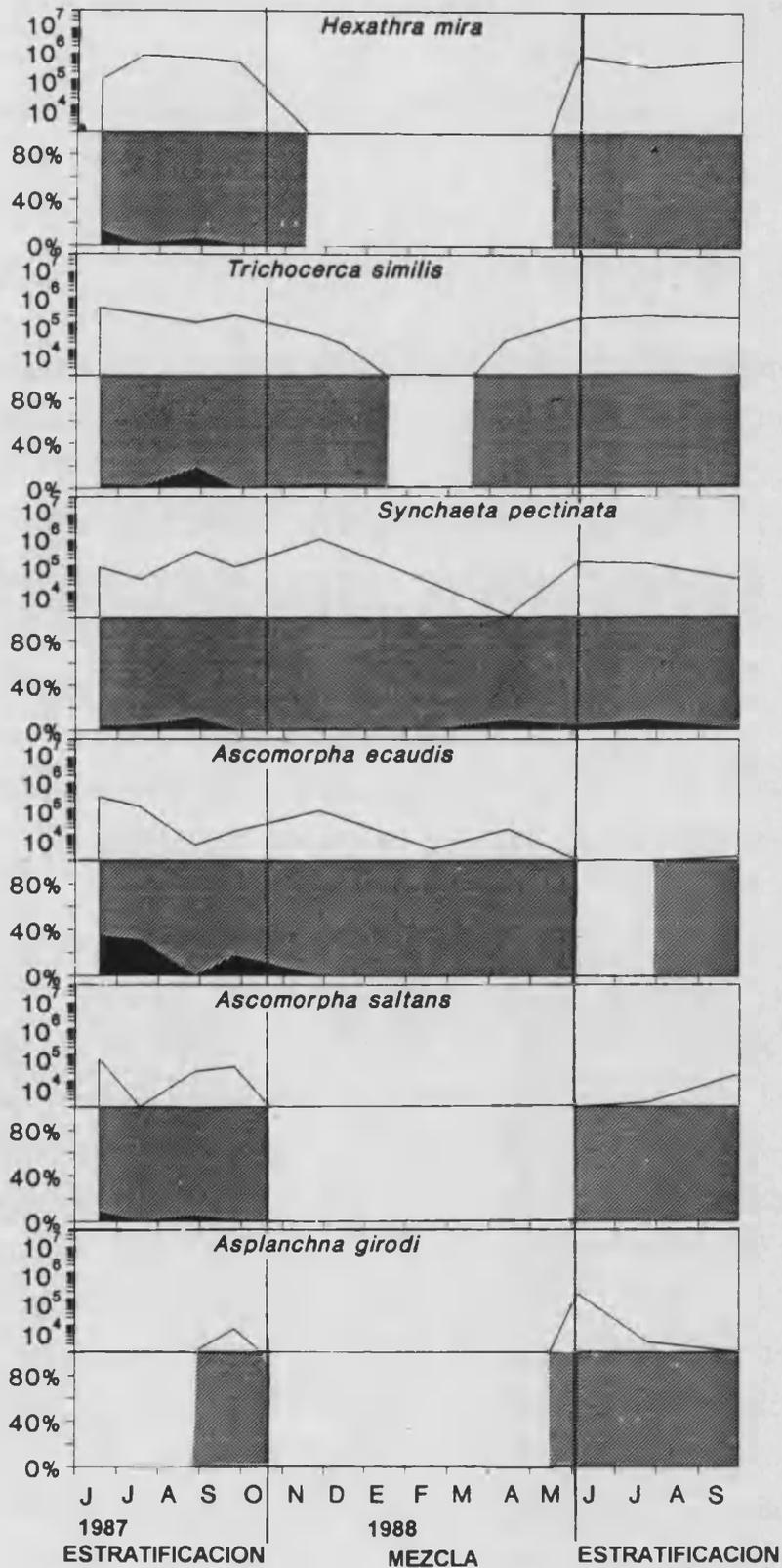


Figura 5.6 A y B. Distribución estacional de las diversas especies de rotíferos de la Laguna de La Cruz. Para cada especie se representa en la mitad superior del gráfico el número total de individuos integrado por m² (en escala logarítmica), y en la mitad inferior el porcentaje de este total, que corresponde a cada una de las dos fracciones (▨ Epilimnética e ■ Hipolimnética) en la que se ha dividido la columna de agua según las profundidades indicadas en el apéndice B. La línea continua separa los periodos de estratificación y mezcla.



miraclei muestra periodos de abundancia muy localizados como es el comprendido entre agosto y septiembre de 1987 con un máximo muy marcado correspondiente a septiembre de 1987. También muestra grandes concentraciones en febrero y junio del año 1988. En cambio la especie congénérica *A. fissa*, presenta periodos de ausencia, concretamente en agosto y noviembre de 1987, alcanzando su máxima densidad, con un máximo absoluto de las mismas proporciones que *A. miraclei* también en septiembre pero del siguiente año (1988).

En cuanto a las especies estivales la más característica es *Hexarthra mira* la cual se encuentra ausente en los meses más fríos (noviembre, febrero y abril). También se podrían considerar especies de verano a *Ascomorpha ecaudis* y *A. saltans* aunque muestran abundancias muy bajas; estas especies coexisten durante los meses de junio y septiembre de 1987, aunque en la gran mayoría de los casos domina *A. ecaudis*, salvo en septiembre de 1987 en donde aparece *A. saltans* en mayor proporción. *Asplanchna girodi* y *Filinia hofmanni* se presentan en mayor proporción durante el verano de 1988, siendo los meses de junio (*A. girodi*) y julio (*F. hofmanni*) en los que muestran respectivamente los picos de abundancia. *T. similis* también se puede considerar una especie estival ya que desaparece en los meses más fríos. Otra especie que correspondería a principios de verano es *Keratella quadrata*, que muestra sus máximos en junio y julio del año 1987, mientras que es muy escasa en los meses siguientes, reapareciendo en abril, junio, julio y septiembre del siguiente año.

Synchaeta pectinata se puede considerar una especie de otoño-invierno, ya que, aunque aparece durante todo el periodo de estudio, muestra sus mayores abundancias en los meses fríos.

Los dos años sometidos a estudio presentan importantes diferencias, 1988 era un año más lluvioso en primavera que 1987. Este hecho junto con la especial estructura de la laguna hizo que su nivel se elevara a causa de las precipitaciones (figura 3.5) y el nivel de verano se mantuvo 0.5 m por encima del nivel máximo alcanzado en 1987. Por otra parte, la alimentación subterránea intensa en 1988 alteró la estratificación, resultando en una mayor producción primaria que en el año anterior, lo cual viene indicado por una alta concentración de oxígeno metalimnético (figura 5.2B) así como por una menor profundidad de la oxiclina (figura 5.2 A y B), favoreciendo a las especies hipolimnéticas que provienen de crecimientos metalimnéticos de primavera. En concreto se puede apreciar una alternancia entre las especies congénéricas de *Anuraeopsis fissa* y *Anuraeopsis miraclei*. Es a final del verano cuando se produce una pronunciada estratificación térmica, cuando aparecen una gran concentración de estas especies, con desarrollos masivos

superiores a 28000 ind/l de *A. miraclei* en septiembre de 1987 y de *A. fissa* en el mismo mes, pero del año 1988. Estas altas densidades en la zona microaeróbica corresponden a una población activa reproductivamente ya que por ejemplo *A. miraclei* presentó una razón de huevos por hembra del 50% en septiembre del año 1987. Esta razón fue calculada a profundidades cercanas al máximo de 28000 ind/l, en las cuales las concentraciones de oxígeno se situaban por debajo de 1 mg/l. En otras fechas, a profundidades cercanas al pico de máxima densidad, esta razón fue de 25-30%.

En 1987 *A. miraclei* creció exponencialmente en la oxiclina, ocupando una capa de agua de 25-50 cm de manera que a partir de una población inferior a 30 ind/l en junio del 87 pasó a densidades de 10^3 en agosto y a casi 3×10^4 ind/l a últimos de septiembre del 87. Por otra parte, en 1988 fue *A. fissa* quien ocupó esta delgada capa reemplazando a *A. miraclei* al final del verano, alcanzando la misma densidad final 3×10^4 ind/l en septiembre de 1988. Sin embargo, *A. fissa* no es exclusivo de esta capa como *A. miraclei*, ya que muestra elevadas densidades por encima, en la parte inferior del metalimnion donde de hecho presenta los máximos al principio del verano y sólo es al final de la estación cuando tiene los máximos cerca o a la profundidad de extinción del oxígeno.

En cuanto a la diversidad a lo largo del periodo estudiado (figura 5.7), se aprecia claramente que la máximas diversidades corresponden a los meses en que se detectan las densidades poblacionales más bajas, ya que tal y como se ha indicado anteriormente los picos de población suelen deberse a incrementos espectaculares de una sola especie. La mayor diversidad se detecta en el primer periodo de estratificación (julio del 87), descendiendo bruscamente en el periodo de máxima abundancia del 87 (septiembre), para volver a incrementarse en otoño y disminuir en invierno. A principios de primavera vuelve a aumentar, mientras que en el segundo periodo de estratificación la diversidad disminuye considerablemente. Si consideramos la diversidad existente en las dos fracciones de la columna de agua se aclara esta variación de la diversidad que no sigue las tendencias esperadas de los estados sucesionales del ciclo anual, ya que la diversidad de toda la columna está muy influenciada por la diversidad de la oxiclina, debido al elevado número de individuos en ella. La sucesión en la oxiclina está desplazada respecto al resto de la columna de agua, puesto que depende de las entradas de energía y materia provenientes de una producción planctónica anterior. Es decir, se puede observar de la comparación de las tres figuras que la diversidad es elevada a finales de primavera, principios de

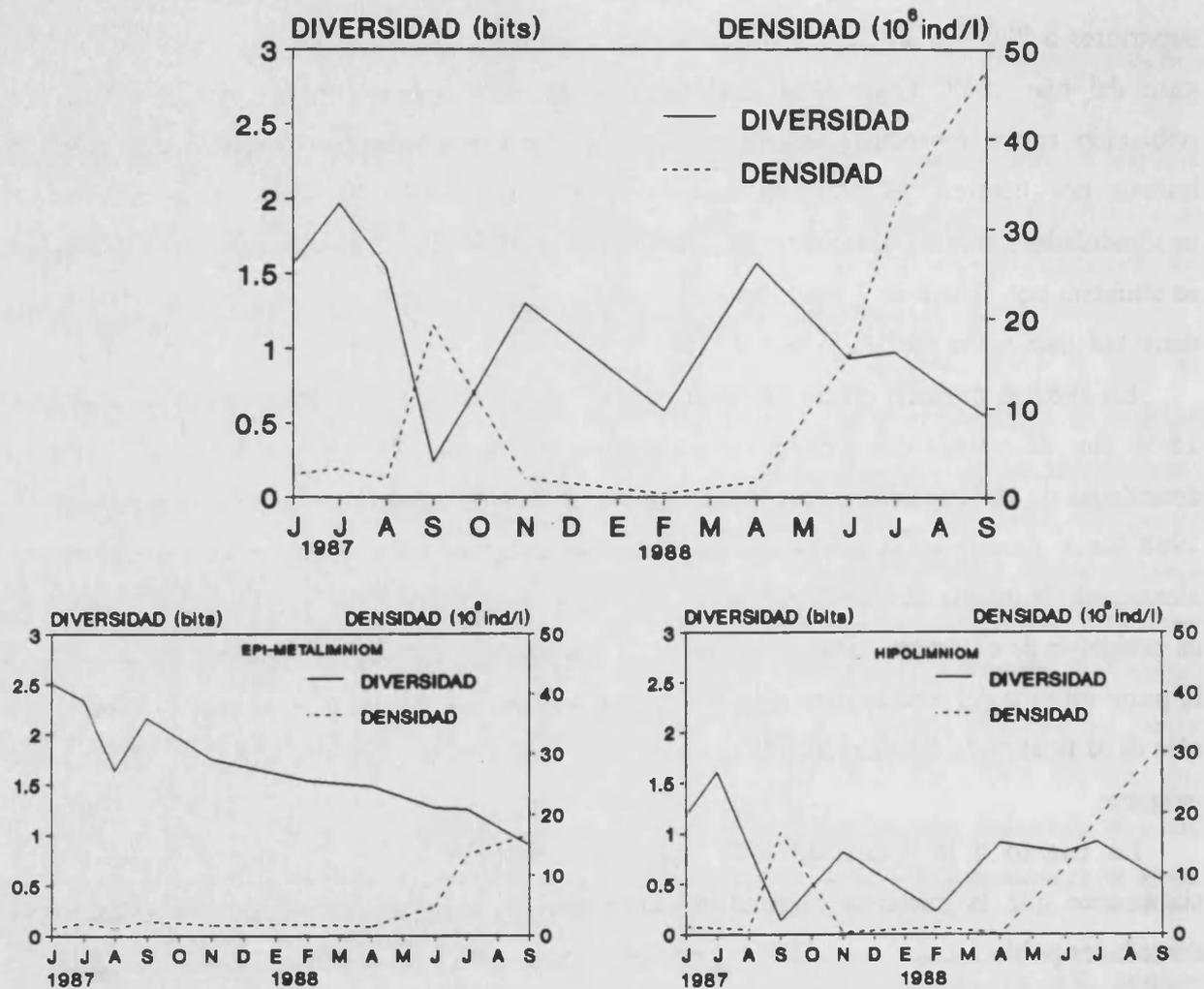


Figura 5.7. A. Distribución estacional de la diversidad y del número total de rotíferos presentes en la laguna de La Cruz durante el periodo de estudio. B. distribución estacional de la diversidad y el número total de rotíferos presentes en el epi-metalimnion e hipolimnion respectivamente.

verano, del primer periodo, tanto en la fracción epi-metalimnética como hipolimnética, mientras que a finales de verano (septiembre 87) desciende bruscamente en el hipolimnion, debido a los crecimientos masivos de una especie, pero se mantiene alta en las capas epi-metalimnéticas. En la mezcla otoñal baja en el mixolimnion, como es de esperar, pero aumenta en la capa todavía estable de la oxiclina que sigue un proceso sucesional después del pico de población de septiembre, por ello en la diversidad de toda la columna se observa la irregularidad de disminución a finales de verano y aumento en otoño. Durante el invierno la diversidad baja en

todo el perfil en especial en la capa óxico-anóxica, ya que probablemente y debido además que el invierno fue más frío que otros años se desestabilizó la capa.

En primavera se mantiene una diversidad baja en el mixolimniom como es de esperar, pero vuelve a aumentar en la capa de la oxiclina ya que empieza a estabilizarse, además las comunidades de arriba y abajo son distintas, por ello la diversidad total aumenta. Tal y como se ha indicado anteriormente, la importante mezcla de invierno y lluvias de verano de 1988 que aumentaron la producción primaria en dicho año hizo disminuir la profundidad de la oxiclina, de manera que se fusionó con la parte inferior del metalimniom. Por ello la altura de la columna de agua considerada como epi-metalimnética se redujo mucho en verano de este año 1988, debido a la elevación de la capa anóxica y correspondía al epilimniom y a una parte limitada del metalimniom. Por ello la diversidad de la fracción superficial más bien fue disminuyendo a medida que avanzaba el verano, sin embargo se mantuvo igual de alta en la fracción hipolimnética como es de esperar en los periodos de estabilidad y estratificación. De nuevo a finales de verano (final de septiembre) la diversidad disminuyó drásticamente debido al marcado pico de población en la oxiclina y en una gran parte del perfil vertical de una sola especie (*A. fissa*).

5.3 Relaciones de las especies de rotíferos con los parámetros físico-químicos

La distribución en el perfil vertical de las especies de rotíferos está influida por los principales factores físico-químicos. En nuestro caso, la temperatura y el oxígeno son los principales factores físico-químicos que explican las diferentes distribuciones, puesto que el pH, la conductividad y el potencial de óxido-reducción parece que muestran una variación más marcada a profundidades en las cuales los rotíferos se encuentran ausentes. No obstante, estos últimos factores mencionados tienen una cierta variabilidad estacional y han sido incluidos en los análisis aunque solo se hayan utilizado los datos hasta las profundidades donde se han detectado organismos. Es importante reseñar que a pesar de la simplificación del sistema que estamos realizando, puesto que hay otros factores, principalmente bióticos, de difícil estimación que a su vez tienen peso en las distribuciones de los rotíferos, ésta es útil, ya que en este lago hay unas variaciones tan fuertes de los factores ambientales que permiten poner de manifiesto sus

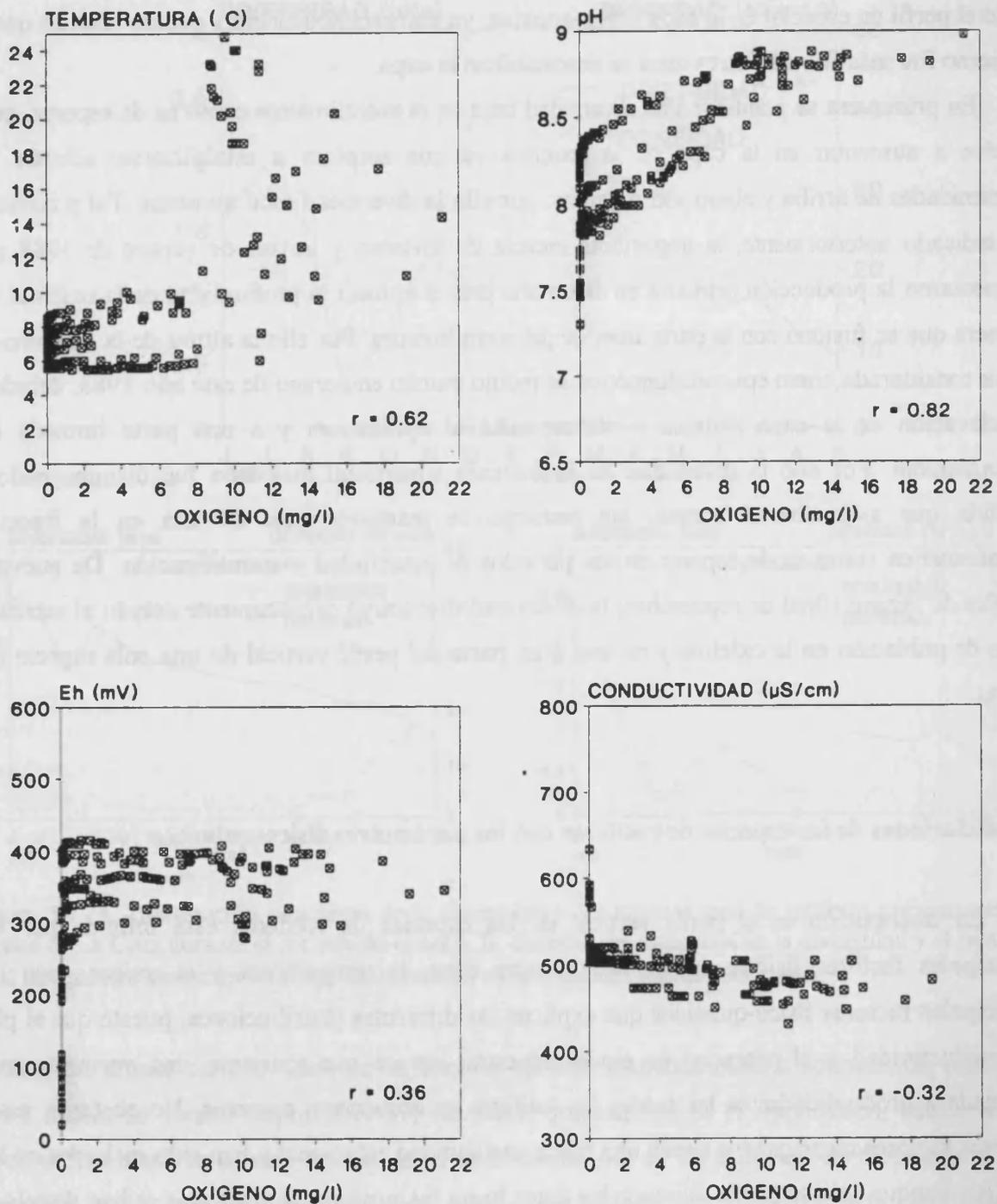


Figura 5.8. Relación de las concentraciones de oxígeno con diversos parámetros físico-químicos medidos desde la superficie hasta el final de la oxiclina a lo largo de todo el periodo de estudio en la laguna de La Cruz. También se indican en el interior de los gráficos (abajo a la derecha) los coeficientes de correlación (r) entre los distintos parámetros.

relaciones con dichas distribuciones. El factor más importante es sin duda el oxígeno por lo que se consideraran primero las relaciones de cada uno de los otros parámetros físico-químicos con respecto al oxígeno (figura 5.8). Estas relaciones se han considerado para aquellas profundidades en las que se obtuvieron muestras de rotíferos, que generalmente abarcan hasta justo por debajo de la profundidad de extinción del oxígeno. Es precisamente en esta zona de la extinción donde la mayoría de los parámetros empiezan a variar más bruscamente, pero su variación es de difícil visualización en las gráficas de la figura 5.8, puesto que en esta zona el valor del oxígeno es siempre cero para todos los valores de los demás parámetros. En nuestro caso, dichas variaciones presentan una escasa importancia ya que el número de organismos detectados por debajo del cero de oxígeno es irrelevante. En la figura 5.8 se observa que en el caso del potencial de óxido-reducción y la conductividad nos encontramos con una pobre relación con estos parámetros los cuales se mantienen más o menos constantes para todos los rangos de oxígeno pero variando extraordinariamente cuando el oxígeno se hace cero. Es esperable que el potencial de óxido-reducción cambie sólo cuando el oxígeno sea cero ya que su relación con la presión parcial de oxígeno es logarítmica. En el caso de la conductividad existe una débil relación inversa, de forma que los mayores valores se dan para los menores valores de oxígeno, ya que en profundidad aumenta la conductividad debido a la mayor solubilidad de las especies químicas, especialmente en condiciones de pH y potenciales de óxido-reducción bajos, condiciones que se dan de forma más extremas en aguas anóxicas. Con los otros parámetros las correlaciones son mucho mayores. El pH presenta una buena correlación con el oxígeno debido a que producción de oxígeno y aumento de pH son consecuencia de la producción primaria por lo que estos parámetros varían de forma conjunta. En cuanto a la temperatura, se observa también una correlación, correspondiéndose claramente los valores menores de temperatura con las menores concentraciones de oxígeno por debajo de la saturación. Sin embargo, se observa que para los valores correspondientes a la saturación de oxígeno que se sitúan en las capas superficiales hasta donde actúa la mezcla del viento, tenemos un amplio rango de valores de temperaturas debido a la gran variación estacional de las mismas. En cambio, para valores mayores a la saturación tenemos temperaturas intermedias debido a que éstos corresponden al metalimnion, tal y como se ha visto en el apartado anterior (Fig 5.2).

En la tabla 5.1 se muestran los coeficientes de correlación entre las diversas especies de rotíferos sometidas a estudio y los principales parámetros físico-químicos. En dicha tabla, se

Tabla 5.1 Matriz de correlación entre las especies de rotíferos y los principales parámetros físico-químicos.

	KERA	POLY	AFISSA	AMIRA	HEX	AECA	ASAL	TRIC	SYN	FIL	ASPL
OXI	0.10	0.18	0.20	-0.20	0.60	0.26	0.37	0.60	0.53	-0.06	0.25
TEMP	0.01	-0.12	0.12	-0.37	0.83	0.16	0.48	0.85	0.50	-0.08	0.27
pH	-0.01	0.07	-0.02	-0.20	0.65	0.40	0.43	0.64	0.55	-0.24	0.26
REDOX	0.14	0.32	0.14	0.21	0.13	0.16	0.13	0.14	0.20	0.11	0.04
COND	0.14	0.03	0.15	0.00	-0.04	0.04	-0.02	-0.06	0.03	0.03	-0.02

OXI: Oxígeno; TEMP: Temperatura; pH: pH; REDOX: Potencial de óxido reducción; COND: Conductividad; KERA: *Keratella quadrata*; POLY: *Polyarthra dolichoptera*; AFISSA: *Anuraeopsis fissa*; AMIRA: *Anuraeopsis miraclei*; HEX: *Hexathra mira*; AECA: *Ascomorpha ecaudis*; ASAL: *Ascomorpha saltans*; TRIC: *Trichocerca similis*; SYN: *Synchaeta pectinata*; FIL: *Filinia hofmanni*; ASPL: *Asplanchna girodi*.

aprecia que aquellas especies que muestran una gran dispersión a lo largo del perfil vertical, variando su posición según la estación del año, con tendencia a formar máximos profundos en verano, son precisamente las especies que presentan correlaciones más bajas, tal es el caso de *K. quadrata*, *P. dolichoptera* y *A. fissa*, mientras que las especies exclusivas de capas profundas (*A. miraclei* y *F. hofmanni*) muestran correlaciones negativas con todos los parámetros excepto con el potencial de óxido-reducción y la conductividad con los que tienen coeficientes muy bajos. Las especies citadas hasta aquí son las que hemos denominado hipolimnéticas. En el extremo opuesto se encuentran *H. mira*, *T. similis* y *S. pectinata*, especies de superficie, que muestran altas correlaciones positivas con el oxígeno, la temperatura y el pH. La conductividad y el potencial de óxido-reducción son bastante homogéneos para todas las profundidades en que se encuentran rotíferos, estando situada la redoxiclina justo por debajo de la extinción de oxígeno, esto se traduce en unos coeficientes de correlación muy bajos para todas las especies estudiadas.

Las figuras 5.9 a la 5.13 representan las abundancias de las diferentes especies de rotíferos en función de cada uno de los factores físico-químicos estudiados. Además se han calculado los parámetros medios correspondientes al centro de gravedad de la distribución vertical de cada especie en cada fecha de muestreo, dichos cálculos se listan en el apéndice D. Para algunos parámetros todas las especies muestran unos valores preferentes muy similares que en el caso de la conductividad se sitúan en el rango de 450 a 550 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (figura 5.9), ya que la conductividad es muy homogénea en el perfil vertical y a lo largo del año en este tipo de lago oligo-mesotrófico carbonatado, estando situados los máximos de las especies hipolimnéticas en conductividades ligeramente más altas que los de las especies superficiales (apéndice D; tabla D.3).

En cuanto al potencial de óxido-reducción (figura 5.10), los rangos de abundancia son más amplios, sobre todo en aquellas especies capaces de colonizar capas profundas en el periodo de estratificación, oscilando los máximos de todas las especies en el rango de los 300 a 400 mV. Sin embargo, observando con mayor detenimiento los rangos de este parámetro, podemos distinguir dos grupos de especies: 1) especies que muestran máximas abundancias en un amplio rango (300-400 mV) tales como, *T. similis*, *H. mira*, *A. ecaudis* y *K. quadrata*; 2) especies localizadas también en este rango pero que muestran sus mayores valores en un rango más estrecho, concretamente el intervalo de 300 a 350 mV para *P. dolichoptera* y *A. fissa* y los 400 mV, para *A. miraclei* y *F. hofmanni*, aunque estas dos últimas puedan encontrarse a valores inferiores a

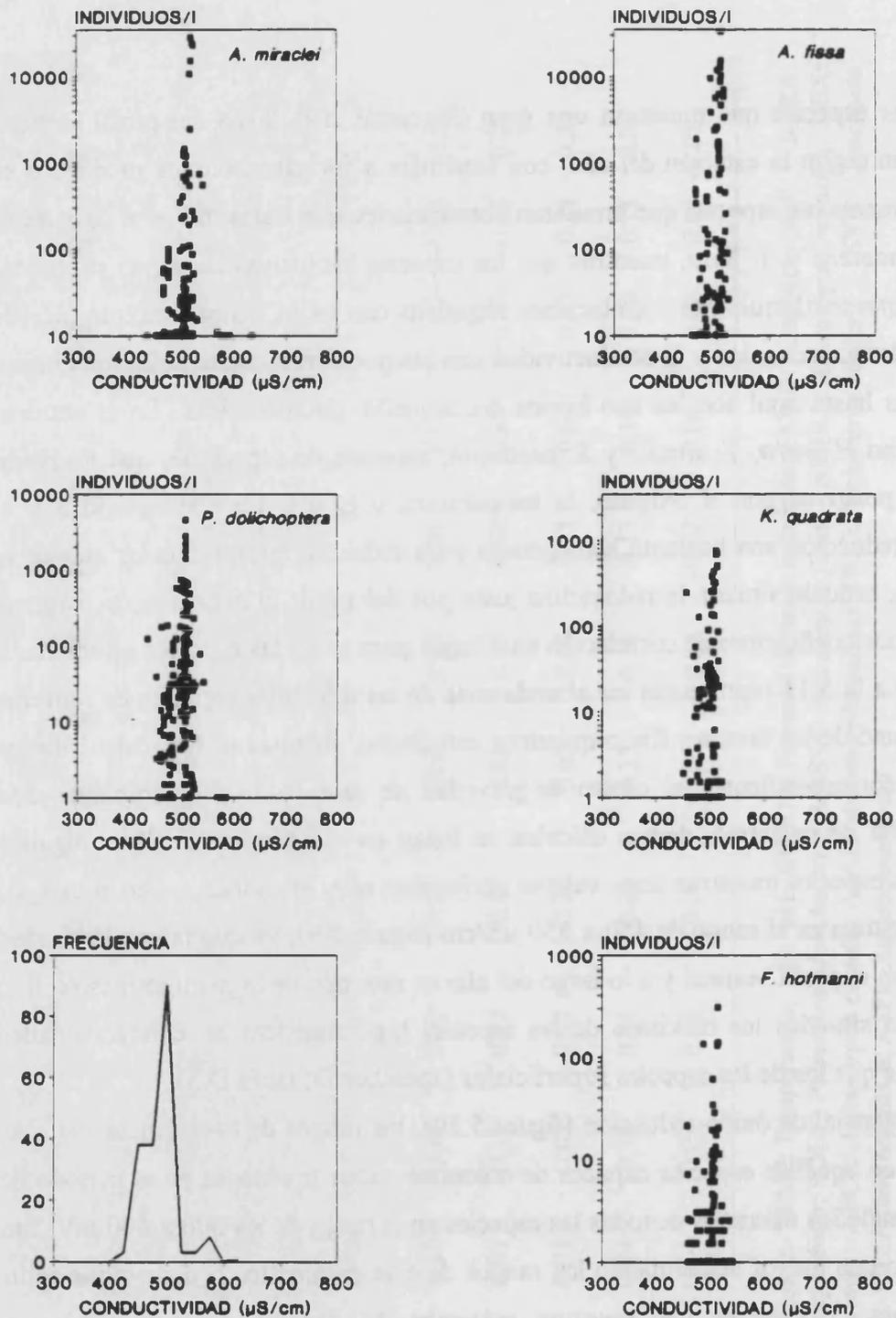


Figura 5.9. Abundancias de las respectivas especies de rotíferos (individuos/l) de la laguna de La Cruz en función de la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), representadas en escala logarítmica a partir de 1 ind/l excepto en el caso de las especies de *Anuraeopsis*, que se hace a partir de 10 ind/l debido a su gran abundancia. Asimismo, se muestran las frecuencias de las medidas de las conductividades correspondientes al total de muestras en las que se encontraron rotíferos.

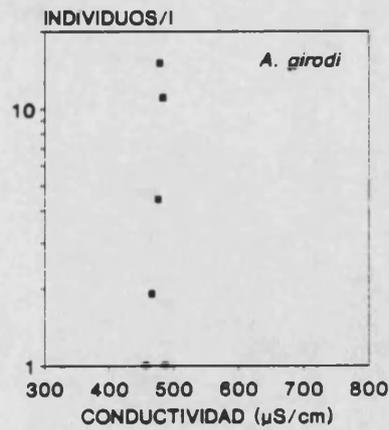
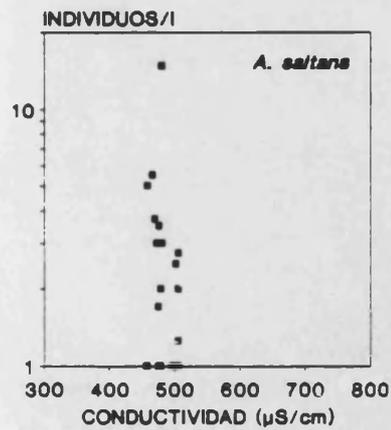
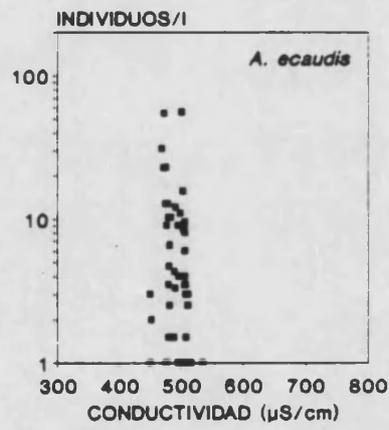
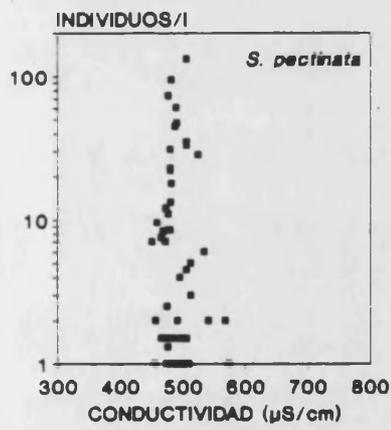
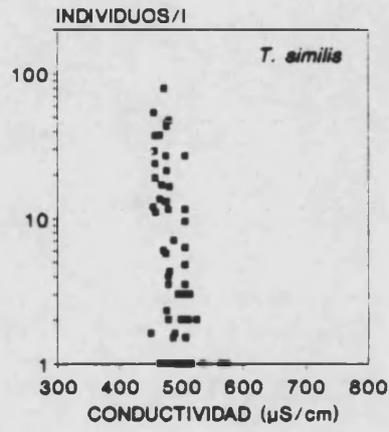
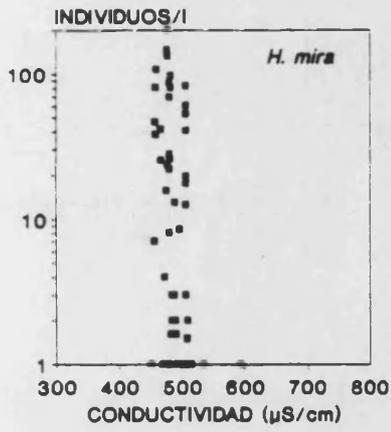


Figura 5.9. Continuación.

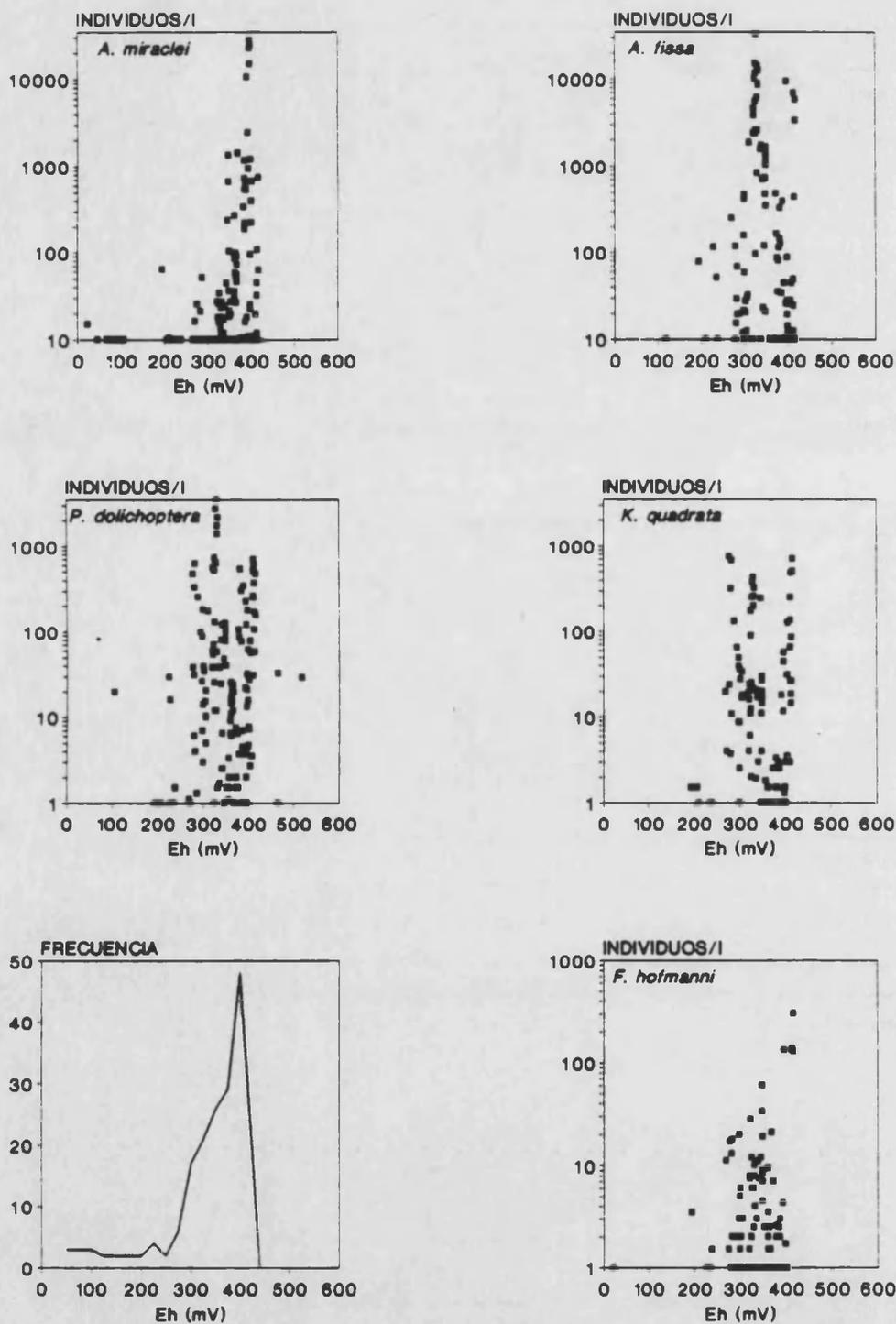


Figura 5.10. Abundancias de las respectivas especies de rotíferos (individuos/l) de la laguna de La Cruz en función del potencial de óxido-reducción (mV), representadas en escala logarítmica a partir de 1 ind/l excepto en el caso de las especies de *Anuraeopsis*, que se hace a partir de 10 ind/l debido a su gran abundancia. Asimismo, se muestran las frecuencias de las medidas del potencial de óxido-reducción correspondientes al total de muestras en las que se encontraron rotíferos.

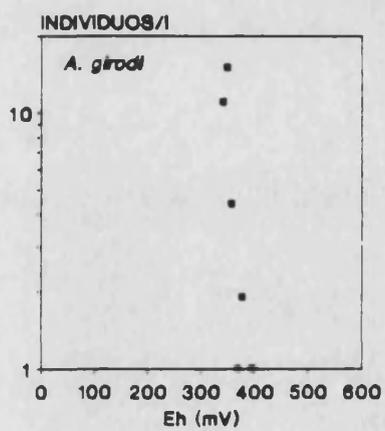
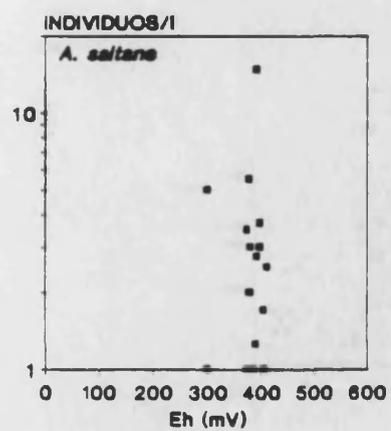
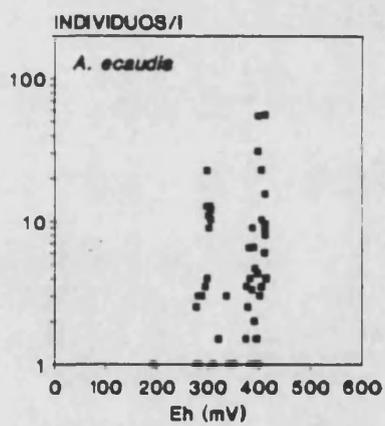
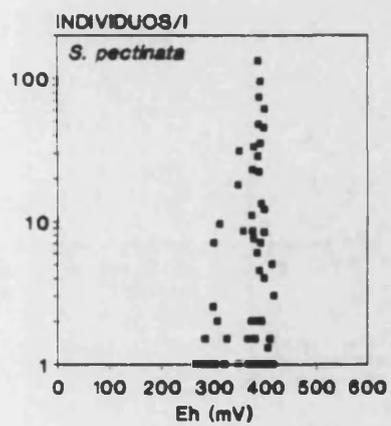
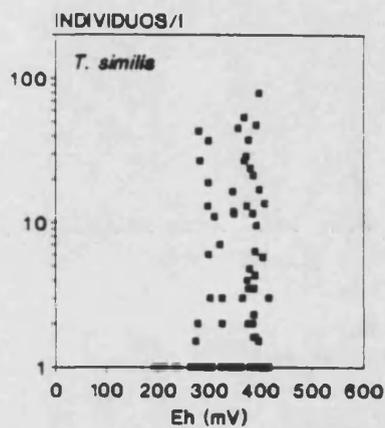
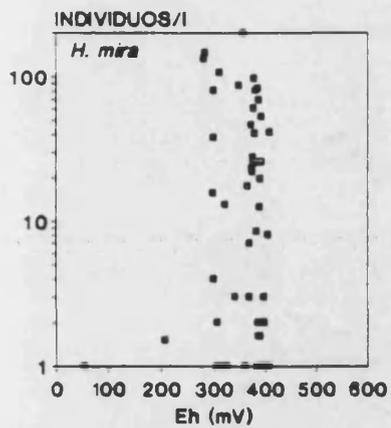


Figura 5.10. Continuación.

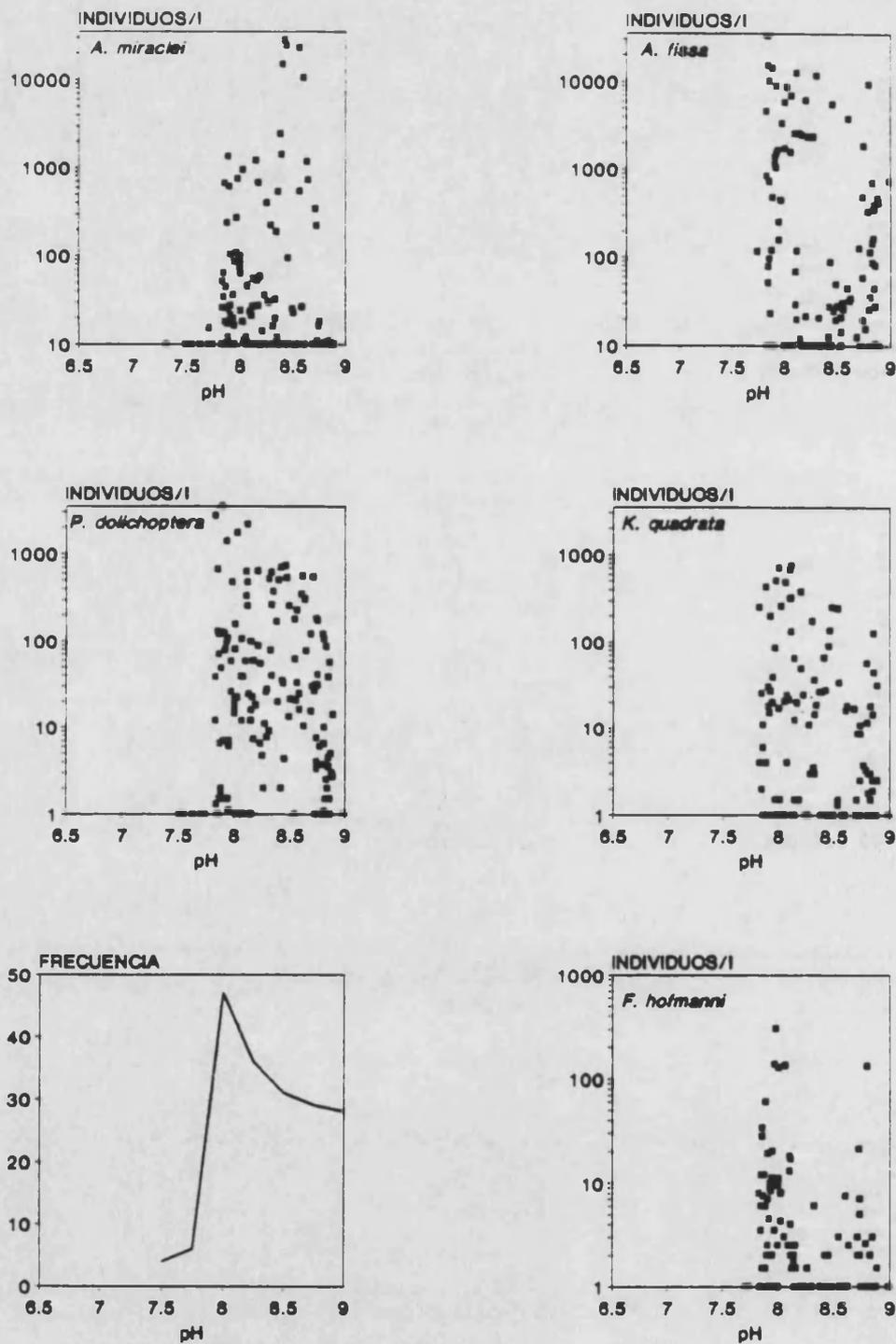


Figura 5.11. Abundancias de las respectivas especies de rotíferos (individuos/l) de la laguna de La Cruz en función del pH, representadas en escala logarítmica a partir de 1 ind/l excepto en el caso de las especies de *Anuraeopsis*, que se hace a partir de 10 ind/l debido a su gran abundancia. Asimismo, se muestran las frecuencias de las medidas del pH correspondientes al total de muestras en las que se encontraron rotíferos.

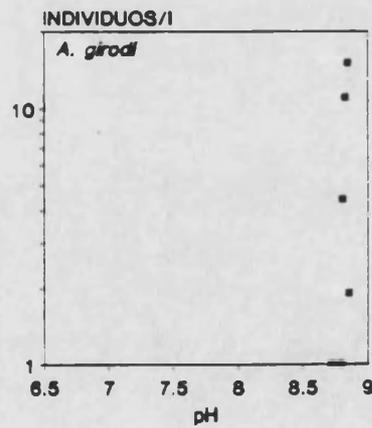
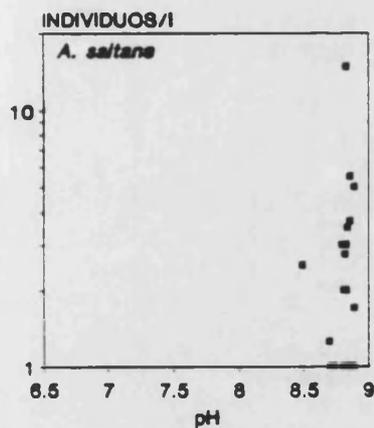
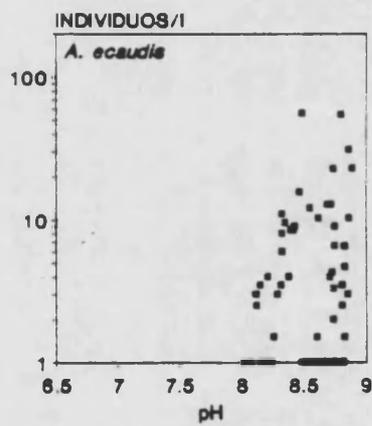
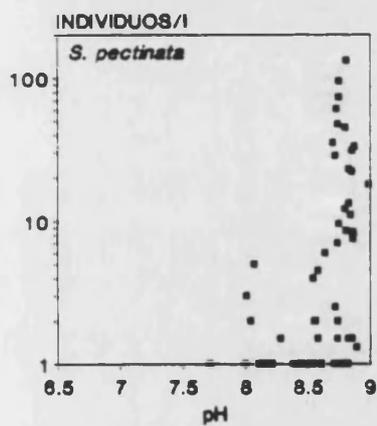
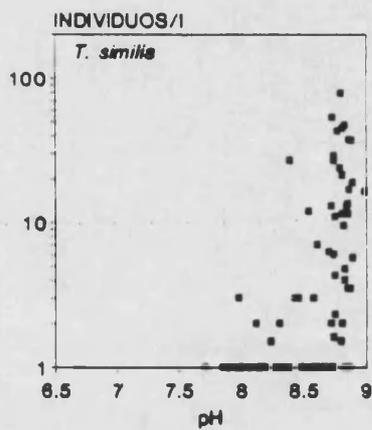
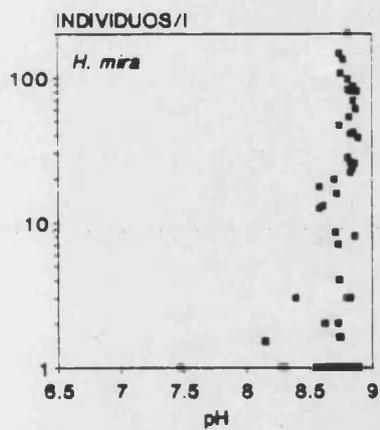


Figura 5.11. Continuación.

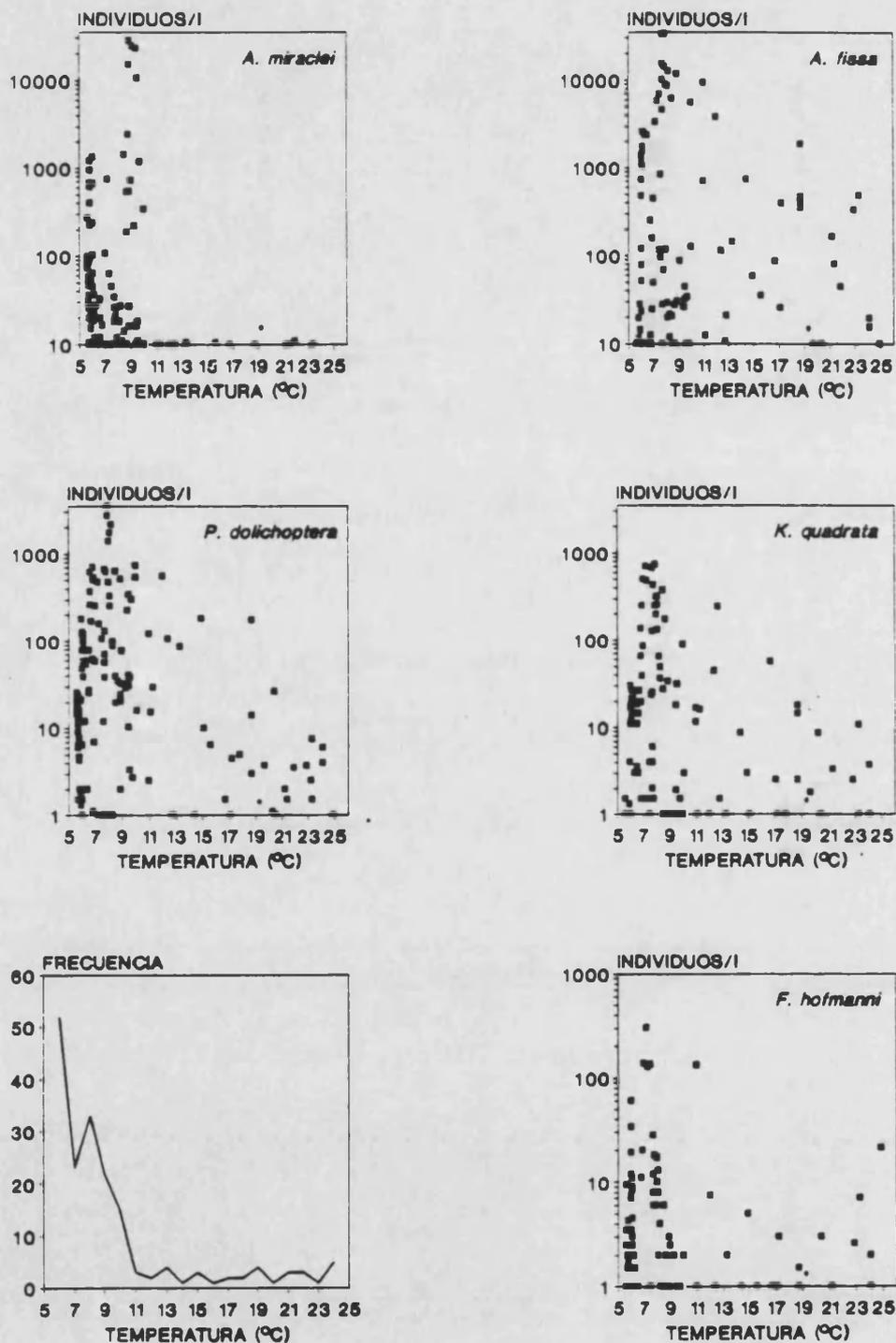


Figura 5.12. Abundancias de las respectivas especies de rotíferos (individuos/l) de la laguna de La Cruz en función de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), representadas en escala logarítmica a partir de 1 ind/l excepto en el caso de las especies de *Anuraeopsis*, que se hace a partir de 10 ind/l debido a su gran abundancia. Asimismo, se muestran las frecuencias de las medidas de las temperaturas correspondientes al total de muestras en las que se encontraron rotíferos.

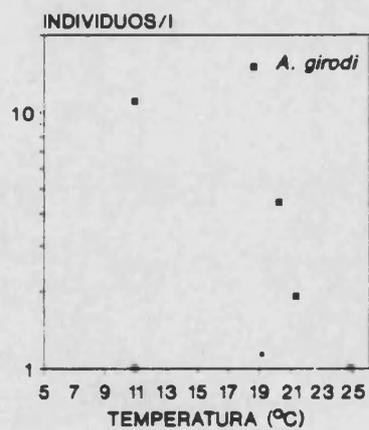
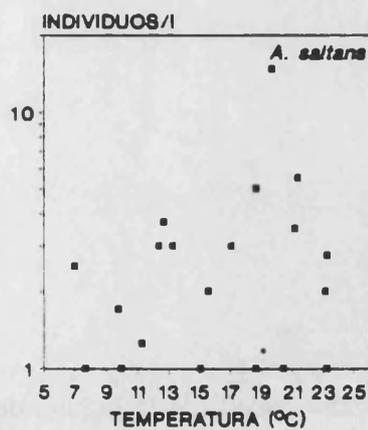
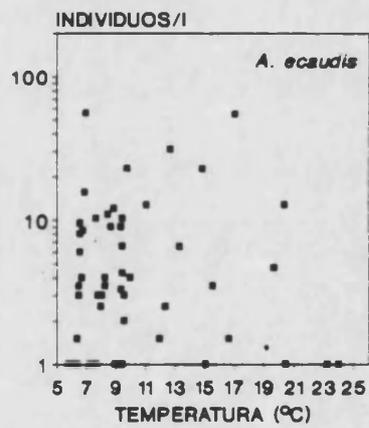
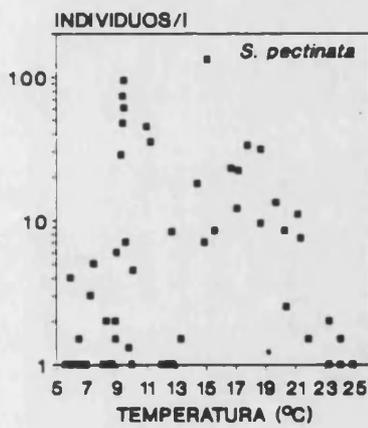
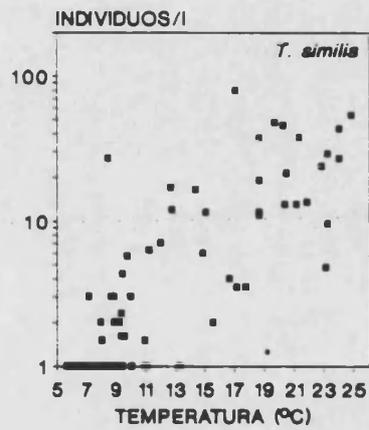
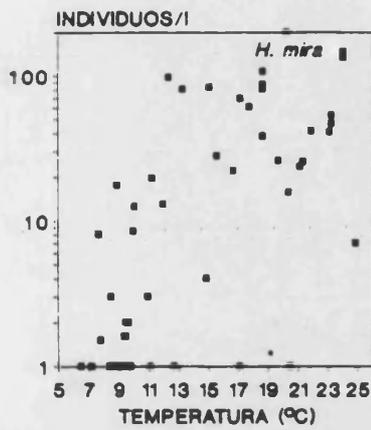


Figura 5.12. Continuación.



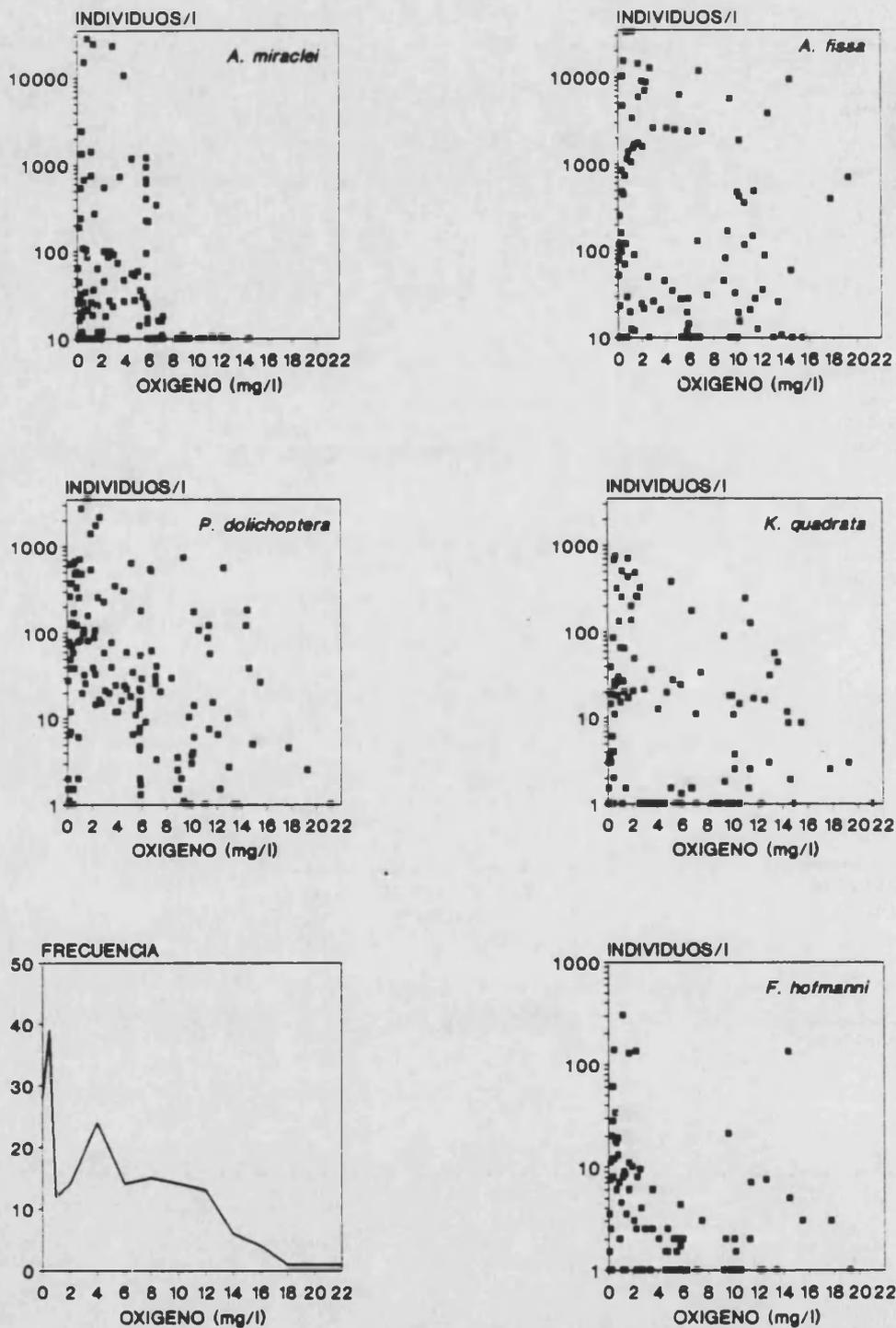


Figura 5.13. Abundancias de las respectivas especies de rotíferos (individuos/l) de la laguna de La Cruz en función de la concentración de oxígeno (mg/l), representadas en escala logarítmica a partir de 1 ind/l excepto en el caso de las especies de *Anuraeopsis*, que se hace a partir de 10 ind/l debido a su gran abundancia. Asimismo, se muestran las frecuencias de las medidas de las concentraciones de oxígeno correspondientes al total de muestras en las que se encontraron rotíferos.

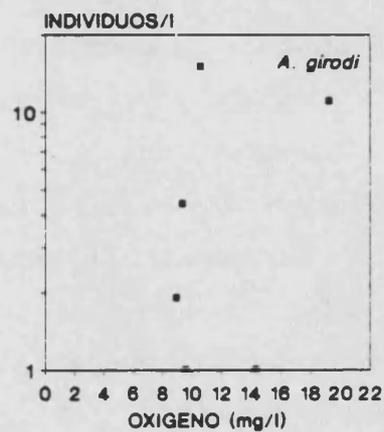
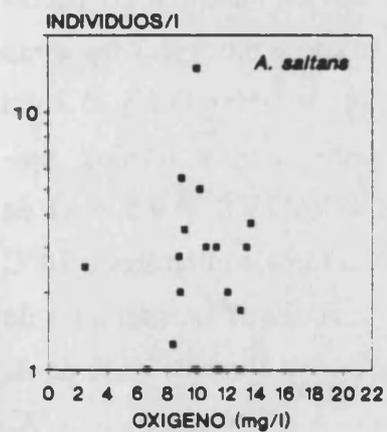
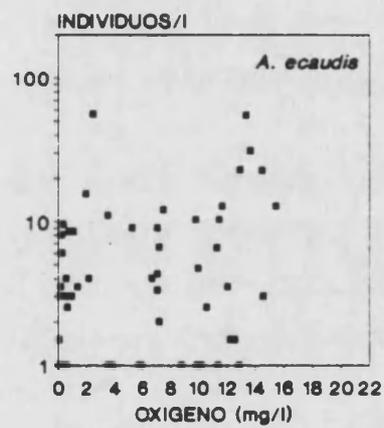
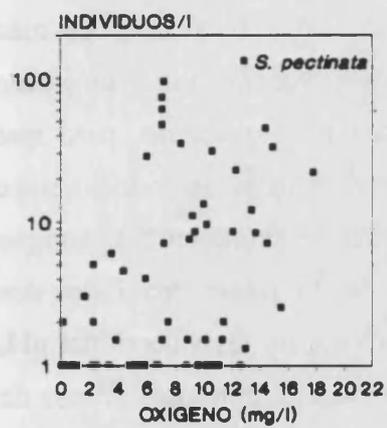
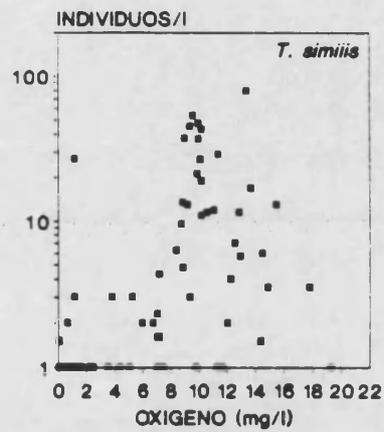
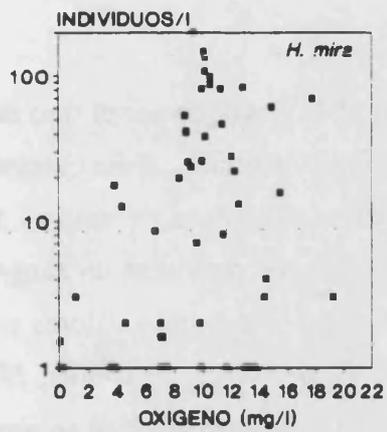


Figura 5.13. Continuación.

200 mV. Mayores variaciones se observan en el caso del pH (figura 5.11), aunque por el tipo de lago el pH de las aguas por encima de la oxiclina es siempre superior a la neutralidad. Se pueden distinguir también dos grupos de especies, uno presentando una mayor dispersión de valores y otro localizado en un rango más estrecho, pero en este caso las especies que presentan un rango más definido son las pertenecientes al grupo de especies superficiales cuyos máximos valores se presentan a pH superiores a 8.5, tales como *A. girodi*, *A. saltans*, *S. pectinata*, *T. similis*, *H. mira* y *A. ecaudis*; si bien dentro de este grupo podríamos diferenciar a su vez patrones de escasa variabilidad en torno a estos valores, como los que muestran *A. girodi* y *A. saltans* y el resto de las especies antes mencionadas las cuales presentan unos rangos de variabilidad un poco más amplios. El otro grupo lo constituyen las especies hipolimnéticas cuyos máximos se sitúan alrededor de 8, tales como *P. dolichoptera*, *F. hofmanni*, *A. fissa* y *K. quadrata*, pero que muestran también abundancias relativamente altas a pH superiores. Un rango intermedio entre estos dos grupos es el que posee *A. miraclei* cuyos máximos valores se sitúan en 8.4, aunque también presenta abundantes poblaciones en los valores más bajos de este parámetro. Estos dos grupos se pueden distinguir claramente en el apéndice D (tabla D.4) en que los valores del pH, especialmente la media de los periodos de estratificación, dividen claramente los dos grupos de especies (las hipolimnéticas con valores de 8.2-8.3 y las superficiales con valores de 8.7-8.9).

Las distribuciones respecto a la temperatura y el oxígeno son las que muestran las pautas más interesantes, lógicamente aquellas especies capaces de situarse en capas profundas muestran sus máximos a bajas temperaturas y baja concentración de oxígeno, las tablas D.1 y D.2 del apéndice D dividen claramente también a las especies en los dos grupos citados: epimetalimnéticas, con valores medios en su distribución superiores a los 13°C y 9.5 mg/l de oxígeno en los periodos de estratificación e hipolimnéticas, con valores medios inferiores a 10°C y 5.5 mg/l de oxígeno en los mismos periodos, con lo que sus distribuciones se asocian a las de estos factores. Con respecto a la temperatura (figura, 5.12), un caso muy aparente es el de *A. miraclei* que se sitúa mayoritariamente por debajo de los 10°C. *A. fissa*, *P. dolichoptera*, *K. quadrata* y *F. hofmanni* se muestran más dispersos, aunque también parecen preferir las bajas temperaturas. Sin embargo, es importante reseñar que los valores de temperatura no sólo dependen de la profundidad sino también de la época del año de que se trate, por lo tanto son las especies estivales *H. mira* y *T. similis* las que presentan correlaciones más altas (tabla 5.1) y relaciones más claras de incremento del número de individuos con la temperatura, seguidas de

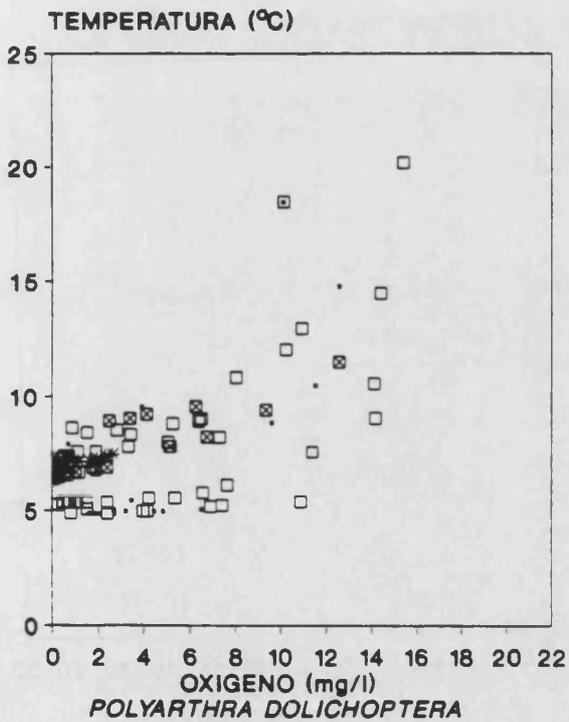
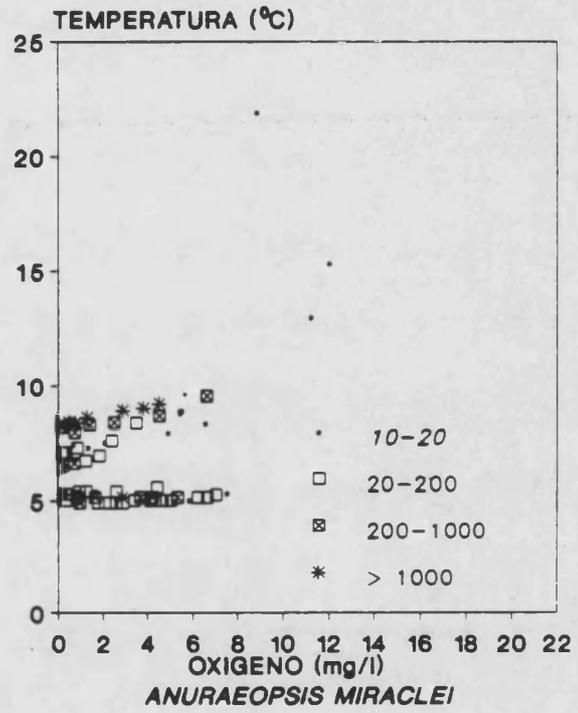
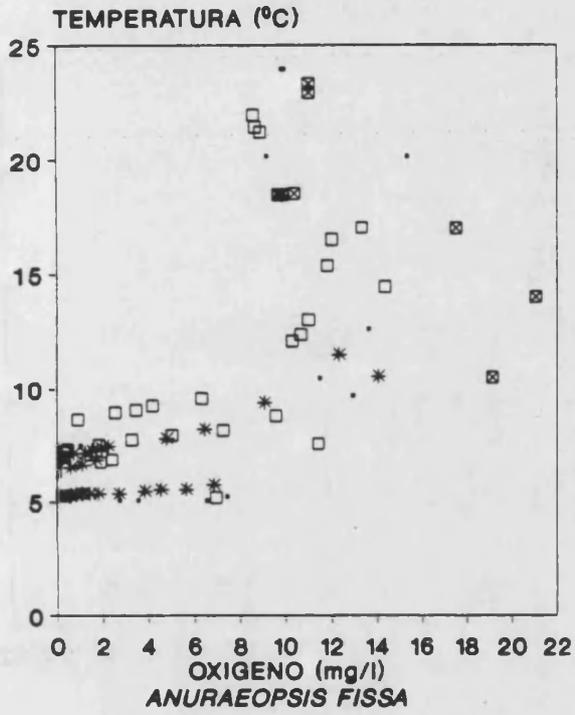


Figura 5.14. Abundancia de las diferentes especies de rotíferos en función de la temperatura (°C) y el oxígeno (mg/l) en la laguna de La Cruz.

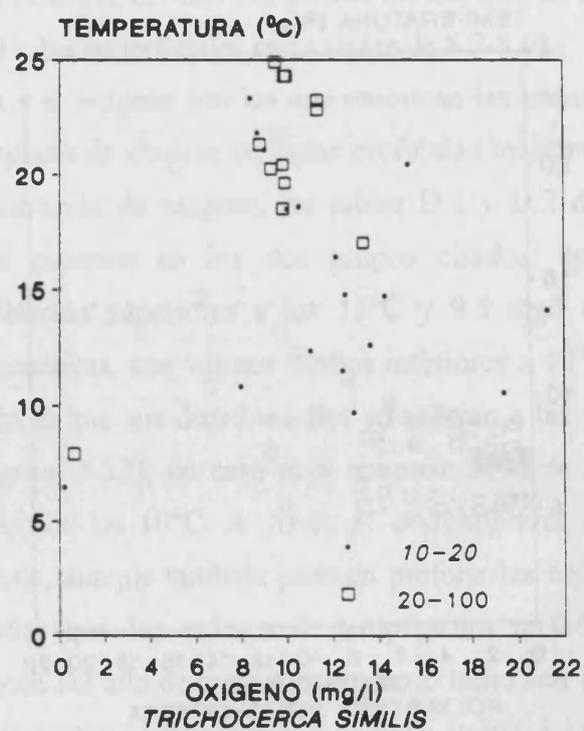
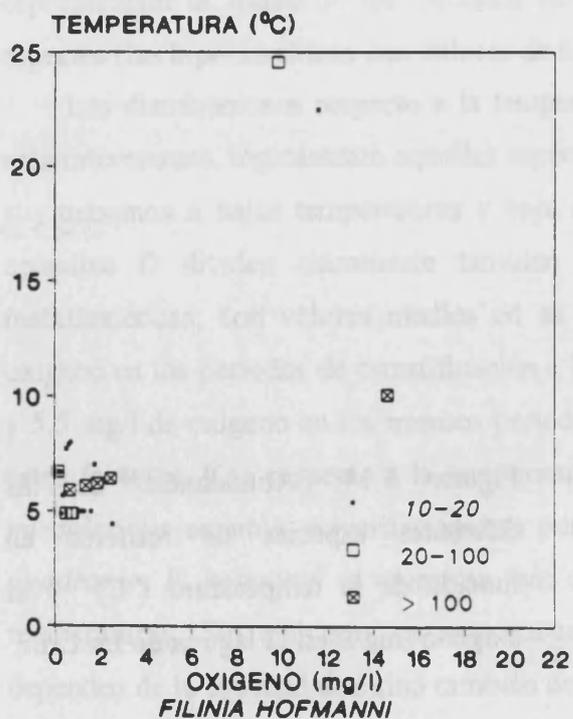
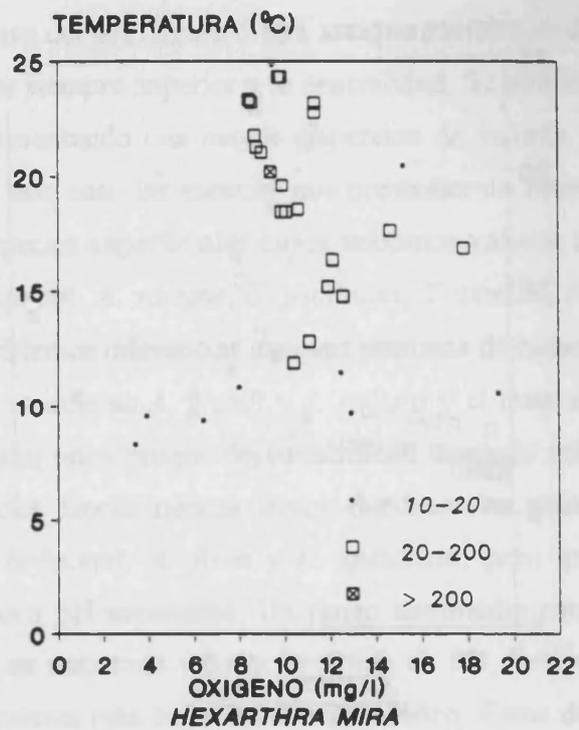
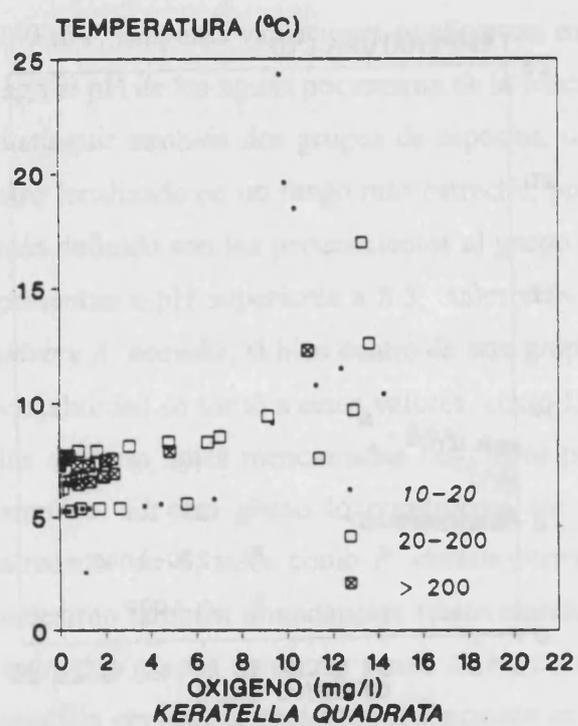


Figura 5.14. Continuación

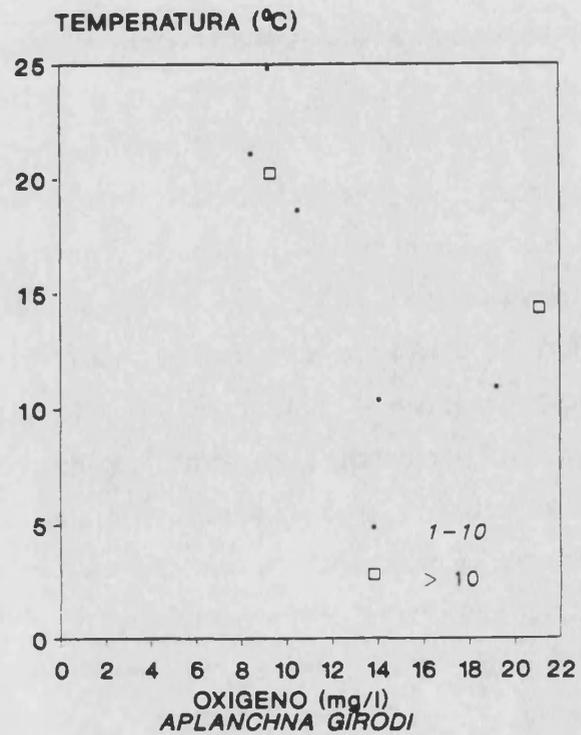
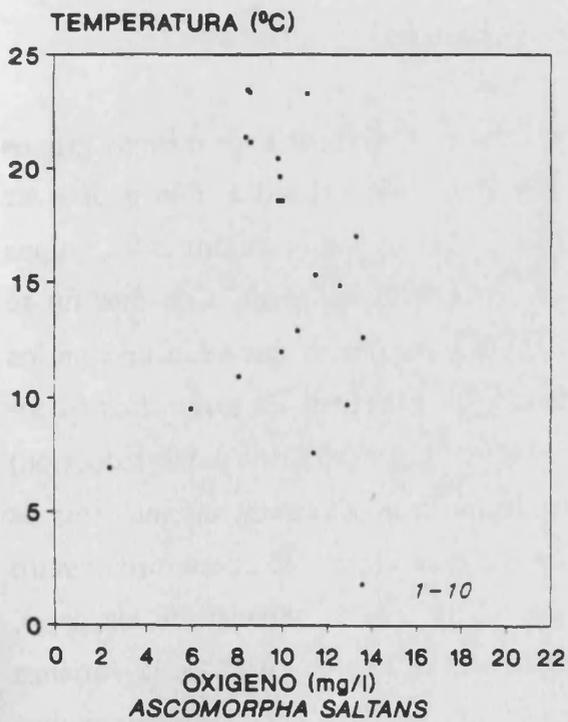
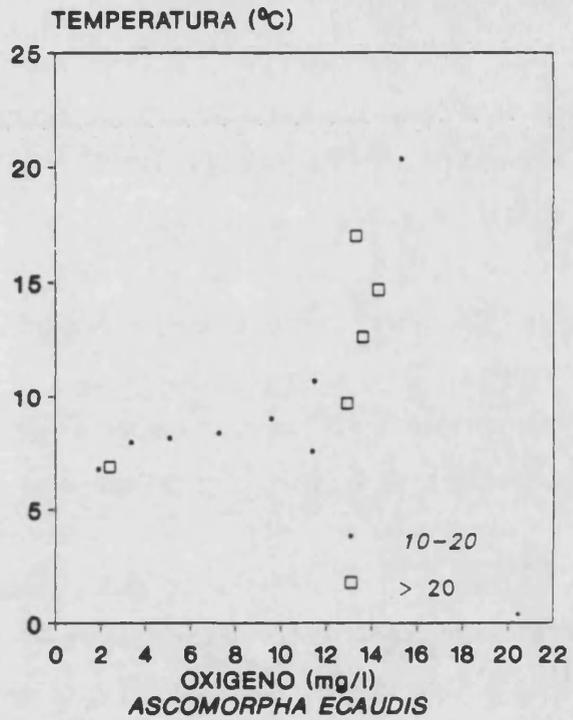
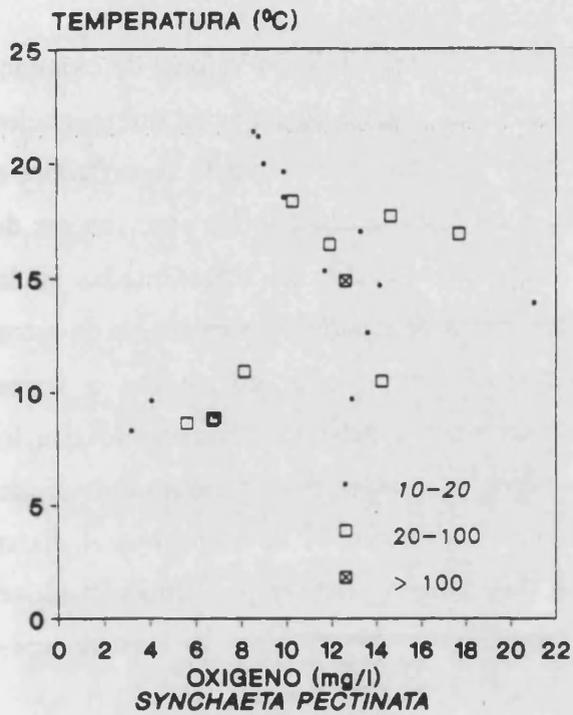


Figura 5.14. Continuación

Ascomorpha saltans.

En cuanto a las abundancias de las distintas especies en función de los valores de oxígeno, se pueden distinguir fácilmente en las figuras 5.13 los dos grupos de especies diferenciados anteriormente para los otros parámetros, el de las especies que hemos denominado superficiales o epi-metalimnéticas y el de las hipolimnéticas. Asimismo, las distribuciones de las abundancias de los organismos en función de la temperatura y el oxígeno conjuntamente representadas en la figura 5.14, muestran claramente las distribuciones que serían de esperar para cada uno de estos dos grupos. Se observa además como *F. hofmanni* y *A. miraclei* se distribuyen a bajas temperaturas y bajas concentraciones de oxígeno de un modo mucho más restringido que lo puedan hacer otras especies hipolimnéticas que también presentan altas concentraciones de individuos a bajas temperaturas y bajos niveles de oxígeno, tales como *P. dolichoptera*, *A. fissa* o *K. quadrata*. *A. fissa* es la que presenta una distribución más amplia encontrándose prácticamente en todas las combinaciones. En el extremo opuesto se encuentran las especies epi-metalimnéticas: *H. mira*, *T. similis*, *S. pectinata*, *A. saltans*, *A. ecaudis* y *A. girodi*.

5.4 Análisis estadísticos multivariantes: asociaciones de especies

Ya que los diferentes parámetros físico-químicos parecen determinar unos mismos grupos de especies, se consideró que la existencia de una importante variabilidad común podría ser estudiada con un análisis de estadística multivariante, dicho análisis podría confirmar los grupos o asociaciones de especies en relación con estos parámetros físico-químicos. Con este fin se realizó un análisis de componentes principales (figuras 5.15 y 5.16) en el que se incluyeron los datos de densidad de población de las especies de rotíferos y los valores de los parámetros físico-químicos (temperatura, oxígeno, conductividad, pH, y potencial de óxido-reducción) determinados en los mismos días y profundidades en los que fueron tomadas las muestras de rotíferos. En dicho análisis, que se efectuó sin rotación posterior alguna, se encontraron cuatro factores principales de los que en su conjunto explican el 68% de la varianza de los datos, repartiéndose de la siguiente manera: el primer factor explica el 31% (un 46% de la varianza común), el segundo el 18% (un 26 % de la varianza común), mientras que el tercer factor explica un 10% (15% de la varianza común) y el cuarto el 9% (13% de la varianza común).

Los resultados del análisis muestran (figuras 5.15 y 5.16) que respecto al primer factor, todos los parámetros físico-químicos presentan una gran correlación positiva (> 0.8), excepto el potencial de óxido-reducción que muestra una correlación mucho más pequeña y la conductividad sin apenas correlación. En cuanto al segundo factor sólo el potencial de óxido-reducción está correlacionado, pero con un coeficiente bajo (0.36). El tercer factor separa a la temperatura y la conductividad que quedan en la parte negativa, mientras que el oxígeno, el pH y el potencial de óxido-reducción se encuentran en la parte positiva. La conductividad y el potencial de óxido-reducción son los que muestran coeficientes mayores con dicho factor (-0.63 y 0.68 respectivamente). El cuarto factor no está correlacionado con ninguno de los parámetros físico-químicos (los coeficientes llegan a lo sumo a valores de 0.1), presentando sólo correlaciones con las especies de rotíferos, que se pueden ver en la figura 5.17, ya que este factor cuarto es prácticamente igual al que se encontró como factor tercero y último en un análisis posterior en el que no se consideraban las variables físico-químicas y que se representa en dicha figura 5.17.

En cuanto a las especies de rotíferos, el primer factor ordena precisamente las especies según su distribución vertical mostrando una asociación negativa con las especies que se encuentran en las capas más profundas, tales como *A. miraclei*, *P. dolichoptera* y *F. hofmanni*, en concreto separa a *A. miraclei* de las demás. En la parte positiva de dicho eje muy cercanas al cero se encuentran especies que se han incluido en el grupo de las hipolimnéticas tales como *K. quadrata* y *A. fissa*, pero cuyos patrones de distribución varían a lo largo del año, encontrándose también en capas superficiales. En la parte más positiva de este factor se encuentran las especies de superficie tales como *H. mira*, *S. pectinata*, *A. saltans*, *A. girodi*, *T. similis* y *A. ecaudis*. Esto está de acuerdo con la ordenación de los parámetros físico-químicos, es decir, todos excepto la conductividad presentan valores mayores en el epi-metalimnion disminuyendo drásticamente en el hipo-metalimnion. El segundo factor separa a las especies *P. dolichoptera*, *K. quadrata*, *A. fissa* y *F. hofmanni* de las demás. Estas especies presentaron un mayor crecimiento en el verano de 1988 que en el de 1987 y migraban desde las capas correspondientes al metalimnion, a finales de primavera, a la oxiclina, a finales de verano. Por ello presentan poca correlación con los parámetros físico-químicos, sólo el potencial de óxido-reducción tendía a ser más bajo en verano de 1988 y en profundidad. El tercer factor corresponde a la variabilidad que se da en las muestras hipolimnéticas en los diferentes meses del

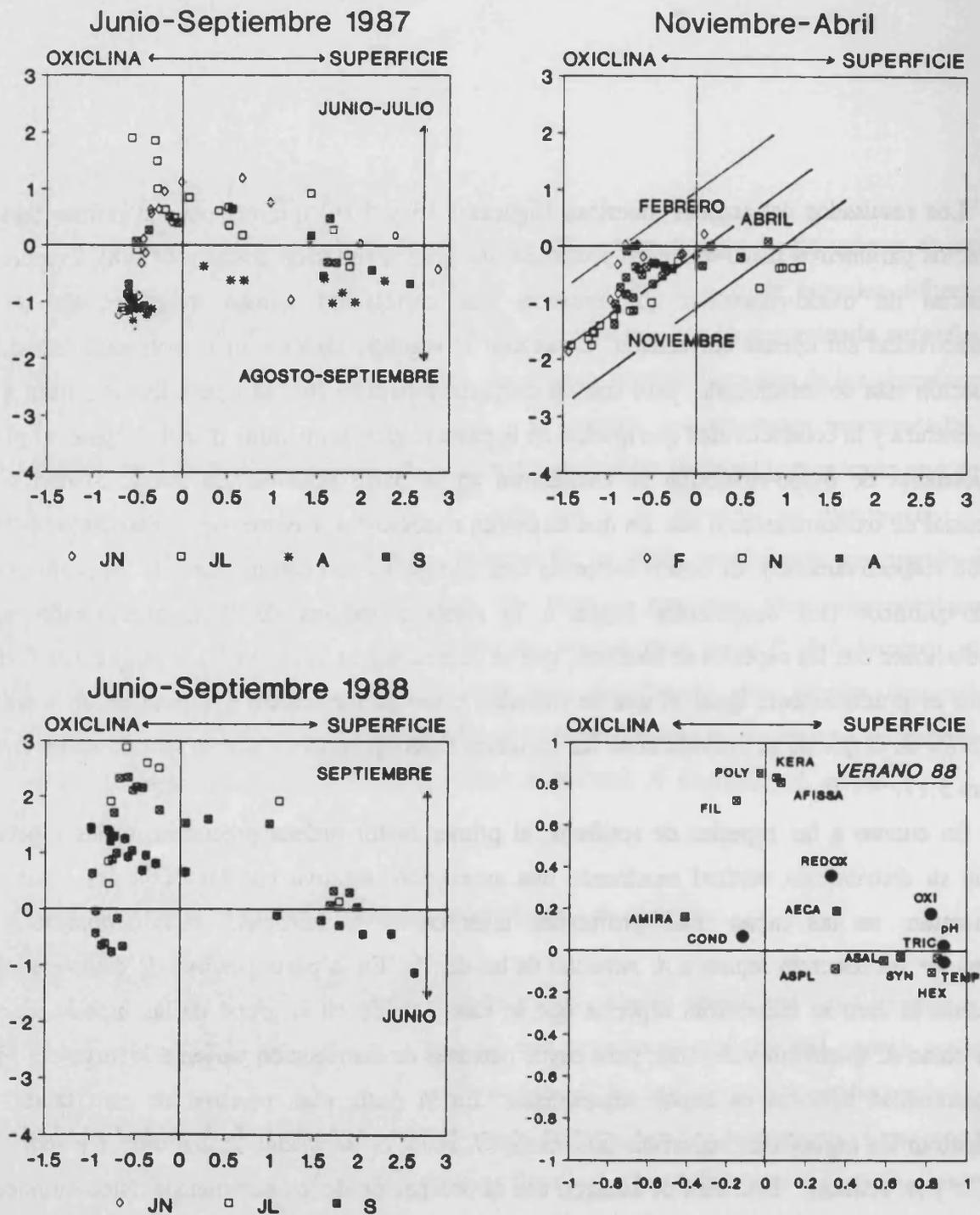


Figura 5.15. Análisis de componentes principales realizado con 16 variables correspondientes a las 11 especies de rotíferos y los 5 parámetros físico-químicos, previamente transformados logarítmicamente. En las figuras se muestran los coeficientes de correlación de las variables respecto a los dos primeros factores (1, 2). Asimismo, se han representado separadamente las muestras correspondientes a los periodos cálidos de aguas estratificadas de ambos años (junio-septiembre) y las de los periodos fríos de mezcla vertical (noviembre-abril). Las abreviaturas usadas son: AECA, *Ascomorpha ecaudis*; AFISSA, *Anuraeopsis fissa*; AMIRA, *Anuraeopsis miraclei*; ASAL, *Ascomorpha saltans*; ASPL, *Asplanchna girodi*; FIL, *Filinia hofmanni*; HEX, *Hexarthra mira*; KERA, *Keratella quadrata*; OXI, oxígeno; pH, pH; POLY, *Polyarthra dolichoptera*; REDOX, potencial redox; SYN, *Synchaeta pectinata*; TEMP, temperatura; TRIC, *Trichocerca similis*.

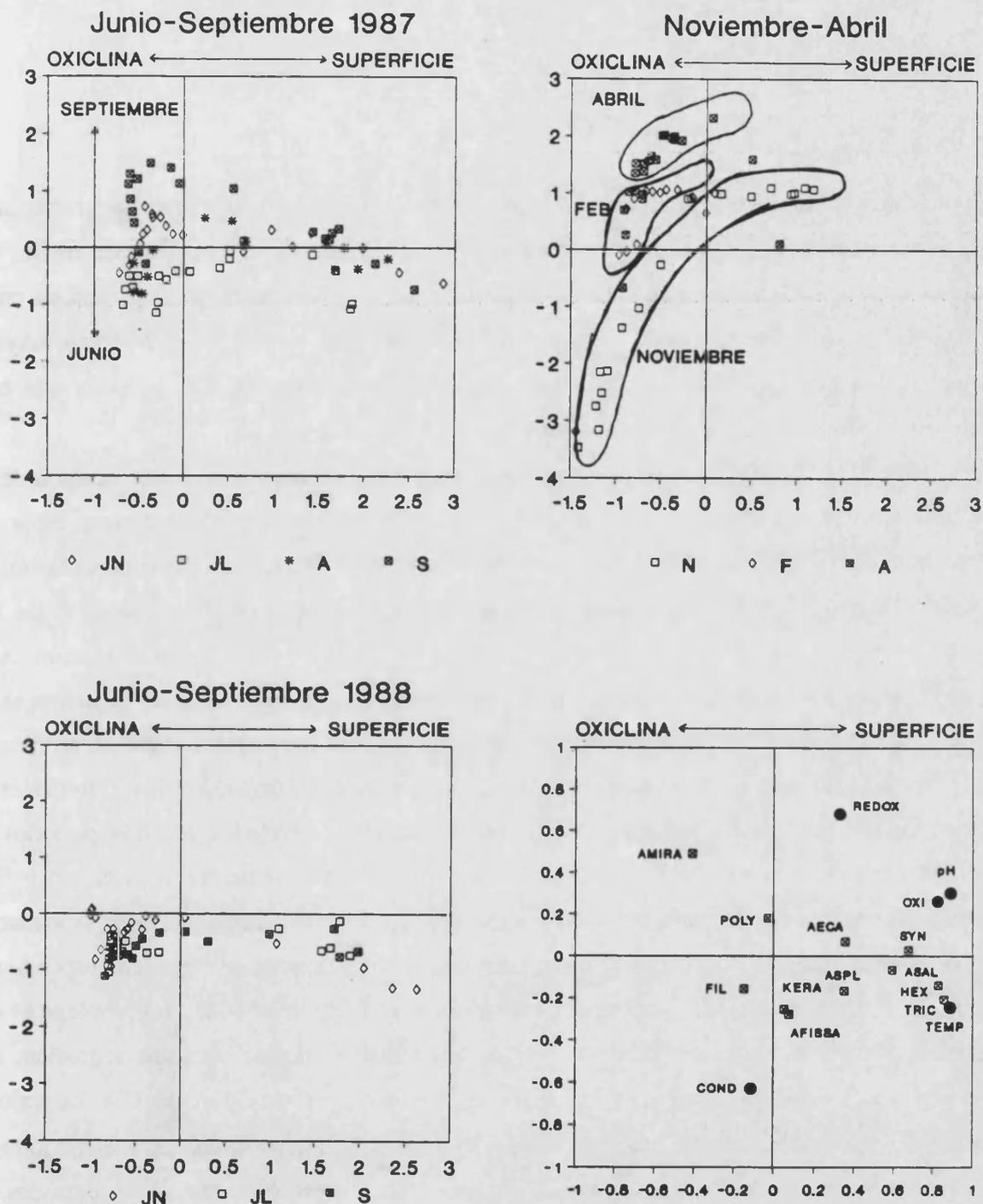


Figura 5.16. Análisis de componentes principales realizado con 16 variables correspondientes a las 11 especies de rotíferos y los 5 parámetros físico-químicos, previamente transformados logarítmicamente. En las figuras se muestran los coeficientes de correlación de las variables respecto a los factores primero y el tercero (1, 3). Asimismo, se han representado separadamente las muestras correspondientes a los periodos cálidos de aguas estratificadas de ambos años (junio-septiembre) y las de los periodos fríos de mezcla vertical (noviembre-abril). Las abreviaturas usadas son: AECA, *Ascomorpha ecaudis*; AFISSA, *Anuraeopsis fissa*; AMIRA, *Anuraeopsis miraclei*; ASAL, *Ascomorpha saltans*; ASPL, *Asplanchna girodi*; FIL, *Filinia hofmanni*; HEX, *Hexarthra mira*; KERA, *Keratella quadrata*; OXI, oxígeno; pH, pH; POLY, *Polyarthra dolichoptera*; REDOX, potencial redox; SYN, *Synchaeta pectinata*; TEMP, temperatura; TRIC, *Trichocerca similis*.

año, por lo que contrapone sobre todo a la conductividad y en menor grado la temperatura con el potencial de óxido-reducción y en menor medida con el oxígeno y el pH. De este modo, este factor contrapone las especies que tienen crecimientos alternativos en las capas profundas en las distintas fechas de muestreo. Así *A. fissa* y *K. quadrata*, que son las que presentan mayores correlaciones negativas (-0.28 y -0.25 respectivamente) se contraponen a *A. miraclei* que es la única especie con un coeficiente positivo significativo (0.49).

Puesto que hay una alternancia de estas especies en los dos periodos de estratificación de los años consecutivos considerados, podría tratarse de un factor que distinguiera entre estos dos años diferenciando sobre todo las muestras de profundidad de finales de verano de cada uno de los años. Por ello, al separar las muestras en las figuras 5.15 y 5.16 con respecto a los tres periodos: primera y segunda estratificación y mezcla, se observa que en la estratificación existe una gran dispersión respecto al primer factor quedando en la parte positiva las muestras de superficie y en la negativa las de la oxiclina, mientras que en los meses en que se produce la mezcla hay un gran incremento de valores negativos, fundamentalmente debidos a crecimientos en muestras profundas. En cuanto al factor 2 se observa que separa los dos periodos de estratificación invirtiendo los valores respecto a los meses correspondientes al principio y final del periodo considerado. De este modo diferencia sobre todo las muestras que corresponden al final de dicho periodo, el primer año presentan valores negativos que corresponden a comunidades más diferenciadas con menos individuos y con una diversidad mayor mientras que el segundo año estos meses de finales de verano experimentaron más bien una regresión, con crecimientos de pocas especies que los llevaron a situaciones más parecidas a los valores iniciales de la sucesión del año anterior. Respecto a los meses correspondientes al periodo de mezcla la separación es menos evidente. Las muestras correspondientes a los periodos de estratificación respecto al factor 3 también presentan comportamientos diferentes según se trate del primer o segundo periodo de estratificación. Este factor diferencia especialmente las muestras de finales del verano de 1987 con valores positivos altos, principalmente en profundidad, tanto las del principio del periodo como las de la segunda estratificación, las cuales presentan todos valores bajos en la parte negativa de dicho factor. Respecto al periodo de mezcla quedan más o menos ordenados los diferentes meses de abril en el lado más positivo, ya que es el mes de conductividades más bajas y crecimiento fitoplactónico alto con los consiguientes valores altos de redox, oxígeno y pH.

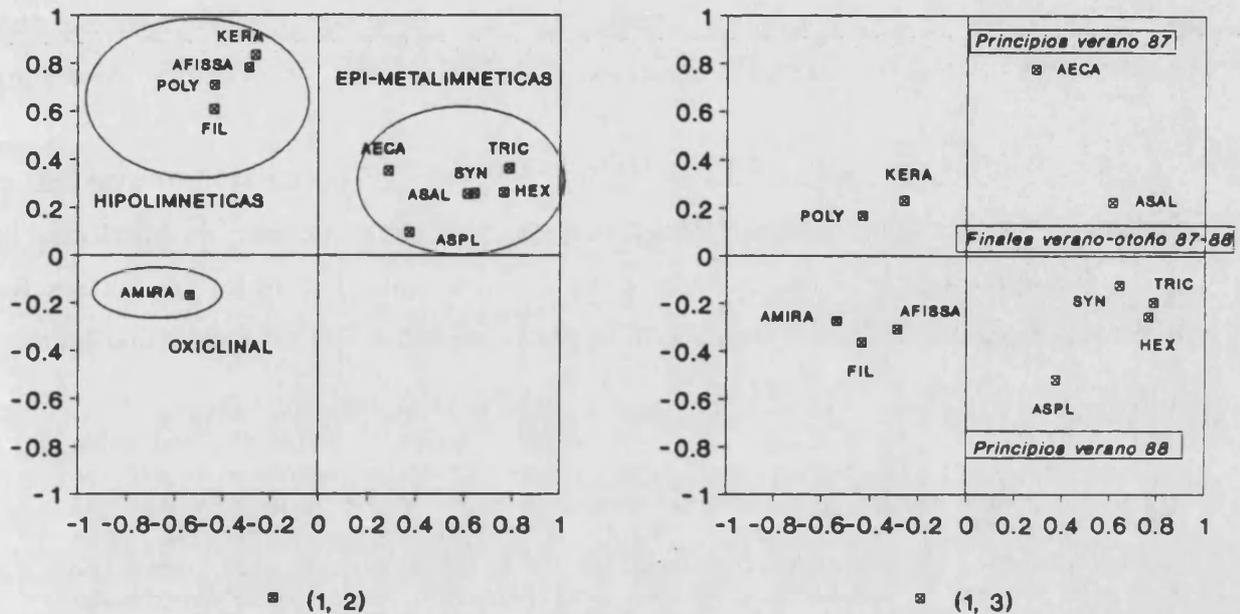


Figura 5.17. Análisis de componentes principales sobre los datos de los recuentos de organismos previamente transformados logarítmicamente. En las figuras se muestran los coeficientes de correlación de las variables respecto a las dos primeras componentes principales (1, 2), y a la primera y tercera (1, 3). Las abreviaturas usadas son: AECA, *Ascomorpha ecaudis*; AFISSA, *Anuraeopsis fissa*; AMIRA, *Anuraeopsis miraclei*; ASAL, *Ascomorpha saltans*; ASPL, *Asplanchna girodi*; FIL, *Filinia hofmanni*; HEX, *Hexarthra mira*; KERA, *Keratella quadrata*; POLY, *Polyarthra dolichoptera*; SYN, *Synchaeta pectinata*; TRIC, *Trichocerca similis*.

El considerar en el análisis tanto a los parámetros físico-químicos como a las abundancias de las diferentes especies de rotíferos nos puede ayudar a relacionar los diversos factores implicados en las distribuciones de especies de rotíferos, sin embargo, tal análisis puede impedir el detectar asociaciones o comunidades de rotíferos que podrían verse enmascaradas por los valores de los parámetros físico-químicos, para evitar este problema y poner de manifiesto las asociaciones de especies comentadas, nos ha parecido oportuno el realizar un análisis de componentes principales considerando sólo los datos de los recuentos de rotíferos previamente transformados logarítmicamente. De este análisis de componentes principales también sin realizar rotación resultaron tres factores principales en lugar de cuatro, siendo el primero y el segundo bastante similares a los correspondientes factores del análisis que incluía a

las variables físico-químicas. El tercer factor de este análisis se corresponde con el cuarto del análisis anterior, siendo sus coeficientes de correlación con las especies de rotíferos casi idénticos en los dos análisis. La proporción de varianza explicada por el segundo factor en este análisis (tabla 5.2) es un poco mayor que la explicada en el análisis anterior en detrimento del primer factor.

Con el objetivo de comparar los dos análisis efectuados e intentar avanzar algo más en la interpretación de los factores principales, se han calculado los coeficientes de correlación lineal de los factores encontrados en este último análisis con cada uno de los parámetros físico-químicos además de con la bioabundancia y la diversidad (tabla 5.2). Se aprecia que los factores

Tabla 5.2. Varianza explicada por cada factor del análisis de componentes principales, realizado con 11 variables correspondientes a las 11 especies mayoritarias de rotíferos. Asimismo se expresan los coeficientes de las correlaciones lineales de los factores 1, 2 y 3 con cada uno de los parámetros físico-químicos sometidos a estudio así como con la diversidad y el número total de rotíferos. Los valores de oxígeno, temperatura, potencial de óxido-reducción, conductividad y número de individuos han sido previamente transformados logarítmicamente.

	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3
% VARIANZA EXPLICADA	27	24	13
OXIGENO	0.32	0.10	< 0.01
TEMPERATURA	0.45	0.04	0.02
pH	0.45	0.04	< 0.01
POTENCIAL REDOX	< 0.01	0.07	< 0.01
CONDUCTIVIDAD	< 0.01	< 0.01	< 0.01
DIVERSIDAD	0.22	0.12	0.06
Nº INDIVIDUOS	0.11	0.45	0.07

físico-químicos sólo muestran correlaciones significativas con el primer factor y entre ellos solo la temperatura, el pH y el oxígeno las muestran. Respecto al segundo factor se pueden apreciar débiles correlaciones con el oxígeno y el potencial de óxido-reducción, mientras que el tercer factor, no está relacionado con ninguno de los parámetros físico-químicos estudiados. Todo ello concuerda con la comparación de los resultados obtenidos en los dos análisis, las dos primeras componentes son muy similares y la tercera es prácticamente igual a la cuarta del análisis en el que se han considerado a los factores físico-químicos. Es decir, las correlaciones de los parámetros físico-químicos con los factores principales de este análisis con sólo especies de rotíferos se corresponden con las correlaciones o coeficientes de carga obtenidos en el análisis anterior cuando estaban incluidos dentro del mismo (figuras 5.15; 5.16 y tabla de apéndice E), aunque dichos coeficientes de correlación en el caso en que los parámetros físico-químicos son externos al análisis, son mucho más bajos. En esta tabla también se aprecia que es el factor 1 el más relacionado con la diversidad ya que tiene correlaciones altas con las especies que no muestran grandes crecimientos. Sin embargo respecto al número total de individuos es el factor 2 el que muestra una mayor correlación, presentando una distribución de sus valores positivos correspondiente a los máximos de población de la mayoría de especies (metalimnion de verano).

Cuando se representan los valores de la componente principal o factor 1 para cada una de las muestras, en forma de isolíneas respecto a los meses del año y a las profundidades, forman un paisaje que recuerda a la representación de isolíneas del oxígeno (figura 5.18). Presentando una zona de máximos valores en el metalimnion y una zona de valores negativos que aproximadamente se corresponde con la zona de la oxiclina en la que se da el gradiente de oxígeno, mientras que la isolínea del cero se corresponde aproximadamente con la isolínea de extinción del oxígeno, donde se incrementa la diversidad. Tal y como se ha indicado anteriormente, parece ser que el factor 1 muestra una clara relación con la profundidad y con los parámetros ambientales con gradiente vertical marcado (oxígeno, pH y temperatura; tabla 5.2). Las especies que muestran valores positivos de los coeficientes de carga o correlaciones corresponden a especies de superficie mientras que las que los presentan negativos se corresponderían a especies que muestran sus máximos en capas profundas.

En cuanto al factor 2 presenta un paisaje en isolíneas (figura 5.19) en el que los mayores valores positivos se concentran en el metalimnion de los meses más cálidos estratificados, por lo que está correlacionado con el oxígeno y el potencial de óxido-reducción (tabla 5.2). Esta

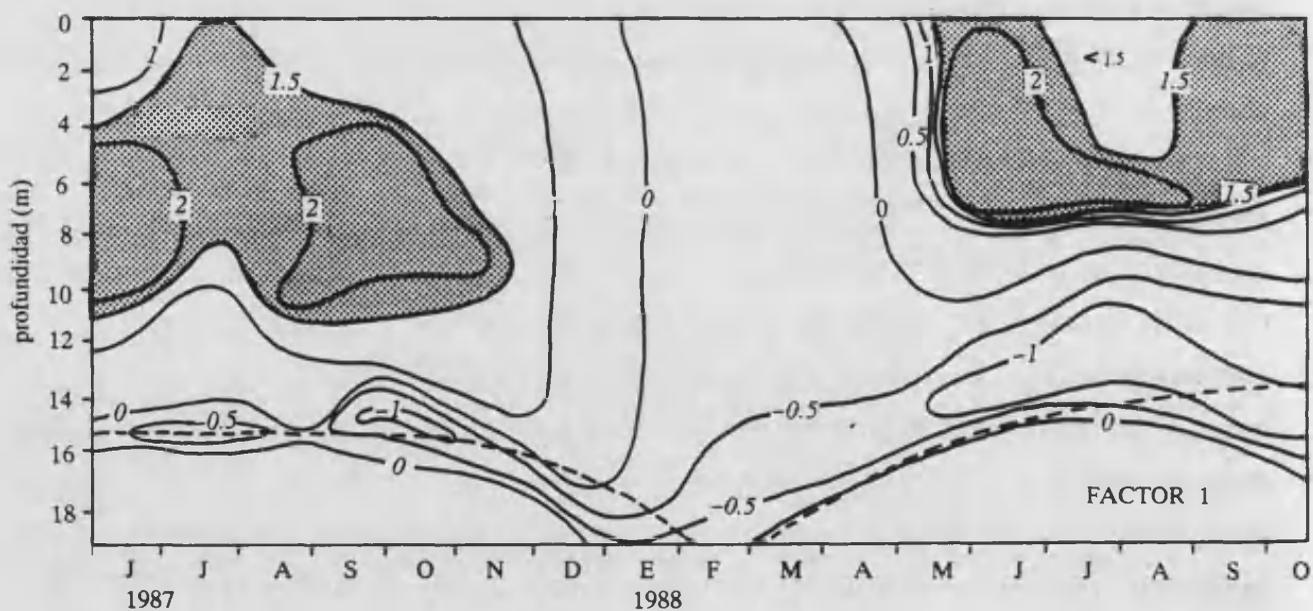
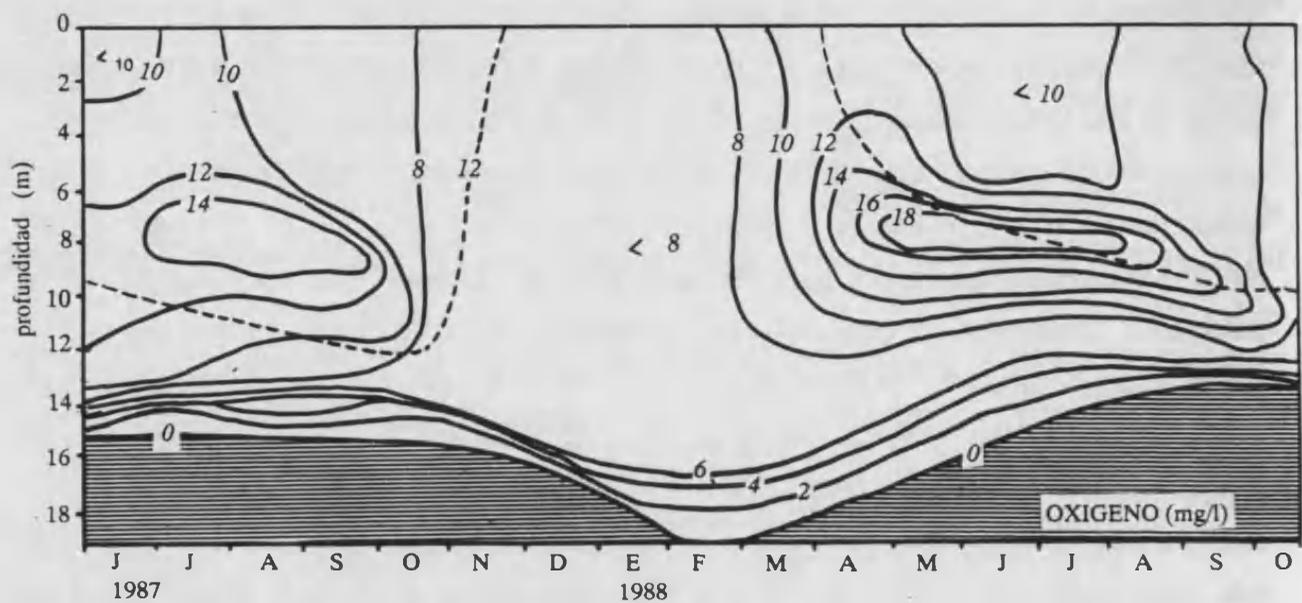


Figura 5.18. Figura superior; representación en isóneas de las concentraciones de oxígeno en función del mes y la profundidad a lo largo del periodo de estudio en la laguna de La Cruz. La línea de trazos indica la isónea de temperatura. Figura inferior; representación en isóneas de las componentes principales (Factor 1) en función del mes y la profundidad. Se indica en línea de trazos la isónea de extinción del oxígeno.

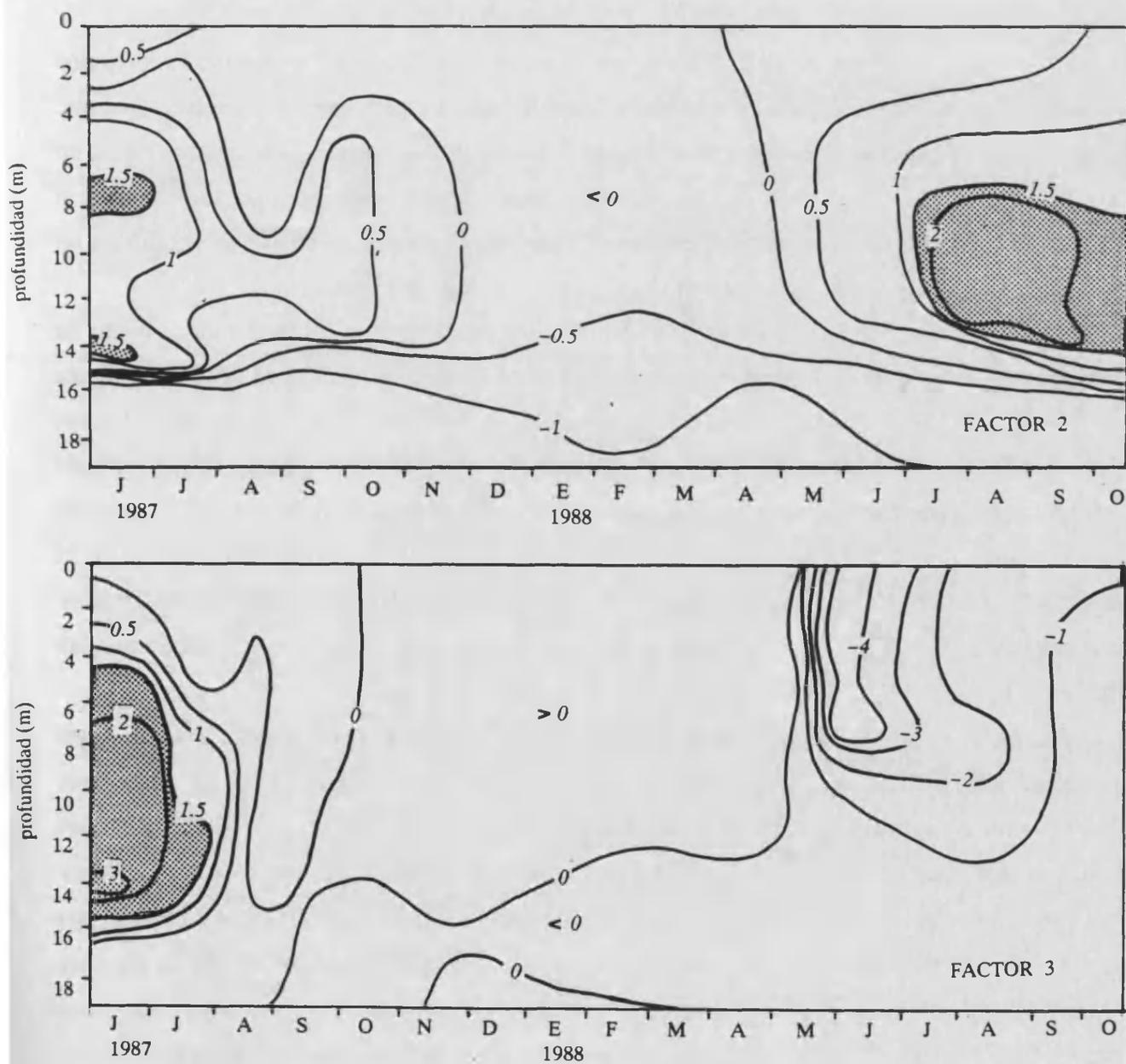


Figura 5.19. Representación en isolíneas de los valores de las dos componentes principales restantes (Factores 2 y 3), en función del mes y la profundidad.

distribución de los valores altos también se corresponde con los máximos de población de muchas especies (la tabla 5.2 muestra también una correlación alta con el total de individuos). Mientras que en los periodos más fríos tienen valores negativos y en profundidad se dan los máximos valores negativos durante todo el año excepto durante la segunda estratificación. Por ello este factor distingue las muestras de profundidad de uno y otro año.

Respecto al factor 3 parece discriminar entre los dos años de estudio. Distingue los periodos iniciales de la estratificación en los dos años. El primer año presenta valores altos positivos que disminuyen y se hacen negativos a finales de verano para volver a ser positivos, aunque bajos, en el mixolimnion durante la mezcla. Durante la segunda estratificación cambian radicalmente a valores negativos, especialmente altos en junio en las capas de arriba y luego más profundas en julio, a finales de verano éstos continúan siendo negativos pero mucho más bajos.

De esta forma, este último análisis reorganizó a los datos de zooplancton en un conjunto de componentes principales tal que puestas las variables originales en función de ellas en la figura 5.17 se aprecia un claro agrupamiento de las especies de rotíferos respecto a las dos primeras determinado por su distribución vertical. Separando tres grupos de especies: (1) las especies epilimnéticas con abundancias en la parte superior del metalimnion; (2) las especies hipolimnéticas que también presentan crecimientos en la parte inferior del metalimnion y (3) la especie *A. miraclei*, prácticamente exclusiva de las capas inmediatas a la extinción de oxígeno. Los perfiles verticales de los dos últimos grupos de especies mencionados corresponderían a las figuras 5.3 y los del primer grupo a las figuras 5.4.

Así pues, el primer factor principal separa mucho mejor que en el análisis anterior a las especies hipolimnéticas de las epi-metalimnéticas, ya que cuando se incluyeron los parámetros físico-químicos en el análisis, tales como temperatura, oxígeno y pH, estos resultaron ser las variables que presentaron mayores coeficientes de carga o correlaciones con este primer factor principal. Estos parámetros ambientales, además de una variación vertical, están sujetos a una variación anual, lo que produjo una disminución de las correlaciones negativas de las especies hipolimnéticas con dicho factor principal. El análisis de componentes principales con solo las especies de rotíferos (figura 5.17) muestra una clara separación respecto del primer factor principal entre las especies *Trichocerca similis*, *Hexarthra mira*, *Synchaeta pectinata*, *Ascomorpha saltans*, *Asplanchna girodi*, y *Ascomorpha ecaudis* con correlaciones positivas y las especies *Anuraeopsis miraclei*, *Polyarthra dolichoptera*, *Filinia hofmanni*, *Anuraeopsis*

fissa y *Keratella quadrata* con correlaciones negativas. El factor principal 2 separa también estos grupos de especies pero además desdobra el grupo de especies de profundidad, distanciando *A. miraclei* de las demás. *A. miraclei* queda claramente diferenciada presentando una correlación negativa respecto a dicho factor, mientras que las otras especies hipolimnéticas presentan altas correlaciones positivas y las epilimnéticas correlaciones positivas bajas. En el análisis anterior (figura 5.15) influido por los parámetros físico-químicos el factor 1 presenta altas correlaciones positivas con algunas especies epilimnéticas y correlaciones muy pequeñas con las especies hipolimnéticas, mientras que el factor 2 presenta altas correlaciones positivas con las especies hipolimnéticas: *P. dolichoptera*, *K. quadrata*, *A. fissa* y *F. hofmanni*. Respecto al factor 2 *A. miraclei* queda con un coeficiente positivo bajo junto con las especies de superficie, todas ellas más o menos indiferentes, con coeficientes extraordinariamente bajos, la mayoría en la parte negativa. En cuanto al tercer factor de difícil interpretación parece discriminar entre los dos años, o periodos, sometidos a estudio, así, tal y como se ha hecho constar en la figura 5.17, separa las especies que se encontraban preferentemente a principios de uno u otro verano (junio y julio) siendo más indiferentes las especies de finales de verano-principios de otoño.

5.5 Relación con la comunidad fitoplanctónica

En las pautas de distribución de los organismos no solo se encuentran comprometidos una serie de factores abióticos sino que también influyen gran número de factores bióticos tales como depredación, hábitos alimenticios, migraciones diarias o competencia. La contribución de éstos en las distribuciones observadas resulta menos evidente de poner de manifiesto que en el caso de los parámetros físico-químicos, mucho más fáciles de medir, pudiéndose determinar la existencia y localización de gradientes que contribuyen a la estratificación de las aguas, y como consecuencia, a la de los organismos. Además, la variación cíclica anual de los mismos determina una sucesión característica de los organismos del plancton. Los factores climáticos pueden variar de año en año e imponen unos ciclos de producción del fitoplancton y de cambios en la composición específica de sus comunidades que repercuten evidentemente en las distribuciones del zooplancton. Por tanto, éste, además de responder directamente a factores ambientales lo hace también indirectamente a través de su dependencia de la producción y

composición del fitoplancton.

En este apartado, se relacionan las diferentes poblaciones de rotíferos con las diferentes comunidades algales estudiadas en muestras recogidas simultáneamente junto a las de rotíferos (Dasi, 1990; Dasi y Miracle, 1991; datos facilitados por M.J. Dasi). Primeramente se relacionan los datos integrados en las diferentes fechas de muestreo para una columna de agua de un m². Dicha columna a su vez ha sido dividida en dos fracciones separando las capas epi-metalimnéticas de las hipolimnéticas y oxiclinales durante la estratificación térmica, la división se realizó del mismo modo descrito en el apartado 5.2 y las profundidades utilizadas en la división pueden verse en el apéndice C y en la figura 3.2. En segundo lugar, para poner de manifiesto las relaciones existentes se ha realizado un análisis de correlación canónica, el cual se suele utilizar para comparar dos conjuntos de variables en un espacio multivariado. Este análisis trata de encontrar las combinaciones lineales de cada uno de los conjuntos de variables de forma que dichas combinaciones presenten la máxima correlación. En este análisis, los grupos de variables prefijados fueron las densidades de rotíferos, consistentes en las 11 especies anteriormente mencionadas y las densidades del fitoplancton consistentes en 23 géneros que agrupaban a los individuos de varias especies.

En la figura 5.20 se muestra la variación estacional del número total de células algales y de rotíferos presentes en la laguna durante el periodo de muestreo, tanto en su conjunto como agrupadas epi e hipolimnéticamente. De la variación de la concentración algal y de rotíferos en conjunto se observan varios picos algales que corresponden a los meses de julio-agosto del año 1987 y a los meses de abril, julio-septiembre del año 1988, en ambos casos tales picos van seguidos de sendos aumentos de la población de rotíferos en meses sucesivos. Sin embargo, si observamos la distribución algal en la división de la columna de agua, nos encontramos con que el pico de julio-agosto del año 1987 se desdobra en un pico en julio que corresponde a la fracción epi-metalimnética y uno en agosto que corresponde a la hipolimnética; en cambio todos los picos de 1988 corresponden a la fracción epi-metalimnética debido a la estratificación menos marcada en 1988.

Concretamente, se observa que en el año 1987, el pico de agosto de la fracción hipolimnética es el que presenta una mayor relación con las comunidades de rotíferos, ya que el pico algal correspondiente a julio y que es debido a un aumento espectacular en la densidad poblacional de *Crucigenia rectangularis*, cloroficea colonial de colonia bastante grande para los

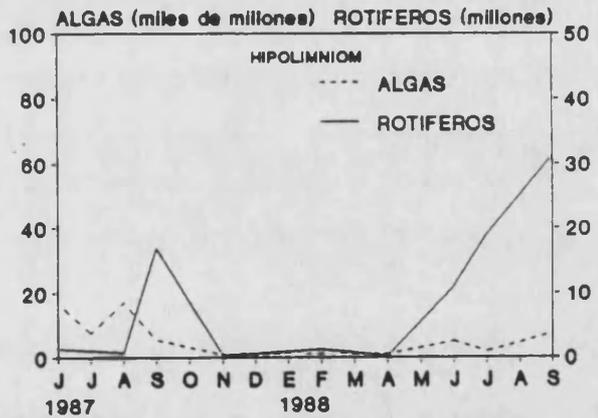
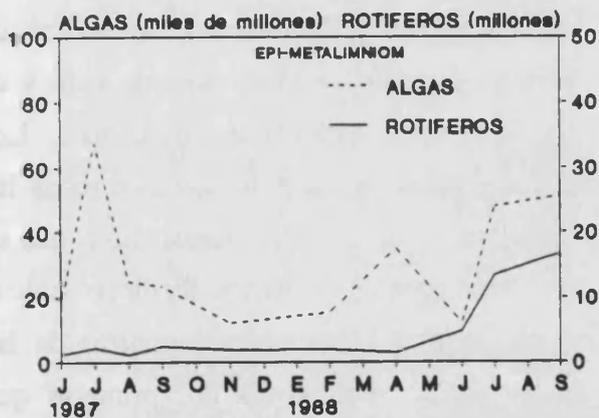
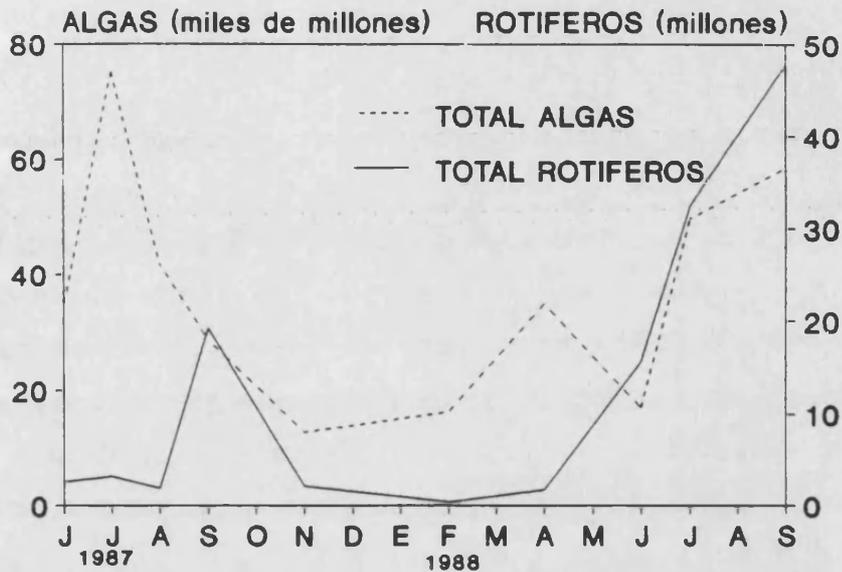


Figura 5.20A. Distribución estacional del número total de algas y rotíferos por m^2 presentes en la columna de agua correspondiente al centro de la laguna de La Cruz durante el periodo de estudio. B. Distribución estacional del número de algas y de rotíferos por m^2 presentes en la fracciones epi-metalimnéticas e hipolimnéticas respectivamente de dicha columna.

rotíferos (apéndice C), no se traduce en un aumento directo en la población de rotíferos. Sin embargo, el pico de *Crucigenia* sí que podría haber influido en el incremento posterior de rotíferos en el hipolimnion ya que su sedimentación y descomposición ulterior habría contribuido al desarrollo de un picoplancton y a un enriquecimiento de nutrientes en el medio en capas más profundas. Además, el pico algal de agosto de 1987 que corresponde a flageladas de pequeño tamaño como *Pedinomonas* y *Rhodomonas* se debería en parte al reciclaje de los nutrientes procedentes del pico de *Crucigenia*. Estas flageladas sí que pueden ser utilizadas como alimento por los rotíferos. Así pues, estos picos algales vienen seguidos por un pico en la población de rotíferos en septiembre debido principalmente a un crecimiento espectacular de la

miraclei, en la oxiclina.

En el mes de abril de 1988, las mayores concentraciones algales epilimnéticas pertenecen a los grupos de *Pedinomonas*, *Cyclotella* y *Peridinium* mientras que las especies de rotíferos predominantes en el mismo periodo son *P. dolichoptera* y *K. quadrata* (apéndice C). En julio de 1988, de nuevo *Crucigenia rectangularis*, es el alga predominante con proporciones mayores del 50%, este año eran también abundantes en este mes *Cyclotella*, *Monoraphidium* y *Rhodomonas*, mientras que las especies de rotíferos predominantes en el mismo periodo son *A. fissa* y *K. quadrata*. En septiembre de 1988 de nuevo destacaron los incrementos de *Pedinomonas*, coincidiendo con el máximo metalimnético de abundancia de *Pedinomonas*, se alcanzó el máximo hipolimnético de *A. fissa*.

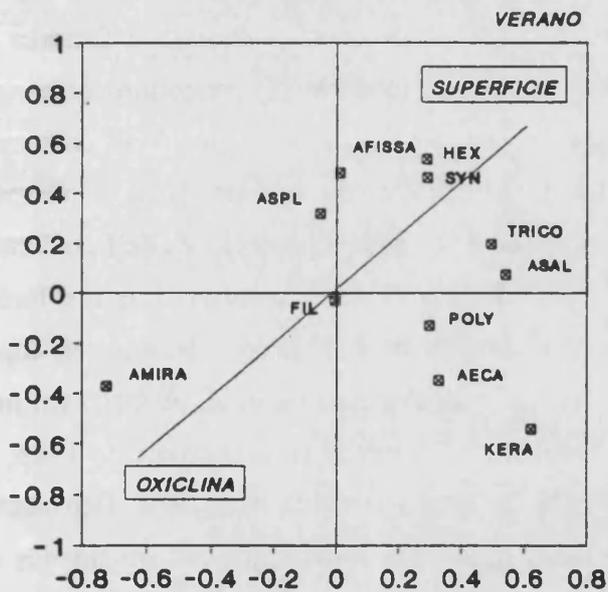
Para intentar detectar las asociaciones de especies algales y de rotíferos, se realizó un análisis de correlación canónica en el que se incluyeron los datos de los porcentajes de algas y de rotíferos sometidos a la transformación arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje. Los recuentos de las especies algales fueron agrupadas por géneros mediante la suma de todas las especies pertenecientes al mismo género, salvo en el caso de las crisofíceas, en el que se

agruparon géneros diferentes. En dicho análisis se encontraron 11 variables canónicas de las cuales se consideraron las dos primeras que mostraron unos índices de redundancia de 0.13 y 0.09 para el primer y segundo grupo de variables (rotíferos y algas) respectivamente y la segunda de 0.09 para el primer grupo y de 0.06 para el segundo. Estos índices son el resultado de multiplicar la correlación canónica al cuadrado por la varianza explicada por la variable canónica correspondiente de cada conjunto de variables. Todos estos valores se detallan en la tabla 5.3. El análisis de correlación canónica (figura 5.21), muestra los dos grupos de especies epilimnéticas y oxiclinales, tanto en el caso de

Tabla 5.3. Resultados del análisis de correlación canónica entre los grupos de algas y rotíferos.

Variables canónicas	1	2
Varianza explicada por la variable canónica fitoplacton	0.16	0.13
Varianza explicada por la variable canónica zooplancton	0.12	0.09
Correlación canónica al cuadrado	0.82	0.69
Índice de redundancia fitoplancton	0.13	0.09
Índice de redundancia zooplancton	0.09	0.06

ROTIFEROS



ALGAS

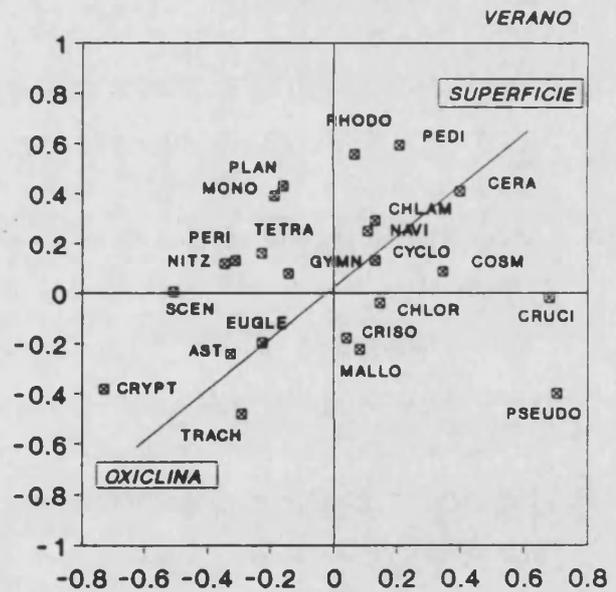


Figura 5.21. Analisis de correlación canónica entre los datos de los porcentajes de rotíferos y los de algas previamente sometidos a la transformación arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje. En las figuras se muestran las correlaciones entre las variables y los dos primeros factores tanto para las especies de rotíferos (1) como para las especies algales (2). Las abreviaturas usadas son: AECA, *Ascomorpha ecaudis*; AFISSA, *Anuraeopsis fissa*; AMIRA, *Anuraeopsis miraclei*; ASAL, *Ascomorpha saltans*; ASPL, *Asplachna girodi*; AST, *Astasia*; CERA, *Ceratium*; CHLA, *Chlamydomonas*; CHLO, *Chlorella*; COSM, *Cosmarium*; CRISO, *Chysophyceae*; CRUCI, *Crucigenia*; CRYP, *Cryptomonas*; CYCLO, *Cyclotella*; EUGLE, *Euglena*; FIL, *Filinia hofmanni*; GYMN, *Gymnodinium*; HEX, *Hexarthra mira*; KERA, *Keratella quadrata*; MALLO, *Mallomonas*; MONOR, *Monoraphidium*; NITZ, *Nitzschia*; NAVI, *Navicula*; PEDI, *Pedinomonas*; PERI, *Peridinium*; PLAN, *Planctonema*; POLY, *Polyarthra dolichoptera*; PSEUDO, *Pseudoquadrigula*; RHODO, *Rhodomonas*; SCEN, *Scenedesmus*; SYN, *Synchaeta pectinata*; TETRA, *Tetraedron*; TRACH, *Trachelomonas*; TRIC, *Trichocerca similis*.

los rotíferos como en el de las algas, es decir, la primera variable canónica muestra una distribución vertical clara, de forma que separa a *A. miraclei*, en el caso de los rotíferos y a los grupos de algas oxiclinales tales como *Cryptomonas*, *Astasia*, *Trachelomonas* y *Euglena*. En el extremo opuesto se encuentran especies epi-metalimnéticas tales como *Ceratium Crucigenia*, *Pseudoquadrigula* etc. (Dasi y Miracle 1991). Quizás la relación más clara que se puede observar en el análisis es el el grupo formado por *A. miraclei* y las especies algales pertenecientes a la oxiclina que se sitúan en el cuadrante correspondiente a la parte negativa de las dos variables. De cualquier modo, nos encontramos con un gran número de especies algales cuyas relaciones con las comunidades de rotíferos no responden exclusivamente a factores de tipo trófico. No obstante, parece ser que algunas especies de rotíferos se encuentran cercanas a especies algales con las que han sido relacionadas, así por ejemplo *A. girodi* se encuentra bastante próxima a *Peridinium*. Dicha observación parece coincidir con los datos disponibles sobre los hábitos alimenticios de *A. girodi* frecuentemente asociada a poblaciones de *Peridinium* (Pejler, 1965). *A. fissa*, se encuentra cercana a *Pedinomonas* y *Rhodomonas*. Los resultados algales muestran (apéndice C) que *Pedinomonas* alcanzaba densidades considerables en capas profundas, en agosto de 1987, coincidiendo con las máximas abundancias de *A. miraclei* del mes siguiente; también se encontraban altas poblaciones de *Pedinomonas* en septiembre de 1988, lo cual podría apuntar a que dicha especie también se encuentra asociada a *A. fissa*. Del mismo modo, las especies de *Cryptomonas* y *Rhodomonas* también muestran grandes densidades en capas profundas, siendo especialmente abundantes en febrero, julio y septiembre de 1988, lo que se podría relacionar con la abundancia de *Polyarthra* (Pejler, 1957a; Edmonson, 1965).

5.6 Alimentación del rotífero *Anuraeopsis fissa*

Se aislaron, de las capas correspondientes a la oxiclina de la laguna de La Cruz, individuos de la especie de rotífero *Anuraeopsis fissa* y algunas especies algales con las que se obtuvieron cultivos. Así se dispuso de cultivos de *Anuraeopsis fissa* y de las especies algales *Monoraphidium minutum*, *Monoraphidium sp.* y *Chlamydomonas sp.*. En un principio se emplearon cultivos algales de *Chlamydomonas sp.* o de *Monoraphidium minutum* congelados

para la alimentación en los procesos de obtención de los clones de rotíferos de la especie *Anuraeopsis fissa*, dando ambas especies algales resultados similares en cuanto al crecimiento de los rotíferos. Sin embargo, el cultivo de *Chlamydomonas* no pudo ser empleado posteriormente en las experiencias de alimentación, ya que se infectaba fácilmente por algas de la especie *Monoraphidium sp.* que las excluían totalmente del cultivo. Para explorar los hábitos alimenticios de *A. fissa* se emplearon agua del grifo estéril fertilizada con cultivos de las especies anteriormente mencionadas así como levadura de panadería comercial *Saccharomyces cerevisiae*, extracto de tierra, (Pourriot, 1965) y el alga *Scenedesmus sp.* (cedida por el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal; CSIC).

En los ensayos de alimentación de los rotíferos con *Saccharomyces cerevisiae*, *Scenedesmus sp.*, y agua estéril fertilizada sola (como control de la posibilidad de alimento con algas o con bacterias asociadas al rotífero e introducidas con el inóculo) no se detectó

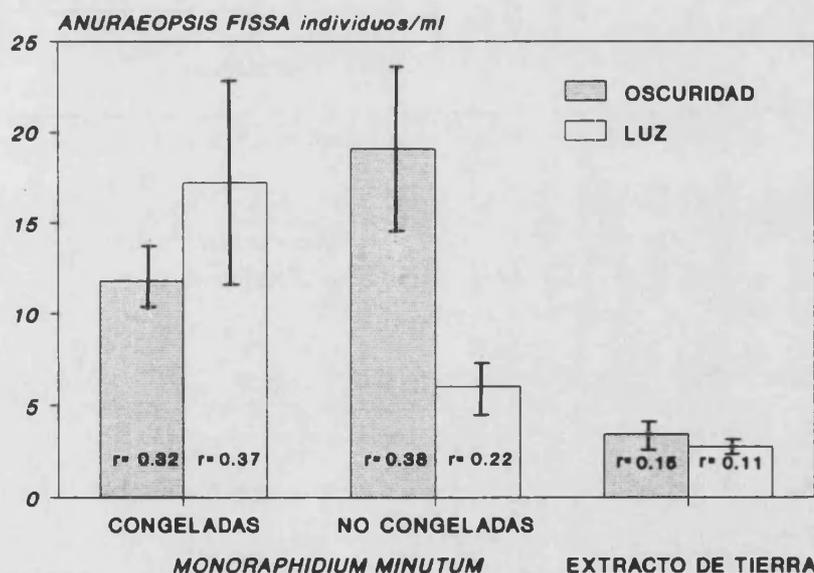


Figura 5.22. Densidad de *A. fissa* al cabo de 7 días de cultivo en las condiciones que se indican. Las líneas verticales corresponden al error típico de las medias de cada experiencia, calculado ponderando las medias de cada uno de los replicados por el inverso de su varianza.

crecimiento. Sin embargo, sí que se detectó crecimiento cuando se alimentó con extracto de tierra así como con *Monoraphidium minutum*, tanto congelada como viva, si bien las tasas de crecimiento obtenidas con extracto de tierra fueron muy bajas. En la figura 5.22 se muestran las densidades al cabo de 7 días de cultivo (medias de las tres repeticiones) en las diferentes dietas alimentarias y condiciones de luz y oscuridad. Además para el crecimiento de *A. fissa* con *M. minutum* se ha realizado un análisis de frecuencias Ji-cuadrado (Sokal y Rohlf, 1979) que se muestra en la tabla 5.4. Los resultados de dicho análisis muestran que las condiciones más favorables de cultivo se obtuvieron con células congeladas de *M. minutum* con luz y células vivas de *M. minutum* en oscuridad, obteniéndose tasas de crecimiento muy similares para ambos casos.

Tabla 5.4. Significación según un análisis Ji-cuadrado del efecto de dos factores del cultivo combinados entre sí sobre el crecimiento de *Anuraeopsis fissa* alimentado con el alga *Monoraphidium minutum*. (** significativo para $p > 0.99$).

	g.l.	X ²		Observaciones
<i>Factor</i>				
Congelación	1	34.14	**	Congelación ^a
Iluminación	1	130.52	**	Sin iluminación ^a
<i>Dependencia entre factores</i>				
Congelación e iluminación	1	821.20	**	Congeladas-luz ^b No congeladas-oscuridad ^b

a. Condición más favorable.

b. Combinaciones para las cuales el crecimiento de *Anuraeopsis fissa* es mayor que el esperado si hubiera independencia entre factores.

Adicionalmente, en el cultivo rutinario de *Anuraeopsis fissa* en nuestro laboratorio, se ha comprobado que la alimentación con *Monoraphidium minutum* sometido a un tratamiento de congelación de -20°C, puede mantener el cultivo de *Anuraeopsis* durante un gran número de generaciones, resultando dar poblaciones de rotíferos estables, aunque muestran importantes fluctuaciones en su densidad. Los cultivos rutinarios a base de extracto de tierra, no fueron capaces de mantener poblaciones estables (11-15 días frente a cultivos indefinidos alimentando con *M. minutum* congelada).

6. DISCUSION

En los perfiles correspondientes a los parámetros fisico-químicos (figuras 52A y B) determinados en la laguna de La Cruz durante el periodo de estudio, se observan diversos gradientes que muestran claramente los periodos durante los que la laguna se encuentra estratificada, así como la acusada y permanente variación en capas profundas de parámetros tales como conductividad, pH y potencial de óxido-reducción, que se dan fundamentalmente en capas anóxicas en las cuales no hemos detectado poblaciones de rotíferos. En las capas por encima de la extinción de oxígeno los gradientes más acusados los muestran parámetros tales como la temperatura y la concentración de oxígeno, por lo tanto, es presumible que tales parámetros presenten una cierta influencia sobre las distribuciones de los organismos, sobre todo en su distribución vertical. El pH muestra también una cierta variación en las capas por encima de la extinción de oxígeno acorde con la del oxígeno, pero mucho menor, esta variación es debida a la separación en el balance producción primaria/respiración en el perfil vertical.

Las especies de rotíferos encontradas son propias de los lagos de aguas duras y la composición específica de esta comunidad es similar a la de otros lagos kársticos de la Península Ibérica (Miracle y Vicente, 1983; Alfonso *et al.*, 1987; Ávila *et al.*, 1984). La distribución vertical de los rotíferos muestra claramente dos tipos de pautas (figuras 5.3 y 5.4), de forma que se puede establecer una distinción entre especies epi-metalimnéticas y especies que tienden a concentrar sus poblaciones en la zona del hipolimnion y la oxiclina. Las especies epi-metalimnéticas corresponden a aquellas especies situadas por encima o en la termoclina, y también aquellas especies que aunque se pueden encontrar en otras profundidades desarrollan grandes poblaciones en el epilimnion.

Es evidente que la distribución de las especies corresponde más a una segregación de los nichos ecológicos en el perfil vertical y en los estadios sucesionales que tienen lugar durante el ciclo anual que a unos rangos estrictos de cada uno de los parámetros limnológicos. Sin embargo, es interesante estudiar estos rangos en este lago para compararlo con los hallados en otros ecosistemas y ver la tendencia general de las especies a situarse en unas u otras condiciones.

Considerando a las especies epi-metalimnéticas podemos clasificar como tales a *H. mira*, *T. similis*, *S. pectinata*, *A. girodi*, *A. saltans* y *A. ecaudis*, quienes se encontraron en altos rangos de

oxígeno y temperatura, y en unos valores de pH superiores a 8.5, si bien, en relación con este factor se pueden distinguir dos tipos de comportamiento, de forma que hay especies que mostraron una escasa variabilidad en torno a 8.8 como *A.girodi* o *A. saltans* e incluso *H. mira*, y especies que mostraron mayores variabilidades (*T.similis*, *S. pectinata* y *A. ecaudis*). En este sentido, esta distribución más amplia, concuerda con las descripciones de estas especies que se han realizado en otros tipos de lagos, así, *S. pectinata* ha sido descrita como una especie que se localiza en amplios rangos de este parámetro, mostrando una preferencia por aguas alcalinas (Guisett, 1977; Berzins y Pejler, 1987), mientras que *T. similis* y *A. ecaudis* también han sido descritas en gran cantidad de ambientes e incluso han llegado a encontrarse en lagos escandinavos acidificados (Berzins y Pejler, 1987).

Respecto a la temperatura y al oxígeno, las especies epi-metalimnéticas se situaron en valores medios superiores a los 13 °C y 9.5 mg/l respectivamente. Sin embargo, dentro de este grupo podemos establecer pequeñas distinciones, de forma que respecto a la temperatura nos encontramos con especies que se localizaron en un amplio rango con una cierta tendencia hacia temperaturas más elevadas como *H. mira*, *T. similis*, *A. saltans* y *A.girodi* y especies que presentaron una cierta tendencia hacia temperaturas más bajas tales como *S. pectinata* y *A. ecaudis*. En general, aunque todas estas especies han sido relacionadas con altos rangos de temperatura (Green, 1967; Berzins y Pejler 1989b) y altos valores de oxígeno (Berzins y Pejler, 1989b; Mikschi, 1989), en algunos lagos tales como Lunzer Obersee (Ruttner-Kolisko, 1975; Miskischi, 1989) *S. pectinata* y *A. ecaudis* se encuentran a temperaturas y concentraciones elevadas, pero se describen como especies que muestran una gran tolerancia a amplios rangos de estos valores. Lógicamente estos parámetros guardan relación con el tipo de distribución comentada, ya que a capas más superficiales corresponden mayores temperaturas y mayores valores de oxígeno; sin embargo, en la distribución respecto a la temperatura es importante destacar el componente estacional, de forma que las especies estivales tales como *H. mira*, *T. similis*, *A. saltans* y *A. girodi* se encuentran en rangos de temperatura más elevados que las especies primaverales u otoñales tales como *A. ecaudis* y *S. pectinata*.

Considerando solo a las especies que muestran una tendencia a concentrarse en la zona de gradiente o interfase, es decir, a las que hemos denominado como hipolimnéticas, se pueden diferenciar dos tendencias: 1) especies más o menos dispersas con bajas densidades a lo largo de toda la columna de agua en invierno, presentando un importante crecimiento en primavera en la

incipiente termoclina, y que a medida que avanza el verano migran con la termoclina estabilizándose en un máximo metalimnético y a partir de allí se desplazan hacia abajo, produciendo concentraciones extremadamente densas cerca de interfase óxico-anóxica; y 2) especies que se presentan permanentemente en la oxiclina mostrando siempre una profundidad máxima y que conforme avanza el verano migran hacia arriba con la oxiclina. En la laguna de La Cruz las especies que muestran la primera tendencia de variación son *P. dolichoptera*, *K. quadrata* y *A. fissa*; mientras que las especies que muestran la segunda son *A. miraclei* y *F. hofmanni*, aunque esta última fue demasiado escasa durante el periodo de estudio para extraer conclusiones definitivas.

Estas especies hipolimnéticas muestran valores mucho más restringidos respecto a los parámetros físicos y químicos que las especies anteriores, y dentro de este grupo se observan pautas de mayor o menor dispersión, según se trate, o no, del grupo de especies oxiclinales. Los rangos de pH de las especies hipolimnéticas se sitúan alrededor de 8 y al igual que en el caso anterior, las medias de los periodos de estratificación marcan una distinción entre este grupo y el de las especies epi-metalimnéticas, situándose las especies hipolimnéticas en un rango de valores más bajo (8.2-8.3). Una pauta similar se encuentra respecto a la temperatura y el oxígeno situándose mayoritariamente las especies de este grupo en valores inferiores a los 10°C y los 5.5 mg/l respectivamente.

Las mismas tendencias fueron observadas por Hofmann (1987) en Plußsee, donde *F. hofmanni* y *K. hiemalis* fueron las especies que se situaron permanentemente en la oxiclina y *F. terminalis*, *P. dolichoptera*, *K. cochlearis* etc. las que migraban a mayor profundidad en verano. A partir de otros estudios de la distribución de rotíferos en lagos con interfases anóxicas se deducen modelos similares e.g. lago Blankvatn en Noruega (Larsson, 1971) lago Lunzer Obersee en Austria (Rutner-Kolisko, 1975, Mikschi, 1989) donde las especies de la oxiclina fueron también *K. hiemalis* y *F. hofmanni* (esta última especie debido a su descripción reciente en 1980 tiene otros nombres en los trabajos anteriores a este año).

En este trabajo encontramos a especies del género *Anuraeopsis* en una zona en la cual la descomposición predomina sobre la producción; se trata de una zona muy rica en materia orgánica y que en algunos casos se sitúa justo por encima de la interfase oxidativa-reductiva. En estas condiciones tolerar bajas concentraciones de oxígeno puede ser una ventaja para aquellas especies que son detritófagas o micrófagas y *Anuraeopsis fissa* ha sido clásicamente clasificada

como tal (Pourriot, 1965; 1977; Pejler 1983).

Además nuestros datos muestran que la nueva especie descubierta en estas lagunas de Cañada del Hoyo (Miracle y Vicente, 1983), y recientemente descrita (Koste, 1991), *Anuraeopsis miraclei*, está más altamente asociada a estas condiciones más extremas de ambiente microaeróbico que *Anuraeopsis fissa*, de forma que encontramos grandes concentraciones de esta nueva especie cuando muestreamos cerca de la oxiclina a intervalos muy pequeños de profundidad. *A. miraclei* posee una distribución altamente asociada con la oxiclina de la laguna de La Cruz en donde se desarrolla de forma permanente, de manera que tan solo unos pocos individuos se encuentran en otras zonas de la columna de agua a excepción de los periodos de mezcla. Al final del verano, cuando se produce una pronunciada estratificación térmica aparece una gran concentración de esta especie, con desarrollos masivos superiores a 28000 ind/l. Estas altas densidades en la zona microaróbica corresponden a una población activa reproductivamente. Los picos de la población se localizaban en una estrecha capa de 1 m al final de la oxiclina, a concentraciones de oxígeno próximas a 1 mg/l, con una dispersión muy pequeña en torno a la profundidad media o centro de gravedad del perfil vertical de la población (apéndices B y D; tabla D.6).

Anuraeopsis miraclei parece estar más estrechamente restringido a la oxiclina que *A. fissa* y especialmente durante la estratificación térmica donde las barreras de temperatura y densidad impiden la mezcla de las aguas. Así pues, en este tipo de lagos, estas especies se encuentran en una zona profunda donde las temperaturas suelen ser relativamente bajas (10°C; fig 5.12), coincidiendo además con las capas deficientes en oxígeno. Ello podría tener un marcado carácter adaptativo ya que los esternotermos fríos son menos sensibles a las bajas concentraciones de oxígeno (Hutchinson, 1967). Es decir, las bajas temperaturas pueden resultar ventajosas para tolerar valores más bajos de oxígeno ya que disminuyen considerablemente las tasas metabólicas de los rotíferos (Epp y Lewis, 1980). Esto hace perder ubicuidad a estas especies que toleran la microaerofilia, dando como resultado una distribución más restringida, pero, en cambio, pueden mantener densas poblaciones en una parcela del ecosistema rica en recursos, que es difícilmente habitable por otros organismos no específicamente adaptados.

A. miraclei presenta un máximo de densidad en la zona oxidativa-reductiva, al final del verano, periodo en el cual puede aprovechar la energía que ha sido acumulada durante la estación productiva en el gradiente de densidad de la interfase mixo-monimolimnion. De esta

forma, las especies de *Anuraeopsis* parecen adaptadas a aprovechar la energía en la zona de descomposición.

Todos los muestreos fueron realizados durante el día, mayoritariamente a primeras horas de la tarde, por lo tanto las distribuciones verticales corresponden a este periodo del día. Sin embargo, las migraciones verticales de las especies de la oxiclina afectan muy escasamente su distribución, como se comprobó en algunas ocasiones en las que se realizaron muestreos a diferentes horas del día y de la noche (datos no publicados de Miracle, Armengol y Vicente). En general, tanto las especies epi-metalimnéticas, como las hipolimnéticas no suelen mostrar migraciones acusadas fuera del margen de su distribución, de forma que las migraciones que se dan en las especies epi-metalimnéticas nunca llegan a alcanzar capas inferiores a la termoclina, ni de noche ni de día, ni las hipolimnéticas alcanzan capas superficiales, es decir, las migraciones se suelen concentrar en torno a sus respectivos máximos. *A. fissa* no suele mostrar migraciones pronunciadas, estando sus migraciones asociadas con la profundidad de la oxiclina (Stewart y George; 1987), es decir, su concentración máxima oscila durante el ciclo diario con las oscilaciones de la oxiclina, situándose siempre justo por encima de la extinción de oxígeno.

La agrupación de especies realizada según su distribución vertical fue confirmada mediante la realización de varios análisis de componentes principales, quedando patentes las pautas de distribución en las correlaciones que muestran las diversas especies de rotíferos respecto al primer factor de los análisis de componentes principales. En el primer análisis se consideraron conjuntamente las especies de rotíferos y los parámetros físico-químicos, en este análisis el primer factor se relacionó con los principales parámetros físico-químicos tales como oxígeno, temperatura, y pH y ordenó a las especies según su distribución vertical, mientras que el segundo factor separaba a los dos periodos de estratificación. Sin embargo, cuando sólo se consideraron a las especies de rotíferos las pautas de distribución fueron mucho más claras, es decir, quedaron más marcadamente delimitados los diferentes grupos de especies; separando el primer factor los dos grupos de especies considerados (fig. 5.17), y además el segundo factor de este análisis separó dentro del grupo de especies hipolimnéticas a *A. miraclei*, especie claramente oxiclinal.

Dentro de este contexto se ha valorado ampliamente la influencia de los parámetros físico-químicos en las distribuciones de los organismos, sin embargo, el papel del alimento no debe ser ignorado. En este sentido, al analizar las posibles implicaciones de las distribuciones algales sobre la distribución de rotíferos, nos encontramos con que se podrían establecer ciertos grupos

de asociación entre las diversas especies algales y las poblaciones de rotíferos, de forma que *A. miraclei* y *P. dolichoptera* podrían verse relacionadas con las especies algales de *Pedinomonas*, *Rhodomonas* y *Cryptomonas*, sin embargo, aunque *A. miraclei* se encuentra en las mismas capas que *Cryptomonas*, el tamaño y movimiento de estas algas no parece ser muy adecuado para la ingestión por dicho rotífero pero sí lo es para las especies de *Polyarthra* que muestran incrementos en esta zona. *A. fissa* podría verse relacionada con *Pedinomonas* y *Rhodomonas*, aunque también aparecen en las mismas capas que *A. fissa* grupos algales tales como *Chlamydomonas* y *Monoraphidium*, si bien, en bajas proporciones respecto a los demás grupos algales, sin embargo su posible utilización como alimento no debe ser descartada. Quizás los grupos algales más relacionados con las especies de *Anuraeopsis* sean los de *Rhodomonas* y *Pedinomonas*, siendo este último el que va seguido de grandes densidades de rotíferos. No obstante, el encontrar altas concentraciones algales en profundidades en las que se detectan altas concentraciones de rotíferos no quiere decir que necesariamente dichas especies algales sean el alimento de los rotíferos ya que sus distribuciones pueden coincidir por factores ambientales sin establecerse ninguna relación trófica. Además, deducir causalidades a partir de los datos anteriores es problemático ya que las poblaciones de rotíferos pueden a su vez contribuir fuertemente al descenso de las poblaciones algales. Es posible que, dado el pequeño tamaño de las algas mencionadas, constituyan un alimento adecuado para las especies de *Anuraeopsis*, sin embargo, estas especies, teniendo en cuenta el predominio de la descomposición en dichas capas, podrían también usar detritos en su alimentación, lo cual es una importante fuente de alimento para algunos rotíferos (Pourriot, 1965; Starkweather y Bogdan, 1980). De hecho, la alimentación a base de bacterias y detritos por parte de rotíferos que muestran preferencia por la oxiclina de los lagos meromícticos, también ha sido apuntada por Miracle y Alfonso (1993) para *F. terminalis* y *A. fissa* en un lago de características muy similares a laguna objeto de este estudio. Además, se ha descrito (Starkweather, 1980) que las bacterias juegan un importante papel como fuente de alimento para los rotíferos cuando éstos coexisten con cladóceros y copépodos, de forma que se produce una efectiva separación de nicho entre los principales grupos taxonómicos del zooplancton, permitiendo su coexistencia. Recientemente, se ha intentado caracterizar la función de los rotíferos dentro del flujo de materia de los ecosistemas, resaltado el papel de los rotíferos en la red trófica microbiana, de forma que los rotíferos pueden alimentarse a base de algas degradadas, bacterias y protozoos contribuyendo de esta forma al

circuito o bucle microbiano ("microbial loop") en los ecosistemas acuáticos (Arndt, 1993).

Por otra parte, el análisis experimental de la alimentación de *A. fissa* revela que existe una mayor respuesta para las combinaciones *Monoraphidium minutum* viva-oscuridad y *Monoraphidium minutum* congelada-luz. El efecto de tal interacción puede deberse a un efecto complejo relacionado con la actividad fotosintética y de crecimiento de las algas, siendo ésta limitada en oscuridad y originando posiblemente un cultivo algal muy poco activo y quizás un efecto parecido al que se consigue con la congelación. De alguna manera estos hechos apoyan el carácter detritívoro de *A. fissa* ya que parece ser que crece mejor si existe una considerable cantidad de algas muertas o sin movimiento. Los hábitos detritívoros de esta especie podrían explicar las bajas tasas de filtración encontradas por Wilms *et al.* (1991) alimentando con *Chlamydomonas* y por Massana y Pedrós-Alió (1992) alimentando con *Chromatium vinosum*. El bajo crecimiento alimentando con extracto de tierra puede deberse a que la población bacteriana a la que da origen quizás no sea la más adecuada para los rotíferos, ya que no es posible controlar con este medio de cultivo ni la calidad ni la cantidad del posible alimento. Los bajos resultados obtenidos alimentando con levaduras pueden explicarse por la carencia en las levaduras de sustancias requeridas para el crecimiento de los rotíferos (Scott, 1981; Hirayama 1987). En cuanto a la ausencia de crecimiento alimentando con *Scenedesmus* puede deberse a que dicha alga es un alga colonial que puede presentar un cenobio excesivamente grande para los rotíferos. Cuando se alimenta a *Amuraeopsis* con algas clorofíceas tales como *Chlamydomonas* y *Chlorella* (Wilms *et al.* 1991) o *Monoraphidium* en nuestro caso, pueden conseguirse cultivos con altas densidades poblacionales, sin embargo, los cultivos muestran grandes oscilaciones. Estas pautas no sólo han sido observadas en nuestros cultivos, sino también por otros investigadores que han trabajado con dicho género (Wilms *comunicación personal*). Esta respuesta podría sugerir que *Amuraeopsis* utiliza otras partículas alimenticias, quizás bacterias o bacterias asociadas a detritos. Sin embargo, es difícil establecer conclusiones a partir de estos resultados.

Nuestros resultados demuestran que *Amuraeopsis fissa* muestra una distribución más dispersa con una amplitud de nicho más amplia. Sin embargo, cuando coexiste con *A. miraclei* se reduce el nicho; de hecho, cuando coexiste con *A. miraclei* se encuentra casi siempre confinado a la sección mixolimnética de la columna de agua y tiene el máximo anual desplazado a junio bajo una incipiente termoclina, mientras que *A. miraclei* tiene el máximo en profundidad

a finales del verano. En cambio en el año 1988 cuando la estratificación no es tan pronunciada y la oxiclina coincide con la termoclina es *A. fissa* la especie que tiene el máximo a finales del verano en dicha interfase. Las especies congénicas de rotíferos generalmente se encuentran cuando existe una heterogeneidad ambiental. El género *Anuraeopsis* se ha diferenciado en especies que se sitúan en zonas de descomposición pero cuya segregación es solo aparente cuando se producen discontinuidades abruptas en las condiciones ambientales y la heterogeneidad es suficientemente extensa en el espacio y perdurable en el tiempo. Así en la laguna de La Cruz donde se dan estas condiciones pueden coexistir las dos especies de *Anuraeopsis*.

La dominancia de las especies depende de la situación de la oxiclina y la termoclina a lo largo del año, de esta forma, la diferencia que condiciona la distribución de los rotíferos entre los dos años de estudio es la diferencia en el perfil vertical entre la descomposición y la producción, mucho menor en 1988 que en 1987, que restringe el desarrollo al final del verano de 1988 de las verdaderas especies de la oxiclina e.g. *A. miraclei* y favorece a *A. fissa* la cual se expande desde el metalimnion ocupando la oxiclina. En otros lagos meromíticos donde la oxiclina siempre está asociada con la quimioclina la distribución de los patrones congénicos es más constante a lo largo de los años (Miracle, 1976, Alfonso *et al.*, 1987; Miracle y Alfonso, 1993, Hofmann, 1987).

En cualquier caso, el patrón de distribución de los rotíferos expuesto aquí parece ser bastante regular y similar al descrito en diferentes lagos estratificados con interfases anóxicas (e.g. Larsson, 1971; Ruttner-Kolisko, 1975; Hofmann, 1975, 1987; Miracle, 1976; Miracle y Vicente, 1983; Mikschi, 1989, Miracle *et al.*, 1991; Miracle y Alfonso, 1993; Boagert y Dumont, 1989).

**II. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA TOLERANCIA DEL ROTÍFERO
BRACHIONUS PLICATILIS A BAJAS CONCENTRACIONES DE
OXÍGENO**

1. PRESENTACIÓN

En la primera parte del presente trabajo se ha puesto de manifiesto que los rotíferos no sólo parecen soportar bajas concentraciones de oxígeno, sino que son capaces de resistir dichas condiciones durante un periodo de tiempo considerable. En la Laguna de la Cruz es sin duda el género *Anuraeopsis* el que muestra una distribución más relacionada con las bajas concentraciones de oxígeno. Sin embargo, en otros lagos otros géneros tales como *Filinia*, *Keratella*, *Polyarthra*, *Brachionus* etc. muestran una cierta tolerancia a las bajas concentraciones de oxígeno (Larsson, 1971; Ruttner-Kolisko, 1975, 1980; Serra, 1987; Mikschi, 1989). Las cuestiones de (1) qué efectos tienen los bajos niveles de oxígeno sobre la dinámica poblacional de rotíferos y (2) cuáles pueden ser los mecanismos fisiológicos que permiten la tolerancia a tales condiciones se han puesto como objetivo en esta segunda parte del trabajo. Dado que existen muy pocos trabajos de bioquímica o fisiología de los rotíferos y concretamente ninguno sobre las cuestiones planteadas anteriormente una primera aproximación a los mismos requiere el considerar previamente cómo se comportan a este respecto otros organismos. Es por ello que se ha dedicado un capítulo (Cap. 5) a realizar una revisión de los mecanismos principales de tolerancia a la anoxia en los metazoos. Dicha revisión justificará la aproximación bioquímica desarrollada en el capítulo siguiente y proporcionará un contexto, en términos de fisiología comparada, en el que situar los resultados obtenidos en este trabajo.

Las investigaciones experimentales se han llevado a cabo con rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis*, cuyas características más relevantes se ponen de manifiesto en el Capítulo 2 con el objeto de proporcionar los datos necesarios para conocer el organismo empleado. Dicha especie no se encuentra entre las estudiadas en el campo, en la primera parte de este trabajo, sin embargo, ha sido observada en condiciones de estrés anóxico (véase Swift y Hammer, 1979; Miracle y Vicente, 1983; Miracle *et al.* 1988; Hirayama, 1985) y reúne condiciones idóneas para su estudio en el laboratorio. Las especies de rotíferos descritas en la laguna de La Cruz que muestran tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno (p.e. *Anuraeopsis*) no pudieron ser estudiadas debido a su difícil cultivo ya que de hecho son especies de pequeño tamaño, y de biología mal conocida.

Cuando se trata de realizar un estudio experimental de los rotíferos en condiciones limitantes de oxígeno, los métodos comúnmente empleados de cultivo, manipulación,

alimentación y toma de muestras en el laboratorio no son válidos. Dada la ausencia en la literatura especializada de protocolos adecuados, se debió llevar a cabo un trabajo preliminar, de orden metodológico, el cual se orientó a la determinación de un tipo de alimento inerte, es decir que no aumentara la concentración de oxígeno, y que a la vez fuera bastante similar al normalmente utilizado y cuya calidad alimenticia permitiese mantener los cultivos de rotíferos durante prolongados periodos de tiempo. Este estudio se describe en el Capítulo 3. Algunos de los resultados de este estudio preliminar tienen interés aunque no sean específicamente del tema planteado, por lo que en la discusión de dicho capítulo se tratan también temas colaterales de alimentación de rotíferos.

Por último los Capítulos 4 y 6 abordan el tema central de esta segunda parte del trabajo. El Capítulo 4 lo hace desde el punto de vista de la dinámica poblacional estudiando cómo se ve afectado el crecimiento poblacional y la persistencia de las poblaciones por las limitaciones del nivel de oxígeno. El Capítulo 6, por otro lado, se ocupa de esclarecer los mecanismos metabólicos que operan durante las condiciones de hipoxia, en virtud de los cuales los individuos se adaptan a dichas condiciones.

2. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE Y ORIGEN, DESCRIPCIÓN, SELECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA EXPERIMENTAL

2.1 Descripción de la especie

Brachionus plicatilis Müller 1786 (figura 2.1) es un miembro de la familia Brachionidae (Orden Ploima, Clase Monogononta, Phylum Rotifera) cuya hembra presenta la forma de un ovoide dorsoventralmente aplanado. En la cabeza o extremo anterior, presenta una corona ciliada, mientras que en el extremo opuesto existe una prolongación alargada denominada pie. Tanto la cabeza como el pie pueden retraerse en el interior del tronco, el cual está recubierto por la loriga, o caparazón cuticular que, constituida por dos placas soldadas (ventral y dorsal), forma el exoesqueleto del cuerpo. El género *Brachionus* se encuentra definido por similitudes en las estructuras de la loriga y el pie, y la especie *Brachionus plicatilis* queda definida por poseer seis espinas de aspecto y longitud variable en el reborde anterior de la placa dorsal y cuatro lóbulos en el reborde anterior de la placa ventral.

Sin embargo, dicha especie se encuentra sometida a grandes variaciones en la talla y forma, lo cual es esperable en un organismo euroico y ampliamente distribuido. Estas características y la poca diferenciación de las especies de rotíferos hace que algunos autores consideren grupos o razas en las claves de clasificación. Así a *Brachionus plicatilis* lo incluyen junto con otros *Brachionus* (*B. urceolaris* Müller 1773, *B. Varga* 1951, *B. rubens* Ehremsberg 1838, en el círculo de formas ("Formenkreiss") *urceolaris* (Ruttner-Kolisko 1974), o como "Formenkreiss" *urceolaris*: grupo de especies *plicatilis* (Koste 1980a), si bien ambos autores coinciden en señalar que la morfología de *B. plicatilis* está claramente diferenciada de las restantes especies. Además, a partir de estudios recientes, dentro de *Brachionus plicatilis* se distinguen las formas de tipos S y L que son probablemente especies diferentes ya que tienen cariotipos diferentes (Rumengan *et al.* 1991).

En *Brachionus plicatilis* existe un gran dimorfismo sexual. El macho presenta un tamaño muy inferior al de la hembra y su organización se encuentra muy simplificada. Posee un aparato digestivo atrofiado y su función es principalmente reproductiva. La reproducción en *B. plicatilis* presenta las características generales propias de los rotíferos monogonotes, de forma que es una

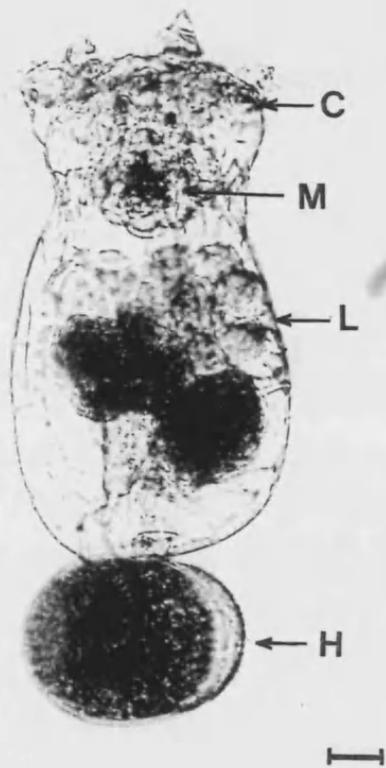


Figura 2.1. Microfotografía de la hembra del rotífero *Brachionus plicatilis* tipo L , cepa CU. Las flechas indican algunas de las estructuras fácilmente reconocibles: L (loriga), M (mástax), C (corona ciliada) H (huevo). La barra horizontal corresponde a 29 μm . (Microfotografía cedida por Serra).

reproducción heterogónica generalmente partenogénica y con periodos sexuales de frecuencia variable. En dichos rotíferos se han descrito varios tipos de hembras en función de sus características reproductivas. Las hembras amícticas producen huevos amícticos (diploides), que se desarrollan partenogénicamente, dando nuevas hembras amícticas durante varias generaciones hasta que se les induce la producción de una descendencia de hembras mícticas, que producen huevos haploides. Si dichos huevos no son fertilizados se desarrollarán dando lugar a machos haploides. Si, por el contrario, son fertilizados, originarán huevos de resistencia, también llamados huevos durables. Estos huevos son los únicos huevos de origen sexual; son morfológicamente distintos de los huevos partenogénicos y pueden soportar condiciones adversas durante periodos prolongados de tiempo y eclosionar en condiciones favorables, originando siempre hembras amícticas.

El rotífero *B. plicatilis* es un organismo planctónico que habita preferentemente en ambientes atalasoalinos de elevada alcalinidad (Margalef, 1955; Pejler, 1974; Walker 1981) siendo frecuente en lagunas endorreicas en España (Margalef, 1955; Miracle, 1982), aunque

también lo es en lagunas litorales salobres (Berzins, 1960; en España Miracle *et al.*, 1987). Su distribución es cosmopolita y se ha encontrado en todas las regiones biogeográficas (Dumont, 1983). El rotífero *Brachionus plicatilis* ha sido observado en amplios rangos de los principales parámetros físico-químicos, caracterizándose como eurihalino y euritérico. Puede vivir en un rango de salinidad que va, como mínimo, desde 1 g/l hasta 97 g/l (Walker 1981) y soporta cambios bruscos de los valores de este parámetro (Epp y Winston, 1977). Las temperaturas a las que ha sido observado varían desde 5°C (Walker, 1973) hasta 30°C (Yúfera, 1982). Por otro lado, su tolerancia a las altas salinidades indica que posee cierta tolerancia a las bajas concentraciones de oxígeno (Walker, 1981). Además es la especie más estudiada ya que ha sido un alimento usado extensivamente para su aplicación en acuicultura debido a una serie de características tales como sus altas tasas reproductivas (Hirayama *et al.*, 1973), junto con otras propiedades de tamaño (130-320 µm), composición química, valor calórico y la posibilidad de manipulación artificial de sus cualidades nutricionales.

2.2 Origen y selección de la cepa experimental

La cepa de *Brachionus plicatilis* con la que se ha llevado a cabo este estudio fue aislada en la laguna de La Celadilla. Dicha laguna forma parte de un conjunto de varias lagunas esteparias, cerca de Belmonte (Cuenca, UTM 30 SWJ 208671). Se trata de una laguna endorreica que recibe agua de las formaciones cretácicas que la rodean. Su forma es alargada y muy poco profunda (0.5 m), formando en un extremo una cubeta más honda (1.5 m). Las muestras fueron recolectadas en el año 1981 mediante una red de Nylal de 50 µm de poro. El aislamiento de los individuos para la formación de cepas fue realizado por Serra (1987) mediante sucesivas capturas con pipeta tipo Pasteur bajo un estereomicroscopio, lavándolos en agua de mar diluida de una salinidad de 12 g/l. Posteriormente se aisló cada individuo en un pocillo pasándose luego los individuos de cada pocillo a un tubo, cuando se tenía un número alto de individuos en ellos.

El establecimiento y cultivo de las cepas se llevó a cabo en un medio de agua de mar diluida de 12 g/l de salinidad, utilizando como alimento el alga *Tetraselmis sp.* en cámaras constantemente iluminadas a 25°C.

La elección de esta cepa entre todas las que se han aislado en nuestro laboratorio obedece a criterios de tipo ecológico, ya que la laguna es bastante somera y sometida a un clima continental con unas condiciones de conductividad muy elevadas (36000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) que sugieren que la cepa está sometida a unos cambios fluctuantes de los parámetros físico-químicos más importantes como son temperatura, salinidad y oxígeno. El aislamiento de dicha cepa se llevó a cabo en verano, siendo los valores de conductividad y temperatura de la laguna de 36000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 17°C. Además, dicha cepa ha sido caracterizada morfológica, isoenzimática y demográficamente por Serra (1987), presentando unas dimensiones medias a 25°C y 12 g/l de salinidad de 234 μm y 161 μm de longitud y anchura de la loriga respectivamente, así como una longitud y separación media de las espinas dorsales de 23.1 y 21.8 μm respectivamente. Esta cepa es ligeramente de mayor tamaño que las restantes cepas estudiadas por Serra (1987) y pertenecería al tipo L de *Brachionus plicatilis* mencionado anteriormente. En dicho estudio, se demuestra además que la cepa CU presenta una variación morfológica más amplia y más compleja que las otras cepas estudiadas, poniendo de manifiesto una gran plasticidad fenotípica, lo cual tiene un claro sentido adaptativo a dichos ambientes fluctuantes. Además, la cepa CU presenta una menor influencia de la variación de la temperatura y salinidad sobre sus parámetros demográficos, lo cual apunta a una mayor capacidad de regulación respecto al ambiente externo.

2.3 Mantenimiento de la cepa experimental

La cepa se mantenía con alimento vivo, concretamente con el alga prasinoficea *Tetraselmis* sp. (cedida por el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC, Castellón)). Se trata de un alga flagelada, cuasi elipsoidal de unos 13 μm de longitud, con respecto a su tamaño, resulta ser adecuada para *Brachionus plicatilis* ya que según Hino e Hirano (1980) este rotífero puede ingerir partículas que van de 2 a 28 μm con preferencia. Asimismo, estos autores desarrollaron unas expresiones matemáticas que relacionan la longitud de la loriga de la especie de *Brachionus plicatilis* con los diámetros máximos y mínimos de las partículas ingeridas; de la aplicación de las ecuaciones establecidas por Hino e Hirano (1980; 1984) para el tamaño medio de nuestra cepa se deduce que el diámetro de partículas ingerido por CU se encuentra entre los 4 y los 21 μm . El medio de cultivo empleado para el crecimiento del alga consistió en agua de mar diluida y

fertilizada con la solución f/2 de Guillard y Ryther (1962) según se presenta en la tabla 2.1. Variantes de este método han sido utilizadas por otros autores que trabajan con *Brachionus plicatilis* (Lubzens, 1981; Minkoff *et al.*, 1983).

El agua de mar se recogía en el puerto de Valencia (grifos situados en la lonja de pescado) y se almacenaba en una cámara fría a 4°C. Antes de usarla se filtraba por gravedad con papel de filtro y se mezclaba con agua destilada para obtener, de forma aproximada, la salinidad deseada (12 g/l). El agua de mar diluida se sometía a una esterilización en recipientes de 1 a 3 l, mediante

Tabla 2.1. Concentración en el medio de cultivo para algas de los productos fertilizantes (Guillard y Ryther, 1962).

Nutriente	Concentración, mg/l
NaNO ₃ (a)	75
NH ₄ Cl(a)	25
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O(a)	5.72
Oligoelementos(b)	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0220
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0098
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0100
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0060
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1800
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15
Na ₂ EDTA	4.36
Vitaminas(c)	
Tiamina·HCl	0.0001
Biotina	0.0005
B ₁₂	0.0005

a. La solución se esteriliza mediante autoclave (120°C, 20 min).

b. La solución conteniendo todos los oligoelementos se esteriliza mediante autoclave (120°C, 20 min).

c. La solución conteniendo a todas las vitaminas se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.45 µm.

autoclavado a 120°C durante 20 min. Una vez estéril y atemperada, el agua era fertilizada con las soluciones que se indican en la tabla 2.1, que a su vez habían sido esterilizadas por calor húmedo o filtración.

Aguas de 0 g/l de salinidad (agua destilada) y de aproximadamente 36 g/l (agua de mar sin diluir) también fueron sometidas al mismo proceso anterior, para ser utilizadas posteriormente con el fin de corregir la salinidad de los medios de cultivo.

Una vez fertilizada, se corregía la salinidad del agua destinada a los cultivos de algas mediante las soluciones anteriormente indicadas (0 g/l y 36 g/l, aprox.) con un salinómetro modelo Instran-10. Los medios resultantes eran utilizados para el cultivo de *Tetraselmis sp.* y para algunas operaciones de manipulación de rotíferos y algas (lavado, aislamiento, dilución etc.).

Los cultivos algales pueden contaminarse de forma fortuita con ciliados u hongos, inutilizándose para el cultivo de los rotíferos. En estos casos, si todos los cultivos llegaban a contaminarse, se procedía al aislamiento del alga por micropipeteo bajo un estereomicroscopio o por siembra en placa de agar, aunque este último método suele ser lento y las algas pueden tardar en recuperar su movilidad cuando se desea resuspenderlas en un medio líquido.

Los rotíferos fueron mantenidos en tubos de 10 ml (al menos tres tubos) a una salinidad de 12 g/l, a 25°C e iluminación constante (PAR: aprox. 35 μ E/m²s). Estos cultivos eran alimentados sustituyendo parte del medio por medio fresco rico en algas, repitiéndose esta operación semanalmente. Durante la alimentación se observaba el cultivo mediante un estereomicroscopio para vigilar su estado, y cuando era necesario se cambiaba el recipiente del cultivo.

3. DESARROLLO METODOLÓGICO: ESTUDIO DE LA ALIMENTACIÓN DE *BRACHIONUS PLICATILIS* CON ALIMENTO NO PRODUCTOR DE OXÍGENO

3.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha apuntado anteriormente, uno de los objetivos de este trabajo es el estudio del comportamiento de los rotíferos en condiciones deficientes de oxígeno. Tal estudio comporta un desarrollo metodológico para la obtención y control de dichas condiciones. Así pues, en este apartado nos ocuparemos del estudio de la alimentación, ya que la exigencia de un ambiente de cultivo deficiente en oxígeno impide el empleo de algas vivas como alimento habitual de los rotíferos estudiados. Por ello, se ensayaron otros tipos de alimentación alternativos que no conlleven la producción de oxígeno.

La utilización de materiales alternativos a las algas vivas en la alimentación de rotíferos en diversos laboratorios generalmente no responde a problemas de diseño experimental, al contrario de lo que ocurre en el caso que nos ocupa, sino que más bien responde a la búsqueda de materiales de alimentación más económicos y más cómodos que los empleados habitualmente, en el contexto del cultivo de rotíferos con fines aplicados. Del espectro de dietas ensayadas por diversos investigadores, se presentan en la tabla 3.1 aquellas que emplean materiales que no implican una producción de oxígeno, si bien se han respetado el conjunto de las experiencias realizadas por los diversos autores citados en la tabla aunque en ellas se incluyan algas productoras de oxígeno, puesto que facilitan los datos necesarios para la comparación entre dietas. Estas dietas incluyen levaduras, bacterias, algas inertes, materiales microencapsulados (consistentes en una mezcla de extracto de almeja y huevo o en una mezcla de caseína, almidón, aceite de hígado de bacalao y huevo entre otros ingredientes) y a veces combinaciones de varias. Se ha utilizado también otro tipo de alimento no vivo ensayado por Scott (1983) que consistía en una mezcla cruda de albúmina y yema de huevo junto con una mezcla de extracto de algas autoclavadas. Sin embargo éste no ha sido incluido en la tabla ya que dicho alimento no fue capaz de mantener el crecimiento de los rotíferos por más de cuatro generaciones.

Los rendimientos de dietas basadas en pulverizados de algas desecadas son muy variables; por ejemplo, el alga *Chlorella* desecada ha demostrado ser menos efectiva que las algas vivas

Tabla 3.1. Tasa de crecimiento (r), reproducción (R_0), producción diaria (Rot/ml), densidades máximas (Rot/ml) y densidades al final de las experiencias (Rot/ml) del rotífero *Brachionus plicatilis*, alimentado con distintos organismos, a diferentes salinidades (g/l), temperaturas ($^{\circ}$ C) y volúmenes del cultivo (l), según diversos autores.

REFERENCIA	ORGANISMO	CONCENTRACION	SALINIDAD T ^a	T ^a	VOLUMEN	r	R_0	PRODUC- CION DIA (Rot/ml)	DENSIDAD MAXIMA (Rot/ml)	DENSIDAD FINAL (Rot/ml)
			(g/l)	($^{\circ}$ C)	(l)					
Furukawa y Hidaka (1973)	Levaduras marinas	8.5×10^4 cel/rot.	-	15	1×10^3	-	-	16.3	1000	-
Hirayama y Watanabe (1973)	Levadura panadería	50 μ g/ml	12.8	22	$2-4 \times 10^{-3}$	0.36	5.5	-	-	-
	Levadura marina (est.)	44 μ g/ml	12.8	22	$2-4 \times 10^{-3}$	0.12	2.1	-	-	-
	Levadura marina (des.)	44 μ g/ml	12.8	22	$2-4 \times 10^{-3}$	0.25	2.2	-	-	-
	Lev. marin. + <i>Chlorella</i>	50 μ g/ml + 0.21×10^6 cel/ml	12.8	22	$2-4 \times 10^{-3}$	0.64	11.6	-	-	-
	<i>Chlorella sp</i>	0.21×10^6 cel/ml	12.8	22	$2-4 \times 10^{-3}$	0.41	7.7	-	-	-
Person-le Ruyet (1975)	<i>Tetraselmis suecica</i>	0.4×10^6 cel/ml	-	26	100	-	-	55.0	340	-
	<i>T. suecica</i> (liofilizada)	0.15 mg	-	26	20	-	-	-	119	-
	<i>Spirulina maxima</i> (polvo)	0.15 mg	-	26	20	-	-	-	51	-
	<i>Scenedesmus sp</i> (des.)	0.5-0.25 mg	-	26	20	-	-	-	0	-
Hirayama y Nakamura (1976)	<i>Chlorella sp.</i> (pulverizada)	50 μ g/ml	22.1	20-26	12	0.57	13.3	28.5	434	-
	<i>Chlorella sp</i> +	25 μ g/l								
	<i>Rhodotorula sp</i>	25 μ g/ml	22.1	20-26	12	0.62	13.4	-	-	-
	<i>Rhodotorula sp</i>	50 μ g/ml	22.1	20-26	12	0.36	5.5	-	-	-
	<i>Chlorella sp</i>	1.5×10^6 cel/ml	22.1	20-26	12	0.71	20.1	-	-	-
Kawano et al. (1978)	Levadura panadería	340 g/día	-	30	730	0.36	-	59.6	1100	950
	<i>Chlorella</i> + Lev. marinas	($0.1 \text{ l/m}^3 + 1 \text{ l/ton}$)	-	25-28	$1-2 \times 10^4$	-	-	71.4	90	-

(est.) esterilizada. (des) desecada

Tabla 3.1 continuación

REFERENCIA	ORGANISMO	CONCENTRACION	SALINIDAD T ^a	T ^a	VOLUMEN	r	R ₀	PRODUC- CION DIA	DENSIDAD MAXIMA	DENSIDAD FINAL
		(g/l)	(g/l)	(°C)	(l)			(Rot/ml)	(Rot/ml)	(Rot/ml)
Hirata (1979)	<i>Chlorella sp</i>	20 x 10 ⁶ cel/ml	mar	500	-	0.29	-	57.0	100	100
	<i>Chlorella</i> + Levaduras	-	mar	500	-	0.33	-	-	84	79
	Levaduras	-	mar	500	-	0.29	-	-	80	10
Fontaine y Revera (1980)	Levaduras	0.4g/l	-	28-30	500	-	-	34.0	583	-
Hirata (1980)	<i>Chlorella</i> + Levaduras	-	mar	-	500	0.29	-	80.0	95	88
	<i>Chlorella</i>	20 x 10 ⁶ cel/ml	mar	-	500	0.25	-	-	104	101
	Levaduras	-	mar	-	500	0.23	-	-	76	25
Yasuda y Taga (1980)	<i>Pseudomonas</i> (P7)	10 ⁸ cel/ml	-	28	500	-	-	-	150	50
Yúfera y Pascual (1980)	<i>Nannochloris sp</i>	20x10 ⁶ cel/ml	40	24	70	0.23	-	10.0	75	-
	<i>Tetraselmis sp</i>	0.5x10 ⁶ cel/ml	40	24	70	0.45	-	60.0	260	-
	<i>Saccharomices cerevisiae</i>	0.14-0.5 g/l	40	24	70	0.20	-	29.0	325	-
	<i>Nannochloris sp</i> +	6x10 ⁶ cel/ml +								
	<i>Saccharomices cerevisiae</i>	0.14-0.5 g/l	40	24	70	0.29	-	63.7	540	-
	<i>Nannochloris sp</i> +	6x10 ⁶ cel/ml +								
Gatesoupe y Luquet (1981)	<i>Tetraselmis suecica</i>	-	33	22-23	60	-	-	120.0	790	740
	(congelada y desecada)	-	18	22-23	20	0.38	-	25.0	570	5
Teshima <i>et al.</i> (1981)	Dietas microencapsuladas	-	36	23	0.8	0.22	-	-	72	6
	<i>Chlorella</i> + Lev. panadería	8.0 x 10 ⁶ + 330 mg	36	23	0.8	0.21	-	-	58	54
	Levadura	330 mg/10 ⁶ rot.	36	23	0.8	0.18	-	-	74	24
	<i>Chlorella</i>	8.0 x 10 ⁶ cel/10 ⁶ rot	36	23	0.8	0.21	-	-	87	87

Tabla 3.1 continuación

REFERENCIA	ORGANISMO	CONCENTRACION	SALINIDAD T ^a (g/l)	T ^a (°C)	VOLUMEN r (l)	R ₀	PRODUC- CION DIA (Ro/ml)	DENSIDAD MAXIMA (Ro/ml)	DENSIDAD FINAL (Ro/ml)	
Regera <i>et al.</i> (1982)	Levadura panaderia	1g/10 ⁶ rot.	36	20	80	0.15	-	51.7	786	711
James <i>et al.</i> (1983)	Levadura panaderia + <i>Chlorella</i>	158.3 gm ³ d ⁻¹ + 46.2 gm ³ d ⁻¹	32	25-37	1 x 10 ⁴	0.48	-	25.4	-	255
	<i>Chlorella</i> + Levadura panaderia +	36.6 gm ³ d ⁻¹ + 275.0 gm ³ d ⁻¹	32	25-27	2 x 10 ⁴	0.25	-	19.7	-	362
	Levaduras marinas + Levaduras marinas +	583.0 gm ³ d ⁻¹ + 300.0 gm ³ d ⁻¹	32	25-27	1 x 10 ⁴	0.21	-	-	-	330
	Levadura panaderia	150.0 g m ³ d ⁻¹	32	25-27	1 x 10 ⁴	0.21	-	-	-	330
Sakamoto y Hirayama (1983)	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	3.5 x 10 ⁶ cel/ml	-	-	-	0.62	5.0	-	-	-
	<i>Thiocapsa</i> + Levadura	5.3x10 ⁶ cel/ml + 13 µg/ml	-	-	-	0.69	10.3	-	-	-
	<i>Thiocapsa</i> + <i>Chlorella</i>	7x10 ⁶ cel/ml + 5x10 ⁴ cel/ml	-	-	-	0.94	18.1	-	-	-
	<i>Chlorella</i> Levadura	5x10 ⁴ cel/ml 5 µg/ml	-	-	-	0.41	6.5	-	-	-
			-	-	-	0.002	0.6	-	-	-
Ortega <i>et al.</i> (1983)	Levadura panaderia	1-2g/10 ⁶ rot.	36	-	6 x 10 ³	-	-	77	230	-
James <i>et al.</i> (1987)	Levaduras marinas + aceite de pescado	-	30	25-27	1.5 x 10 ⁴	-	-	65.3	454	-
	Levadura panaderia	-	30	25-27	1.5 x 10 ⁴	-	-	27.4	277	-

pero mejor que las levaduras de panificación (Hirayama y Nakamura, 1976). Igualmente, el uso de *Spirulina* o *Tetraselmis* congeladas y desecadas daban bajas densidades de cultivos de rotíferos (Person-Le Ruyet, 1975). Sin embargo, Gatesoupe y Robin (1981) demostraron que el éxito de los cultivos con *Spirulina*, *Chlorella* y levaduras provenientes de productos comerciales, dependía de la salinidad y de la cantidad de alimento suministrado al cultivo. En la mayoría de los casos mencionados anteriormente los rendimientos son bajos y en algunos de ellos las poblaciones obtenidas son inestables, no pudiéndose mantener su crecimiento después de varias generaciones. Este hecho podría ser explicado por una deficiencia en micronutrientes. En *Brachionus plicatilis*, los micronutrientes limitantes más conocidos son la vitamina B₁₂ (Boraas, 1983; Hirayama y Funamoto, 1983; Scott, 1981; 1983; Hirayama *et al.*, 1989) y la cistina (Lubzens, 1987). Probablemente, tratamientos bruscos como la desecación afectan a las calidades nutritivas de los alimentos por destrucción de los micronutrientes anteriormente mencionados. En cuanto a los cultivos con dietas microencapsuladas, se comprobó que no eran capaces de matener los cultivos de rotíferos durante periodos prolongados de tiempo, aunque este método era válido para cultivos destinados a acuicultura ya que permitía el enriquecimiento de los cultivos con los micronutrientes requeridos por las larvas de peces, puesto que éstos se pueden incluir también dentro de las microcápsulas.

Otras fuentes de alimento cuya utilización no implica aumento de las concentraciones de oxígeno del medio son las levaduras y las bacterias. El empleo de levaduras para la alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* fue establecido por Hirata y Mori (1967), quienes encontraron que los rotíferos podían crecer con levadura de panadería comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), la cual es un alimento barato y disponible en grandes cantidades. Sin embargo, los rotíferos cultivados exclusivamente con levaduras de panadería presentan bajas tasas reproductivas y no pueden mantenerse por largos periodos de tiempo (Hirata, 1979; 1980; Yúfera y Pascual, 1980; Hirayama, 1987) debido a que las levaduras poseen muy bajas cantidades de vitamina B₁₂ (Hirayama y Funamoto, 1983; Hirayama, 1985; Scott, 1981) y cistina (Hirayama y Funamoto, 1983). Algunos autores (Yúfera y Pascual, 1980; Minkoff *et al.*, 1983) solucionaron el problema suministrando dietas mixtas de algas y levaduras. Sin embargo, esta solución no sirve para los propósitos del presente trabajo, ya que supondría la adición de algas vivas a un cultivo en el que se desea controlar las concentraciones de oxígeno. Con respecto al empleo de levaduras como alimento único, también se han utilizado algunas especies de levaduras marinas, las cuales

han resultado ser un alimento adecuado para los rotíferos (Furukawa e Hidaka, 1973; Hirayama y Watanabe, 1973; James *et al.*, 1983, 1987). Sin embargo, el uso de levaduras marinas está bastante limitado ya que requiere técnicas especiales de cultivo, lo que lo hace relativamente caro.

Con respecto al cultivo con bacterias, Yasuda y Taga (1980) encontraron que al menos dos cepas de bacterias marinas (*Pseudomonas* P1 y P7) permitían el crecimiento de los rotíferos. No obstante este alimento plantea también problemas ya que la validez de uso a largo plazo como alimentación de los cultivos de rotíferos no está determinado, y por otra parte también requiere técnicas especiales de cultivo.

Dados los problemas de los protocolos de cultivo ya desarrollados con alimentos no productores de oxígeno, se estimó conveniente realizar un estudio antes de decidir el método de cultivo, este estudio consistió en una serie de pruebas de comparación del crecimiento con varios alimentos, principalmente basadas en la inactivación de las algas utilizadas en los cultivos de mantenimiento. Dicho estudio evalúa el crecimiento de los rotíferos en diversas condiciones de alimentación e iluminación y se presenta en un capítulo independiente porque de él se pueden obtener conclusiones interesantes sobre la biología del rotífero, además de la obtención de una metodología adecuada para el desarrollo experimental de los trabajos expuestos en los siguientes capítulos.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Experiencias preliminares

Para encontrar un tratamiento de inactivación de las algas se realizaron varios tipos de ensayos previos. El primero de ellos consistió en un tratamiento de esterilización mediante autoclave (120°C, 20 min.). Las algas resultantes de tal tratamiento formaban un medio pardo con un aspecto que sugería una intensa destrucción de constituyentes esenciales. Posteriormente se utilizó un tratamiento más suave, tipo pasteurización, sometiendo a las algas a un calentamiento en un baño termostático a 63°C durante 30 minutos. Sin embargo, dicho tratamiento resultó poco eficaz ya que se comprobó, por observación directa al microscopio, que

una porción de las algas tratadas conservaban la movilidad. La siguiente condición térmica que se ensayó fue un poco más severa y consistió en un tratamiento de 65-70°C durante 90 min., comprobándose su eficacia mediante observación directa y mediante medidas de intercambio de gases con un microrespirómetro de Warburg. Se pudo apreciar que la muestra sometida al tratamiento térmico no presentaba intercambio gaseoso después de 6 horas de seguimiento, al contrario de lo que ocurría con una muestra control, con lo cual se concluyó que el tratamiento de 65-70°C durante 90 min. era adecuado para inactivar a las algas.

La utilización de material inerte puede ser ineficaz debida a la pérdida de accesibilidad del alimento por parte de los rotíferos. Por otro lado, si se intenta resuspender las algas mediante agitación es posible introducir una distorsión adicional. Para evaluar cuál de los dos efectos alteraba en menor grado el cultivo se diseñó una experiencia previa para la cual se prepararon 8 tubos con 20 hembras del rotífero *Brachionus plicatilis*, inoculadas en 20 ml de medio de cultivo con algas tratadas térmicamente. Cuatro de ellos se depositaron sobre un agitador de vaivén cuya acción no era eficaz si no se introducían perlas de vidrio en los tubos. Los cuatro restantes se mantuvieron sin agitación. Todos ellos se cultivaron una semana a 25°C y bajo condiciones de iluminación constante. Cuando se procedió al recuento de los individuos se observó que en los cultivos de rotíferos sometidos a agitación la población no había prosperado. Por el contrario, en los cultivos no sometidos a agitación se observaba crecimiento.

A partir de estas experiencias previas, indispensables para la realización del siguiente estudio, se determinó que el tratamiento térmico adecuado consistía en un tratamiento de 65-70°C durante 90 min. y que los rotíferos crecían mejor sin agitación.

Experiencias para evaluar el crecimiento de los rotíferos según el tipo de alimento

El conjunto de ensayos llevados a cabo sigue un diseño experimental que combina todas las posibilidades de tres factores: (1) Tipo de alimentación, con dos variantes, el alga prasinoficea *Tetraselmis sp.* y la levadura de panadería comercial *Saccharomices cerevisiae*; (2) Tratamiento del alimento previo a su administración, con dos modalidades, alimento no tratado y alimento tratado térmicamente; y (3) Condiciones de iluminación, con dos variantes, cultivo permanentemente iluminado y cultivo en oscuridad permanente. En los cultivos iluminados la

irradiación PAR fue aproximadamente de 35 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Las condiciones de oscuridad se obtuvieron envolviendo los recipientes con papel de aluminio. Para cada una de las condiciones ensayadas se dispuso de dos réplicas de cultivo y toda la experiencia se llevó a cabo dos veces.

Los cultivos experimentales se iniciaron con 25 hembras del rotífero *Brachionus plicatilis* por replicado, aisladas individualmente mediante una pipeta Pasteur bajo observación directa con un esteromicroscopio. Dichas hembras fueron aisladas a partir de los cultivos de mantenimiento y en su aislamiento se transvasaron sucesivamente por 5 pocillos conteniendo cada uno 1 ml de agua de mar estéril diluida (12 g/l de salinidad) al objeto de proceder al lavado de las posibles algas vivas arrastradas en los aislamientos. Las hembras se depositaron en tubos con 15 ml de medio de cultivo con el alimento correspondiente, durante cuatro días, al cabo de los cuales se contó el número de hembras. Los cultivos fueron alimentados en el momento de su inoculación, el medio no se renovó durante la experiencia, y se mantuvieron sin agitación. Cuando se procedía al recuento, el cultivo estaba en su fase de crecimiento exponencial. Todos los cultivos, tanto los realizados con algas como con levaduras, se llevaron a cabo a 25°C de temperatura, en agua de mar estéril y diluida con agua destilada hasta una salinidad de 12 g/l.

El medio con alimento se preparó como a continuación se detalla. Los cultivos algales (previamente a la adición de rotíferos) se dejaban desarrollarse hasta obtener una concentración algal elevada, ésta era evaluada y ajustada la concentración algal elegida, que fue de 0.8×10^6 cel/ml. Posteriormente una porción de dichos cultivos algales eran sometidos a un tratamiento térmico y la otra se utilizaba directamente para la experiencia con los rotíferos. El tratamiento térmico a que se ha hecho referencia fue igualmente empleado en la alimentación con levaduras y consistía en el mantenimiento del medio de cultivo con los organismos que han de servir de alimento dentro de un baño a 65-70°C de temperatura durante 90 minutos.

La concentración algal se estableció en 0.8×10^6 ya que es de esperar que las variaciones en torno a este valor tengan efectos mínimos sobre el cultivo de rotíferos (veáse Yúfera, 1982). De hecho, concentraciones del orden de 0.5×10^6 cel/ml son las comúnmente usadas en experiencias de laboratorio con *Brachionus plicatilis* (Serra, 1987; Carmona *et al.*, 1989; King y Miracle, 1980). Sin embargo, en este trabajo se ha optado por la concentración de 0.8×10^6 cel/ml para compensar el posible efecto de la sedimentación de las partículas algales, cuando se utilizaba el tratamiento térmico.

La concentración algal se determinó mediante un contador automático de partículas

Coulter-Counter ZM, con las condiciones que se indican en la tabla 3.2. Posteriormente al recuento, la concentración algal del cultivo se llevaba al valor deseado mediante dilución de éste con medio fresco de la misma salinidad.

Por desecación se comprobó que la dosis de 0.8×10^6 cel/ml equivale a 0.2 g/l de algas *Tetraselmis sp.* en peso seco. En el caso de cultivos alimentados con levadura de panadería se administró alimento a la misma concentración en peso a volumen (0.2 g de peso seco de levaduras por litro de agua de mar diluida a 12 g/l de salinidad).

Resumiendo, grupos de 25 hembras de rotíferos se transfirieron entonces a tubos conteniendo 15 ml de medio con los diversos tipos de alimento: 1) una concentración algal de 0.8×10^6 cel/ml tratadas, 2) la misma concentración algal sin tratar, 3) 0.2g/l de levadura tratadas y 4) 0.2 g/l de levadura sin tratar.

Tabla 3.2. Condiciones utilizadas para el recuento de algas mediante el contador automático de partículas Coulter Counter ZM.

Electrolito	Isotón	
Impedancia de apertura	5	Kohms
Atenuación	32	
Corriente	10	mA
Volumen de aspiración	500	μm
Diámetro de la apertura	140	μm
Constante de calibración	21	
Rango de medida (a)		
diámetro inferior	5.92	μm
diámetro superior	13.05	μm
Valor utilizado	cuentas corregidas	

(a) Los diámetros que se reseñan son para esferas de igual volumen que las partículas correspondientes. La adecuación de los rangos se comprobó mediante recuento al microscopio en una cámara de Neubauer.

Los números de hembras finales, en cada condición experimental, fueron sometidos a un análisis de frecuencias Ji-cuadrado (Sokal y Rohlf, 1979), en el cual las frecuencias absolutas para cada condición experimental fueron calculadas mediante la suma de las poblaciones finales en los cuatro tubos de cultivo correspondientes (2 repeticiones x 2 tubos replicados por repetición). La tasa intrínseca de aumento (r) se calculó suponiéndose el crecimiento exponencial durante el período de cultivo mediante la expresión $r = (\ln N_f - \ln N_i) / t$, donde N_i y N_f son respectivamente el número de individuos al inicio y al final de la experiencia, y t es el tiempo transcurrido.

3.3 RESULTADOS

En la figura 3.1 se muestran las densidades de rotíferos al cabo de cuatro días (medias de las dos réplicas y dos repeticiones). En ella puede apreciarse que los mayores crecimientos se obtienen con algas no tratadas, siguiendo, por este orden, los cultivos alimentados con algas tratadas, con levaduras sin tratar, y por último, con levaduras tratadas. Estos rendimientos son los de las fases iniciales de cultivo, ya que los recuentos finales a los cuatro días correspondían a la fase de crecimiento exponencial.

Asimismo, en la figura 3.2 se presenta tanto el número de huevos partenogénéticos, como la relación de huevos durables respecto al total de huevos para las condiciones mencionadas anteriormente. Se observó que hay un efecto drástico del tratamiento del alimento, tanto si eran algas como si eran levaduras, sobre la producción de huevos partenogénéticos, la cual se reduce a aproximadamente un tercio de la producción correspondiente al alimento no tratado. También se observó, al contrario de lo que ocurre con las hembras, una producción de huevos partenogénéticos ligeramente superior con levaduras vivas que con algas tratadas, aunque dicha producción siempre es muy inferior a la encontrada con algas vivas. En el caso de los huevos durables su producción es muy escasa, encontrándose en todos los casos menos de 0.5 huevos por mililitro de medio de cultivo. Puede resultar interesante observar que la mayor proporción de huevos durables, respecto al total de huevos, se da con levaduras tratadas en condiciones de iluminación, seguido por algas tratadas en condiciones de oscuridad y de levaduras sin tratar en condiciones de oscuridad. El efecto del tratamiento en el tipo de alimentación parece que

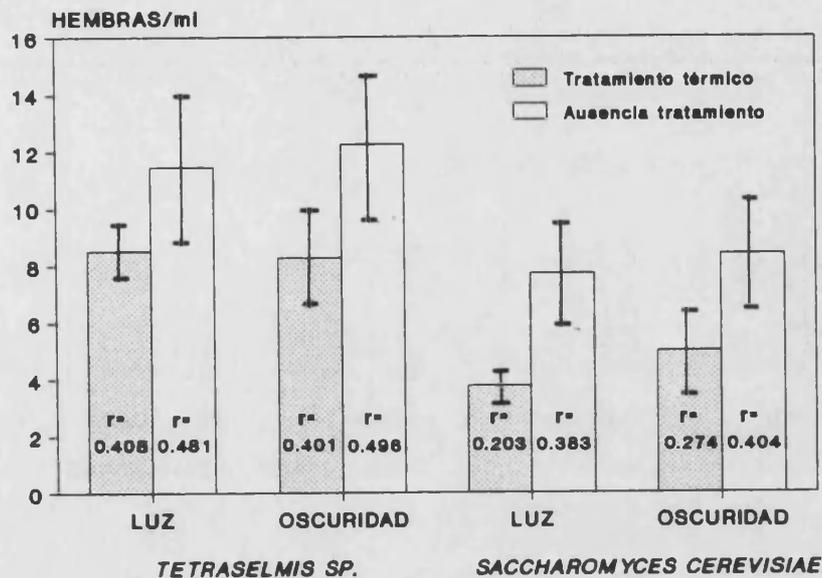


Figura 3.1. Densidad de *B. plicatilis* en las condiciones que se indican. Las líneas verticales corresponden al error típico de las medias. También se reseñan las tasas intrínsecas de reproducción correspondientes (r).

estimula la producción de huevos durables, solo fue una excepción el caso de levaduras tratadas en oscuridad que da una proporción más baja que en levaduras sin tratar, pero el número total de huevos es muy bajo. En los casos de ausencia de tratamiento se aprecia que la condición que produce una mayor producción de huevos durables es la de levaduras en condiciones de oscuridad.

Adicionalmente, se comprobó que la alimentación con algas tratadas térmicamente podía mantener el cultivo de rotíferos durante un número indefinido de generaciones, resultando dar cultivos tan estables como los mantenidos con algas vivas, que es la forma habitual de mantenimiento en nuestro laboratorio.

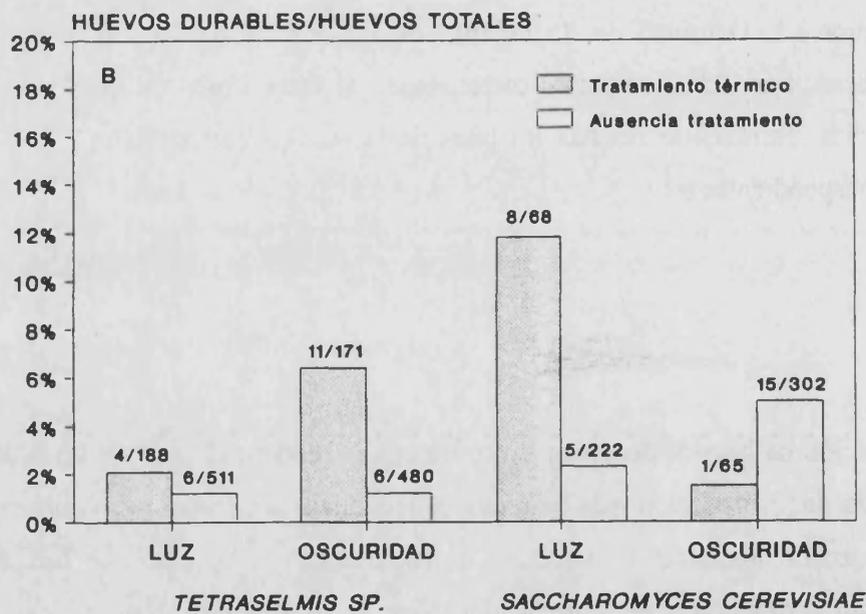
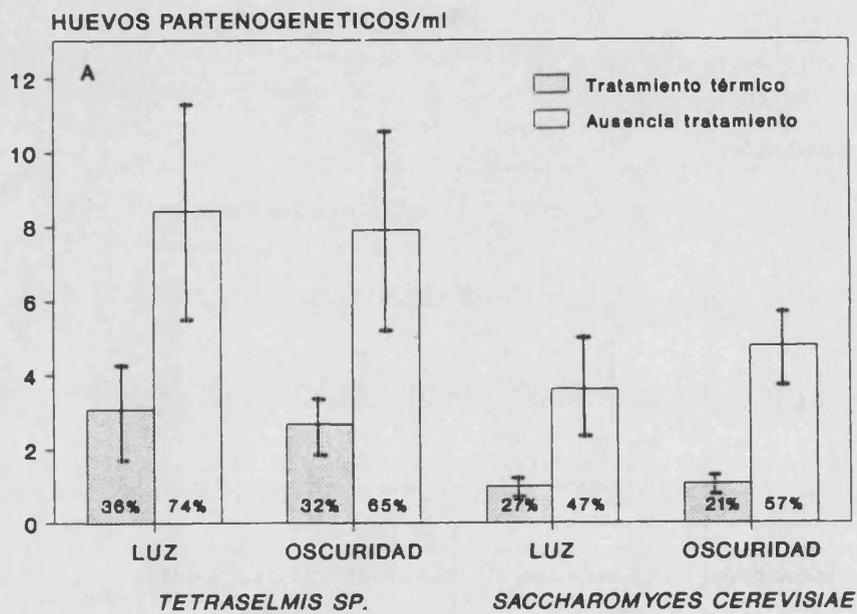


Figura 3.2. Número de huevos partenogénicos (A) y proporción de huevos durables (B) del rotífero *Brachionus plicatilis* en las condiciones que se indican. Las líneas verticales corresponden al error típico de las medias. Los números en el interior de la gráfica A indican el porcentaje de huevos partenogénicos por hembra. Los números sobre las barras de la gráfica B indican el número de huevos durables y el total de huevos contados que correspondían a 60 ml.

Tabla 3.3. Significación según un análisis Ji-cuadrado del efecto de tres factores del cultivo combinados entre sí sobre el crecimiento de *Brachionus plicatilis* (n.s., no significativo; * significativo para $0.99 > p > 0.95$; ** significativo para $p > 0.99$).

	g.l.	χ^2		Observaciones
<i>Factor</i>				<i>Condiciones más favorables</i>
Tipo de alimento	1	219.778	**	Algas
Tratamiento térmico	1	181.752	**	Sin tratamiento
Condiciones de iluminación	1	5.085	*	Sin iluminación
<i>Dependencia entre factores</i>				<i>Combinaciones sinérgicas^(a)</i>
Tratamiento y tipo de alimento	1	16.418	**	Levaduras no tratadas. Algas tratadas
Tipo de alimento e iluminación	1	3.891	*	Algas con luz. Levaduras en oscuridad
Tratamiento e iluminación	1	0.006	n.s.	--

(a). Combinaciones para las cuales el crecimiento de *Brachionus plicatilis* es mayor que el esperado si hubiera independencia entre factores.

El análisis de significación Ji-cuadrado (tabla 3.3) pone de manifiesto los factores que influyen en las diferencias comentadas. Este análisis revela que existe un mayor crecimiento con algas que con levaduras si bien hay una disminución del rendimiento asociada al tratamiento térmico. Asimismo, también parece existir una disminución del crecimiento cuando el cultivo se realizó a la luz, aun cuando las diferencias a este respecto parecen de poca importancia.

Tabla 3.4. Condiciones y resultados obtenidos en este estudio.

ORGANISMO	CONCENTRACION	SALINIDAD (g/l)	T ^o (°C)	VOLUMEN (l)	r	DENSIDAD FINAL (4 días) (Rot/ml)
Iluminación						
<i>Tetraselmis sp.</i>	0.8 x 10 ⁶ cel/ml	12	25	15 x 10 ⁻³	0.48	11.4
<i>Tetraselmis sp.</i> (trat.)	0.8 x 10 ⁶ cel/ml	12	25	15 x 10 ⁻³	0.40	8.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.2 g/l	12	25	15 x 10 ⁻³	0.38	7.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (trat.)	0.2 g/l	12	25	15 x 10 ⁻³	0.20	3.7
Oscuridad						
<i>Tetraselmis sp.</i>	0.8 x 10 ⁶ cel/ml	12	25	15 x 10 ⁻³	0.40	12.1
<i>Tetraselmis sp.</i> (trat.)	0.8 x 10 ⁶ cel/ml	12	25	15 x 10 ⁻³	0.49	8.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.2 g/l	12	25	15 x 10 ⁻³	0.40	8.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (trat.)	0.2 g/l	12	25	15 x 10 ⁻³	0.27	4.9

(trat.) Tratamiento de 65-70°C 90 min.

El estudio de significación para la dependencia entre factores muestra que el tratamiento térmico no afecta de igual forma al valor alimenticio de los cultivos de algas que al de levaduras, ya que las algas tratadas térmicamente dan mayores crecimientos de rotíferos de los que cabría esperar si el efecto del tratamiento fuera igual para ambos tipos de alimentación.

Por último, parece que existe una tendencia (tabla 3.3, Ji-cuadrado significativa al nivel del 5%) a que la iluminación no desfavorezca tanto el crecimiento en los cultivos alimentados con algas como lo hace en los alimentados con levadura.

3.4 DISCUSIÓN

El hecho de que *Brachionus plicatilis* se utilice extensamente en acuicultura ha propiciado el desarrollo de numerosas técnicas para su cultivo ensayándose un gran número de algas, levaduras y bacterias (Ito, 1960; Theilacker y McMaster, 1971; Hirayama y Watanabe, 1973; Person-le Ruyet, 1975; Hirayama y Nakamura, 1976; Pourriot, 1977; Hirayama *et al.*, 1979; Yasuda y Taga, 1980; Gatesoupe y Luquet, 1981; Sakamoto y Hirayama, 1983), tal y como se ha expresado en la introducción. Una de las características principales que ponen de manifiesto dichos trabajos es que los cultivos alimentados exclusivamente con levaduras rinden en la mayoría de los casos menores tasas de crecimiento que los alimentados con algas, parcial o totalmente (Hirayama y Watanabe, 1973; Yúfera y Pascual, 1980; Regea *et al.*, 1982; Sakamoto e Hirayama, 1983). En algunos casos las tasas alimentando con levaduras eran del mismo orden que las encontradas con algas (Hirata, 1979; tabla 3.1), pero entonces las concentraciones de rotíferos al final de las experiencias eran mucho menores en las alimentadas con levaduras que con algas (Hirata, 1979; 1980). Además, no se obtienen poblaciones estables aunque en un principio se encuentren densidades de rotíferos muy elevadas (Furudaka e Hidaka, 1973; Ortega *et al.*, 1983; Kawano *et al.*, 1978). Así las diferencias entre los crecimientos de poblaciones de *Brachionus plicatilis* alimentados con algas y con levaduras son conocidas a partir de los estudios anteriores y este estudio sólo las confirma.

Para explicar dichas diferencias, se han esgrimido dos tipos de causas: (1) la alteración del medio que puede provocar la descomposición de la levadura (Hirayama, 1987; James *et al.* 1987), y (2) la carencia en las levaduras de sustancias requeridas por *B. plicatilis* (Scott, 1981; Lubzens 1987). El primer efecto puede tener consecuencias tanto positivas como negativas sobre el crecimiento de los rotíferos. Los aspectos negativos, reflejados en los trabajos de Yúfera y Pascual (1980) y James *et al.* (1987), podrían explicarse por la toxicidad propia de los catabolitos producidos en la descomposición de la levadura. En cuanto a los aspectos positivos, encontrados por Hirayama y Watanabe (1973) e Hirayama (1987), pueden deberse a la aparición, con la descomposición, de un medio adecuado al crecimiento bacteriano, el cual a su vez proporcionaría alimento para *B. plicatilis* con menos carencias que la propia levadura (Hirayama 1985). Esta contraposición explicaría los resultados, aparentemente contradictorios,

de los autores citados, ya que sus protocolos probablemente difieren lo suficiente para que prevalezcan uno u otro fenómeno. Los aspectos beneficiosos de la descomposición de las levaduras, y la interpretación que se ha ofrecido al respecto, parecen estar apoyados por nuestros resultados. El tratamiento térmico que se ha administrado al alimento es equivalente a una pasteurización y debe provocar una disminución de la proliferación microbiana, con la consiguiente disminución del efecto de la descomposición de la levadura. Nuestros resultados muestran que es precisamente con levadura tratada térmicamente cuando se obtiene el menor crecimiento de los cultivos de rotíferos.

Sin embargo, también cabe la posibilidad de que el tratamiento térmico administrado acentúe las carencias que presenta la levadura como alimento para rotíferos. No obstante, el tratamiento empleado en nuestro caso es bastante suave y no parece que afecte demasiado a los requisitos limitantes más conocidos: la cistina y la vitamina B₁₂ (Lubzens, 1987); la vitamina B₁₂ posee cierta termorresistencia (la cual se ha comprobado en soluciones ácidas; Windhold *et al.*, 1976) y la cistina no cambia su valor nutricional mediante un tratamiento tan suave como el empleado. Es más, muy probablemente ambos productos se encuentran ya ausentes en la levadura sin tratar (Lubzens, 1987). Los efectos críticos de dichas carencias son muy patentes en la experiencia desarrollada por Yúfera y Pascual (1980), con dietas mixtas de algas y levaduras. En los resultados de dichos autores se observa que la tasa de crecimiento de *B. plicatilis* aumenta cuando se incrementa la concentración de levadura, manteniendo constante la de algas. Según nosotros lo interpretamos, en este tipo de alimentación mixta una pequeña cantidad de algas parece suficiente para proporcionar sustancias específicas requeridas en pequeñas proporciones durante el crecimiento de *B. plicatilis*, el cual encontraría los otros recursos, requeridos en mayor proporción, en la levadura. En este sentido, también se han conseguido mejorar los rendimientos en cultivos alimentados con levaduras, cuando se añaden vitaminas y otros aditivos (Gastesoupe y Robin, 1981).

La concentración final de la población alimentada con algas tratadas térmicamente es muy similar, y ligeramente superior en promedio, a la obtenida alimentando con levaduras sin tratar, con la diferencia de que en el primer caso se dan cultivos estables, tal y como se ha podido comprobar en nuestras experiencias, mientras que el cultivo con levaduras durante periodos prolongados provoca la inestabilización de las poblaciones de *B. plicatilis* (Hirayama, 1987). Estos resultados intermedios conseguidos con algas tratadas también han sido observados en

alimentaciones con algas desecadas (Hirayama y Nakamura, 1976) y con algas congeladas y desecadas (Person-Le Ruyet, 1975). Además, la disminución del crecimiento asociada al tratamiento térmico del alimento fue en este caso menos drástica, tanto en valores absolutos como relativos, que cuando el mismo tratamiento se aplicó a las levaduras.

Probablemente, una componente de la menor tasa de crecimiento de los cultivos alimentados con algas tratadas térmicamente se deba al carácter inactivo del alimento, lo que provoca su sedimentación y dificulta su captura por los rotíferos. Por ello, la ausencia de agitación del medio, aconsejada por los resultados negativos de las experiencias previas, puede ser un factor importante en la determinación del menor crecimiento con alimento tratado. Las consecuencias negativas de la agitación sobre el crecimiento de *B. plicatilis* ya fueron encontradas por Pourriot y Deluzarches (1970), atribuyéndolas a la aparición de disfunciones fisiológicas; sin embargo, la agitación tiene efectos beneficiosos cuando se realiza el cultivo de rotíferos en grandes volúmenes (James *et al.*, 1983). Por ello el daño que la agitación puede ocasionar en el crecimiento de los rotíferos depende de la intensidad de la turbulencia y de su efecto directo sobre los movimientos del rotífero y del alimento, y además del efecto de las paredes del recipiente. De acuerdo con lo expuesto, cabe esperar que el rendimiento de cultivos alimentados con algas inertes mejore si se cultiva en tanques de gran volumen y en agitación.

Otras causas del menor crecimiento de los rotíferos cuando las algas han sido tratadas térmicamente podrían ser: (1) la termolabilidad de sustancias esenciales para los rotíferos, y (2) la ausencia de un crecimiento algal, crecimiento que tendería a mantener el nivel del alimento. Esta segunda causa es poco importante en condiciones como las ensayadas en este trabajo, con sobresaturación de alimento. A este respecto, se puede señalar que nuestros resultados no muestran apenas diferencias entre los cultivos de rotíferos alimentados con algas vivas, y realizados a la luz y a la oscuridad, por lo que el crecimiento algal, en el periodo de tiempo y en las condiciones ensayadas, no debe tener prácticamente efecto sobre los resultados.

A pesar del menor crecimiento de los rotíferos cuando éstos se alimentan con algas tratadas térmicamente, nuestros resultados muestran que se pueden obtener poblaciones bastante densas y estables de *B. plicatilis*. La tabla 3.4 muestra las condiciones y los resultados del presente estudio, en ella se puede apreciar que los valores de la tasa de aumento de la población cuando se alimenta con levaduras caen dentro de los rangos obtenidos por otros autores (tabla 3.1) y que las combinaciones más favorables de nuestro estudio en algunos casos son similares e incluso

superiores a las obtenidas en otras combinaciones alimentando con algas vivas (Hirayama y Watanabe, 1973; Hirata, 1979; 1980). Así las algas tratadas térmicamente constituyen un posible alimento alternativo a los empleados actualmente para fines prácticos y de diseño experimental. El control de la actividad microbiana, excepto la de los microorganismos asociados a los rotíferos, y la de los grupos de esporulados que sobreviven a la pasteurización, representa una ventaja para la estandarización de cultivos experimentales de rotíferos y permite el control de las condiciones de cultivo (p.e., concentraciones de oxígeno) o de las medidas que se deban realizar (p.e., análisis de catabolitos, intercambio gaseoso, etc.). Dicho alimento mejora las posibilidades de almacenamiento debido a que puede ser concentrado fácilmente por sedimentación espontánea y decantación, y a que basta la refrigeración (aproximadamente 4 °C) para inhibir la actividad microbiana. Estas ventajas también pueden ser útiles en los cultivos de *B. plicatilis* orientados a la acuicultura, si bien este uso exige pruebas adicionales para evaluar los efectos del tratamiento térmico de las algas, como por ejemplo, determinación de las densidades de rotíferos en cultivos de gran volumen, caracterización del valor nutritivo de los rotíferos, etc.

4. DINAMICA POBLACIONAL DE *BRACHIONUS PLICATILIS* EN CONDICIONES LIMITANTES DE OXÍGENO

4.1 INTRODUCCIÓN

En la primera parte del presente trabajo se describen las altas concentraciones de rotíferos localizadas en aguas profundas cerca de la oxiclina de lagos meromícticos. Asimismo, la concentración de oxígeno también puede ser un factor limitante en aguas salobres de latitudes cálidas. *Brachionus plicatilis* es una especie adaptada a condiciones de altas salinidades y temperaturas, condiciones que determinan a su vez bajos coeficientes de solubilidad de oxígeno, por lo que es esperable que esté adaptado a vivir en niveles bajos de oxígeno. Además, esta especie viene siendo cultivada en cultivos masivos destinados a acuicultura, en los cuales las densidades elevadas pueden causar caídas en la tensiones de oxígeno.

En relación con el oxígeno, la mayor parte de estudios experimentales realizados con rotíferos se orientan a la determinación de las tasas respiratorias como una forma de estimación de las tasas metabólicas, habiéndose encontrado que la mayoría de las tasas respiratorias individuales de los rotíferos caen en el rango de $2-5 \times 10^{-3} \mu\text{l de O}_2 \text{ animal}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Pourriot y Deluzarches, 1970; Ruttner-Kolisko, 1972b; Doohan, 1973; Epp y Winston, 1978; Leimeroth, 1980). Según estos estudios las tasas respiratorias parecen ser insensibles a las densidades de animales, condiciones de iluminación (Pourriot y Deluzarches, 1970) o pH (Epp y Winston 1978) en rangos representativos de condiciones naturales, así como, a la concentración de oxígeno del medio para valores superiores al 50% de la saturación (Pourriot y Deluzarches, 1970). Sin embargo, existen evidencias de que se encuentran influidas por el tamaño de los organismos (Pourriot y Deluzarches, 1970; Pourriot y Champ, 1981), y por su estado fisiológico (Ruttner-Kolisko 1972b). También se ha descrito un aumento del consumo de oxígeno con la temperatura (Epp y Lewis, 1980; Galkovskaya *et al.*, 1987), y con la cantidad de alimento (Pourriot y Deluzarches, 1970; Pourriot, 1973; Leimeroth, 1980). Esto es consistente con el incremento que produce en el metabolismo el aumento de temperatura, y con el aporte energético que supone un aumento en la cantidad de alimento. También se ha detectado una reducción del consumo de oxígeno con las bajas salinidades (Epp y Winston, 1978).

Así pues, el consumo de oxígeno se encuentra en una encrucijada de adaptaciones y condiciones del medio. Por un lado, la fisiología del organismo se adapta y/o responde a un conjunto de factores externos e internos variando la demanda de oxígeno. Por otro lado, el nivel ambiental de oxígeno puede actuar como una condición relevante para la ecología de los rotíferos, al menos para aquellas especies cuyos nichos incluyen ambientes pobres en oxígeno.

No obstante estas observaciones y a pesar de que la dinámica poblacional es probablemente una de las resultantes ecológicamente más relevantes del conjunto de las interacciones que afectan a la fisiología de los individuos, no se ha determinado experimentalmente el efecto de las bajas tensiones de oxígeno sobre las dinámicas poblacionales de rotíferos. De hecho, hemos encontrado muy pocos trabajos experimentales sobre la tolerancia de los rotíferos a bajas concentraciones de oxígeno que se limitan a algunas observaciones experimentales relacionadas con trabajos de campo (p.e., Ruttner-Kolisko, 1980) o en trabajos de acuicultura con otros objetivos (Hirayama, 1985; Schlüter, 1980). El propósito de esta parte del trabajo, por lo tanto, consiste en evaluar experimentalmente dicha tolerancia.

4.2 MATERIAL Y METODOS

A partir de los resultados de la experiencia de alimentación de los rotíferos con alimento inactivo (Capítulo 3), se determinó que la alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con algas *Tetraselmis sp.* tratadas térmicamente (65-70°C 90 min) en condiciones de no agitación era un alimento adecuado para los fines propuestos. Por lo tanto, se procedió a la formación de una línea de cultivo de rotíferos alimentados con algas tratadas térmicamente a partir de los cultivos alimentados con algas vivas descritos en el Capítulo 2. Para ello se aislaron hembras individualmente mediante una pipeta Pasteur realizando sucesivos pases por pocillos con agua de mar estéril cuya salinidad había sido previamente ajustada (12 g/l). Las hembras se depositaron en un medio conteniendo una concentración de 0.8×10^6 cél/ml del alga *Tetraselmis sp.* tratadas térmicamente, cultivándose a 25°C con iluminación constante (PAR: aprox. 35 μ E/m²s). Estos cultivos eran alimentados semanalmente sustituyendo parte del medio por medio fresco, consistente en un cultivo de algas tratado térmicamente (0.8×10^6 cél/ml). Esta línea de cultivo se utilizó para las experiencias que se describen a continuación al cabo de varios

meses de ser establecida y se mantiene todavía en el laboratorio (después de más de 7 años).

Los cultivos experimentales se desarrollaron en matraces de tres bocas que permitieron insuflar nitrógeno al objeto de mantener las condiciones de microaerofilia deseadas. Las figuras 4.1 y 4.2 muestran una descripción gráfica del sistema de cultivo así como los resultados de experiencias preliminares, de las que se dedujo la adecuación de dicho sistema frente a otros menos sofisticados consistentes en frascos de cierre hermético sin atmósfera de nitrógeno en el momento del muestreo. La experiencias previas se realizaron inoculando 20 y 40 ml de una población de rotíferos obtenida a partir de los cultivos de mantenimiento en ocho recipientes, cuatro de tres bocas (figura 4.1) y cuatro de una sola boca (frascos) los cuales contenían 400 y 200 ml de una suspensión de algas *Tetraselmis sp.* tratadas térmicamente respectivamente. Las concentraciones de oxígeno de todos ellos fueron evaluadas diariamente durante ocho días consecutivos (electrodo Orión 97-08-99). En el caso de los recipientes de tres bocas, las aperturas e introducción del electrodo se realizaba mediante una sobrepresión de nitrógeno en la cámara de aire que quedaba en la parte superior del recipiente, impidiendo de esta forma la entrada de aire atmosférico. La figura 4.2 muestra que en todos los recipientes de una sola boca y cierre hermético (frascos) existe una menor estabilidad ya que presentan mayores oscilaciones en las medidas de oxígeno a lo largo del tiempo que los recipientes de tres bocas; sólo uno de

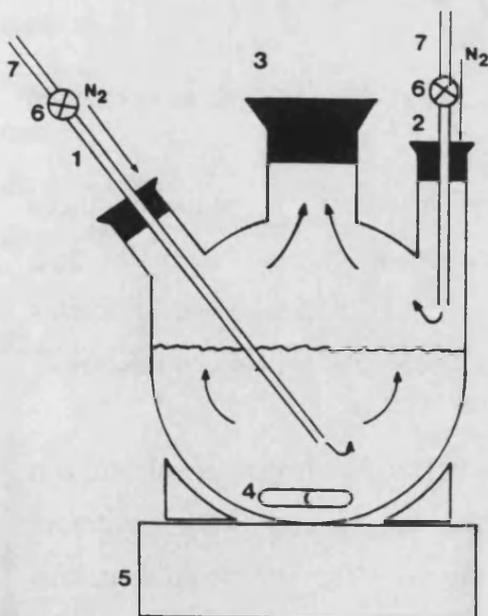


Figura 4.1. Recipiente de tres bocas con cierre hermético utilizado en la experiencias. 1) Entrada constituida por una varilla de vidrio hueca, la cual permite el burbujeo de gases en el medio de cultivo. 2) Entrada de nitrógeno constituida por una varilla de vidrio hueca, no sumergida en el medio, de forma que al introducir nitrógeno se forma una cámara anóxica que permite introducir el electrodo sin que se disuelva oxígeno atmosférico. 3) Entrada para el electrodo de oxígeno. 4) Pececillo magnético 5) Agitador magnético, permite que la toma de muestras sea homogénea. 6) Llave de pinza Moor. 7) Tubos de silicona.

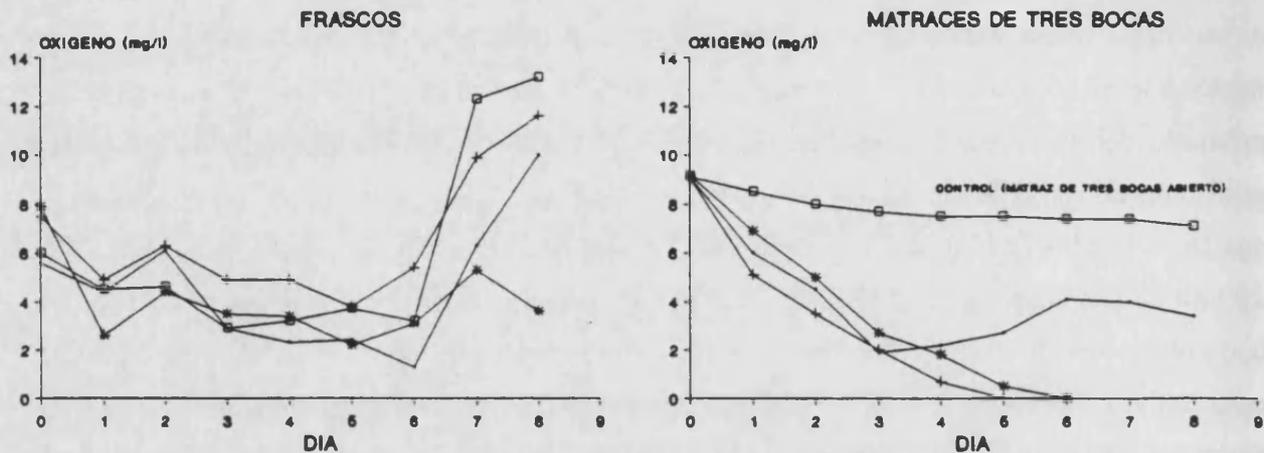


Figura 4.2. Evolución de las concentraciones de oxígeno a lo largo del tiempo en una población de *Brachionus plicatilis* mantenida en recipientes como los descritos en la figura 4.1 que se manipulaban bajo flujo de N_2 y en frascos de 200 ml de una sola boca sin flujo de nitrógeno. El matraz llamado control, consistió en un matraz de tres bocas idéntico a los anteriores pero cuyo cierre no se realizó de forma hermética sino que se utilizó un tapon de algodón graso.

estos uno sufrió ligeras oscilaciones al final de la experiencia que posteriormente se comprobó que eran debidas a un fallo en el sellado de una apertura.

Se realizaron dos experiencias destinadas a la evaluación de los parámetros demográficos de la población de rotíferos sometida a bajas concentraciones de oxígeno, llamadas aquí Experiencia 1 y Experiencia 2. En ambas, individuos del clon CU de *Brachionus plicatilis* fueron cultivados en agua de mar diluida de una salinidad de 12 g/l a 25°C y bajo condiciones de iluminación constante.

La Experiencia 1 se inició con 500 hembras provenientes del cultivo de mantenimiento, con algas tratadas térmicamente, descrito anteriormente, e inoculadas en cada uno de los 4 matraces de tres bocas utilizados en la experiencia. Dichos matraces contenían 400 ml de medio de cultivo consistente en un cultivo de 0.8×10^6 cél/ml del alga *Tetraselmis sp.* tratado térmicamente.

Tres de dichos matraces fueron herméticamente cerrados de forma que el oxígeno fue disminuyendo paulativamente como consecuencia de la respiración de los rotíferos. El cuarto recipiente se mantuvo como control utilizándose un tapón de algodón graso para su cierre y no se insuflaba nitrógeno en el momento de muestreo y medición de oxígeno.

Diariamente se evaluaba la densidad de población y la concentración de oxígeno. Para lo primero, se tomaba una o dos muestras de un mililitro en las que se contaban los individuos mediante un esteromicroscopio. El oxígeno se determinó con un electrodo (Orion 97-08-99) introducido directamente en el medio. Durante la manipulación de los cultivos, la oxigenación se previno utilizando una corriente de nitrógeno en la cámara de aire que quedaba en el recipiente por encima del medio de cultivo. Esta última operación se realizó en todos los cultivos excepto en el utilizado como control. Los cultivos no fueron alimentados tras su inoculación y la experiencia finalizó con la extinción de la población, excepto uno de los cultivos (Matraz A), que no fue seguido hasta el final.

En la Experiencia 2 se utilizaron dos cultivos de rotíferos de 400 ml en los mismos matraces que los utilizados en la experiencia 1, pero que tenían una densidad de 15 hembras/ml (6000 hembras en total) y con alimento en exceso. El nivel de oxígeno, medido del mismo modo que en la Experiencia 1, fue ajustado a una concentración aproximada de 1-2 mg/l en un cultivo y a 0-1 mg/l en el otro por el procedimiento de burbujear nitrógeno en el medio de cultivo. El cultivo se observaba diariamente y cuando las concentraciones de oxígeno eran muy bajas se ajustaba burbujear aire por medio de una jeringa de 50 ml. Estas operaciones se realizaban con el electrodo de oxígeno introducido en el medio, observándose por tanto las concentraciones de oxígeno resultantes. En esta experiencia los cultivos fueron alimentados periódicamente (en el apartado de resultados se indica los intervalos de tiempo y la dilución) añadiendo medio con una concentración de 0.8×10^6 cél/ml de *Tetraselmis sp.* tratadas térmicamente. La experiencia finalizó a los 53 días.

Para ambas experiencias, se estimaron las tasas instantáneas de crecimiento (r) por medio de un ajuste al modelo de crecimiento exponencial cuya ecuación es: $\ln N_t = \ln N_0 + rt$, donde N_0 y N_t son respectivamente el número de individuos al inicio y al final de la fase de crecimiento exponencial, que tenía lugar al principio de las experiencias y t es el tiempo transcurrido. Se calculó también la integración del número de rotíferos con respecto al tiempo como $\Sigma(N_i + N_{i+1})/2$ donde N_i y N_{i+1} son las medidas diarias de la densidad de población.

4.3 RESULTADOS

Experiencia 1. Cultivos cerrados con solo una dosis inicial de alimento

En las figuras 4.3 y 4.4 se representan las variaciones de la densidad de población de los rotíferos, así como los valores de los huevos por hembra, para los ensayos A, B, C y Control de la Experiencia 1, respecto de la concentración de oxígeno en el medio. Estos ensayos finalizaron con la extinción de las poblaciones salvo para el caso A, el cual se perdió a causa de un accidente.

La Experiencia 1 muestra que *Brachionus plicatilis* es capaz de tolerar concentraciones de oxígeno por debajo de 1 mg/l, al menos durante 13 días (figura 4.3, Matraz A). Sin embargo, los tres replicados se comportan de una manera diferente. El cultivo B alcanza una densidad máxima similar al control pero después de alcanzar el máximo, el nivel de oxígeno cae bruscamente, probablemente debido a la respiración de los rotíferos, y la población muere cuando el oxígeno alcanza el valor cero. Por el contrario los cultivos A y C no alcanzaron altas densidades y los niveles de oxígeno se mantuvieron en unos niveles bajos pero distintos de cero, con lo cual las poblaciones sobrevivieron largo tiempo. La figura 4.3 muestra que el cultivo control, mantenido a una concentración media de oxígeno de 7.9 mg/l, se mantiene un periodo de tiempo mayor que los cultivos C y B (79 días frente a 30 y 50 respectivamente), los cuales se desarrollan a concentraciones de oxígeno siempre inferiores a 5 mg/l. Además, la densidad poblacional máxima es también mayor en el cultivo control. También se observa que los cultivos parecen haberse desarrollado en dos etapas, en una primera fase, que se produce entre los 15 a 20 días, a partir de una concentración inicial de 1.25 hembras por mililitro llegan a alcanzar inicialmente densidades máximas de 19-20 hembras y posteriormente se produce otro incremento que produce densidades del orden de 3 y 4 veces mayores, en el control y en uno de los cultivos (Matraz B), aunque no son estables, ya que inmediatamente disminuyen. Este comportamiento podría ser debido a la utilización como alimento de bacterias procedentes de la descomposición de la población algal, o de la de los propios rotíferos, quizás en aquellos cultivos con mayor proporción de oxígeno, especialmente en el control, se podía dar una mayor descomposición de la materia orgánica y por lo tanto un mayor crecimiento bacteriano.

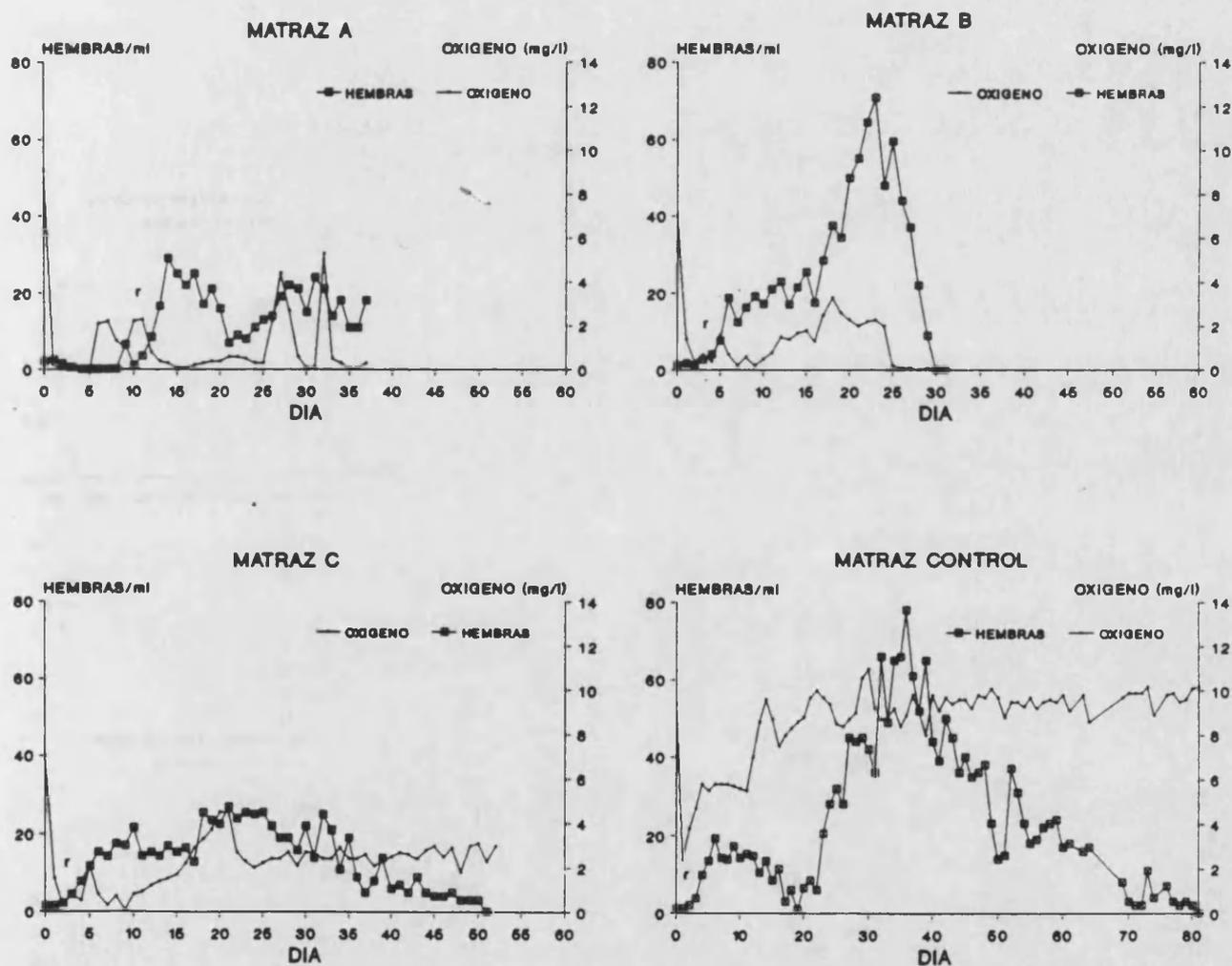


Figura 4.3. **Experiencia 1.** Variación diaria de la densidad poblacional y de la concentración de oxígeno en cuatro poblaciones del rotífero *Brachionus plicatilis*. A, B y C representan poblaciones creciendo en matraces cerrados microaerófilos. La población mantenida como control creció en un matraz tapado con algodón goso. Las poblaciones, excepto la población A, fueron seguidas hasta su extinción. Además se señala el tramo en el que fueron calculadas las tasas de crecimiento (r) para cada población.

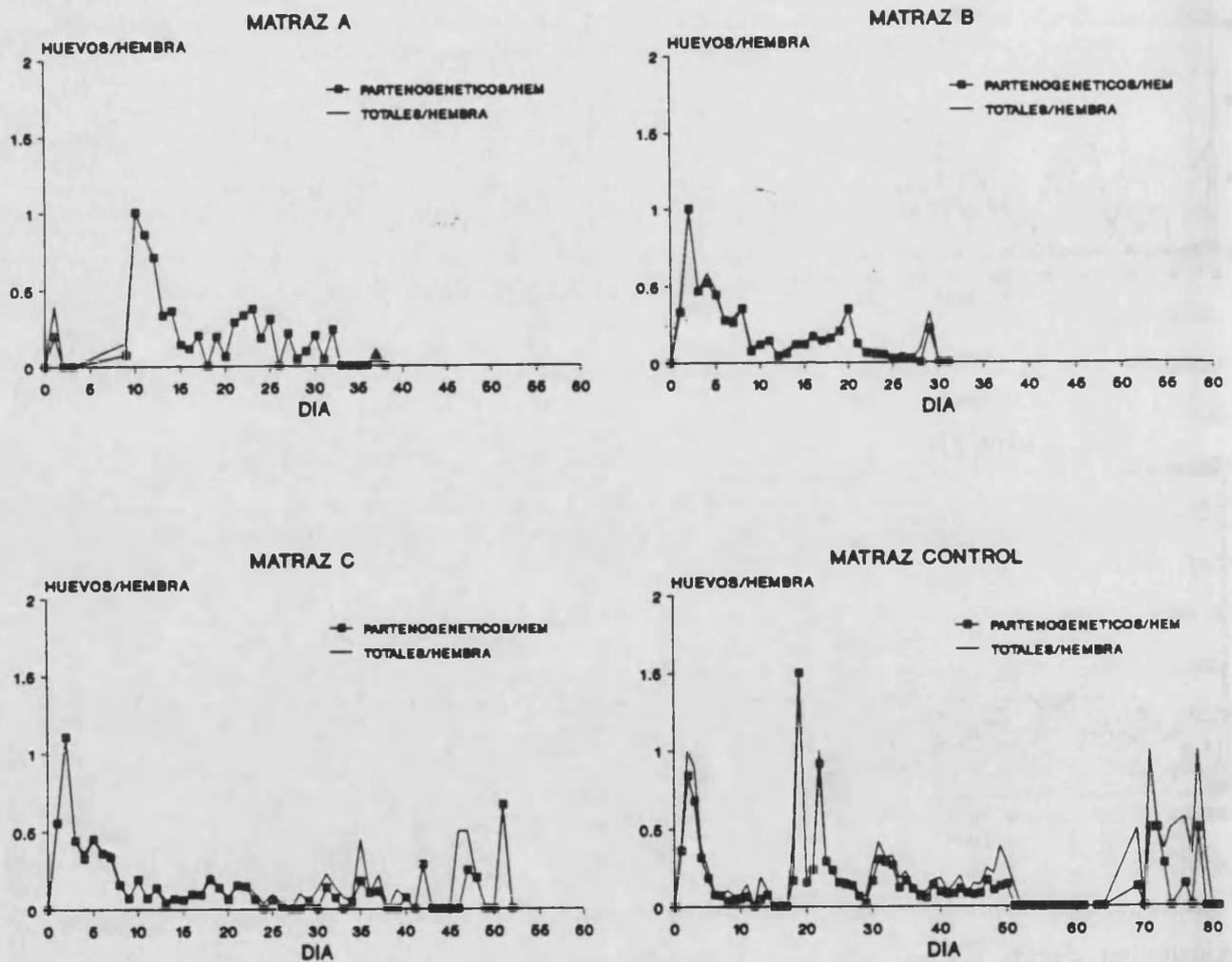


Figura 4.4. **Experiencia 1.** Variación diaria del número de huevos por hembra en cuatro poblaciones del rotífero *Brachionus plicatilis*. A, B y C representan poblaciones creciendo en matraces cerrados. La población mantenida como control creció en un matraz que se tapó con algodón goso. Las poblaciones, excepto la población A, fueron seguidas hasta su extinción.

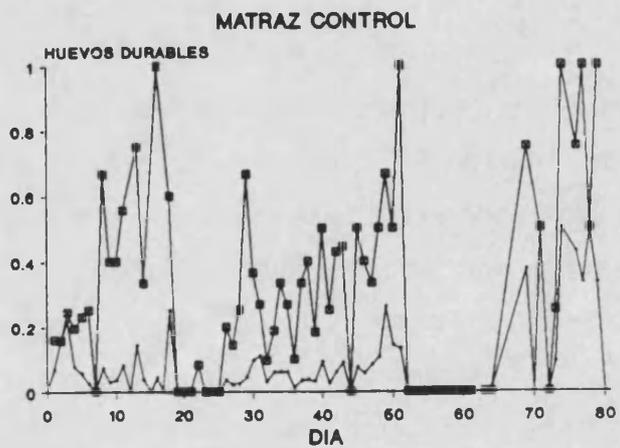
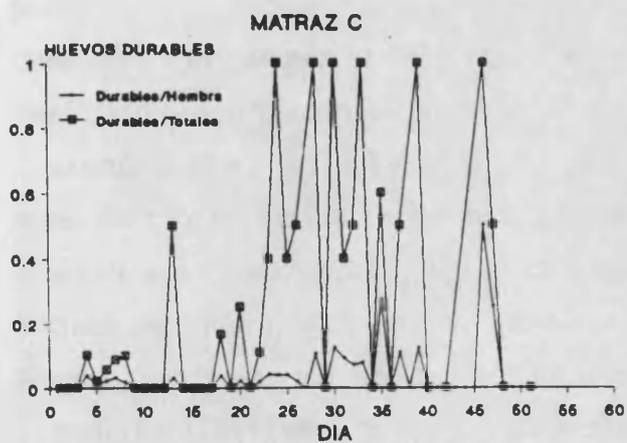
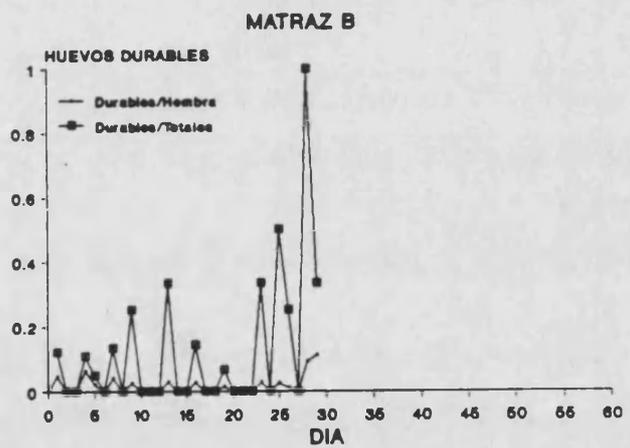
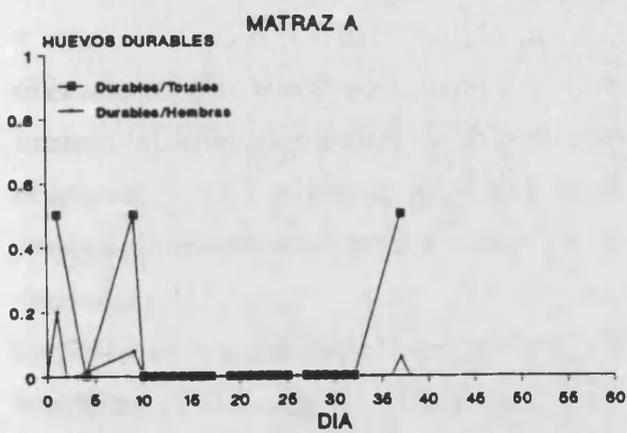


Figura 4.5. Experiencia 1. Días a los que se producen huevos durables expresados respecto al total de hembras y respecto al total de huevos producidos en el día en cuestión.

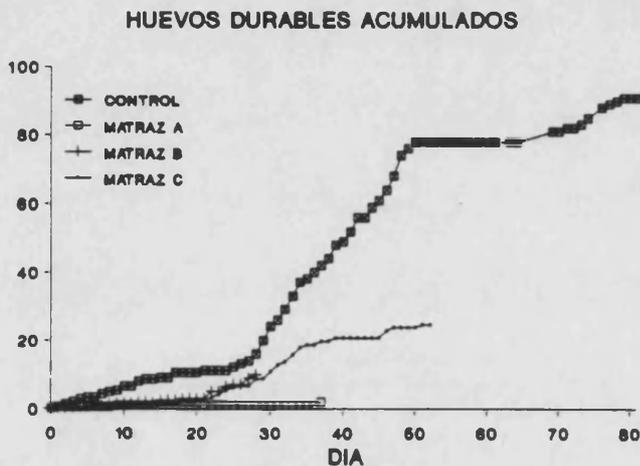


Figura 4.6. Evolución de la cantidad de huevos durables acumulados a lo largo del tiempo en los tres matraces correspondientes a la experiencia 1.

En cuanto a los huevos partenogénéticos producidos por hembra (figura 4.4) nos encontramos con que en todos los casos de esta experiencia la producción es alta al principio, es decir en aquellos puntos que se corresponderían a una fase de crecimiento exponencial, para después ir cayendo poco a poco o bruscamente según los casos. En el cultivo A este patrón se presenta menos acusadamente y con una demora de 10 días. En el cultivo mantenido como control se observa que la producción de huevos/hembra presenta además un máximo absoluto en el día 19 (figura 4.4), día a partir del cual comienza a incrementarse la población (figura 4.3). Resultados muy similares han sido encontrados por otros autores, así Hofmann (1977) muestra que el pico de la población es precedido en general por un máximo de la razón de huevos, además, observa un descenso de los huevos por hembra con el incremento de la abundancia. Obviamente, en la caída de la población está implicado un descenso de la fertilidad.

En cuanto a la producción de huevos durables, esta cepa produce proporciones altas de huevos durables, de forma que en condiciones óptimas de alimento y aireación se han descrito tasas del 64% (Serra, 1987). En la Experiencia 1 (tabla 4.1; figura 4.5 y figura 4.6) se detecta un incremento global de su producción en el matraz mantenido como control, el cual a su vez, es el que presenta el mayor número de rotíferos a lo largo del tiempo. Evidentemente, una mayor densidad poblacional aumenta la probabilidad del encuentro entre macho y hembra, es decir, favorece la fecundación y por tanto la mixis (Snell y Garman, 1986). Por otra parte, dicha observación también estaría de acuerdo con las hipótesis de Pourriot y Snell (1983) y Gilbert (1980) los cuales sugieren que la producción de huevos durables conlleva un importante gasto energético, el cual sólo es posible si las condiciones de oxígeno, por ejemplo son buenas, y

existen abundantes recursos, es decir en periodos próximos a los picos de población y no después de estos ya que los recursos se han agotado. También se detecta un incremento no ya de su producción, puesto que hay menos días en los que se producen huevos durables, pero sí de su importancia, es decir, es mayor el porcentaje de huevos durables respecto al total de huevos, cuando la población se encuentra próxima a su extinción, lo cual es evidente, puesto que entonces la población experimenta una drástica caída reproductiva.

La concentración de oxígeno parece tener un efecto en la tasa instantánea de crecimiento de la población y en las densidades máximas (tabla 4.1), ya que la tendencia general es que ambos parámetros decrezcan cuando los niveles medios de oxígeno bajan. Sin embargo, los valores de r fueron medidos en la fase inicial de cultivo y por ello la diferencia entre cultivos experimentales y control puede verse afectada por un proceso de aclimatación que tendería a exagerar la diferencia entre ellos; o por el contrario, también es posible que el estrés de oxígeno no actúe inmediatamente sobre r , por lo que las diferencias podrían ser incluso mayores que las observadas. Otros parámetros, como la densidad máxima, poseen el inconveniente de ser valores muy puntuales, o, como en el caso de la densidad media, no considerar el tiempo de permanencia de la población. Un parámetro que no está sometido a estas inconveniencias es la integración de rotíferos durante el tiempo de permanencia del cultivo. Evidentemente no en el sentido de número acumulado de individuos de la población, ya que no sabemos la tasa de renovación, si no como mantenimiento diario de una densidad más o menos fluctuante. Para un cultivo cerrado, sin adición de alimento, la integración de los rotíferos con respecto al tiempo hasta la extinción de la población (tabla 4.1) podría ser una estimación de la explotación de los recursos del medio, constituyendo un concepto similar al de capacidad de carga. Este parámetro ha sido calculado y muestra un claro descenso cuando la concentración de oxígeno desciende (tabla 4.1).

Probablemente el indicador que menos se diferencia en el conjunto de los cultivos experimentales del control es el número de huevos por hembra. Este hecho sorprendente podría deberse a que a baja concentración de oxígeno la fecundidad está poco relacionada con el número de huevos cargados por hembra, debido a que el desarrollo del huevo sufriría una demora por baja tasa metabólica.

La Experiencia 1 demuestra que *B. plicatilis* presenta una marcada tolerancia a las bajas concentraciones de oxígeno; aunque los indicadores de eficiencia biológica absoluta señalan los efectos negativos del estrés de oxígeno. Se ha de observar que en esta experiencia los efectos de

la carencia de oxígeno se han evaluado para condiciones en las que el alimento presumiblemente fue también limitante durante las últimas fases de los cultivos, como muestra la extinción del cultivo control.

Experiencia 2. Condiciones microaeróbicas controladas de oxígeno y alimentación periódica.

La Experiencia 2 está diseñada para minimizar el efecto del alimento y poder observar mejor el efecto de la microaerobiosis durante el cultivo experimental. Esta experiencia confirma que las poblaciones de rotíferos son capaces de vivir en concentraciones de oxígeno inferiores a 1 mg/l durante largos periodos de tiempo (figuras 4.7, 4.8 y 4.9). En ellas se observa que a partir de 15 hembras/ml se pasó a una densidad más o menos constante alrededor de 37-38 hembras/ml en ambos cultivos, de forma que el número de rotíferos se mantiene bastante constante con

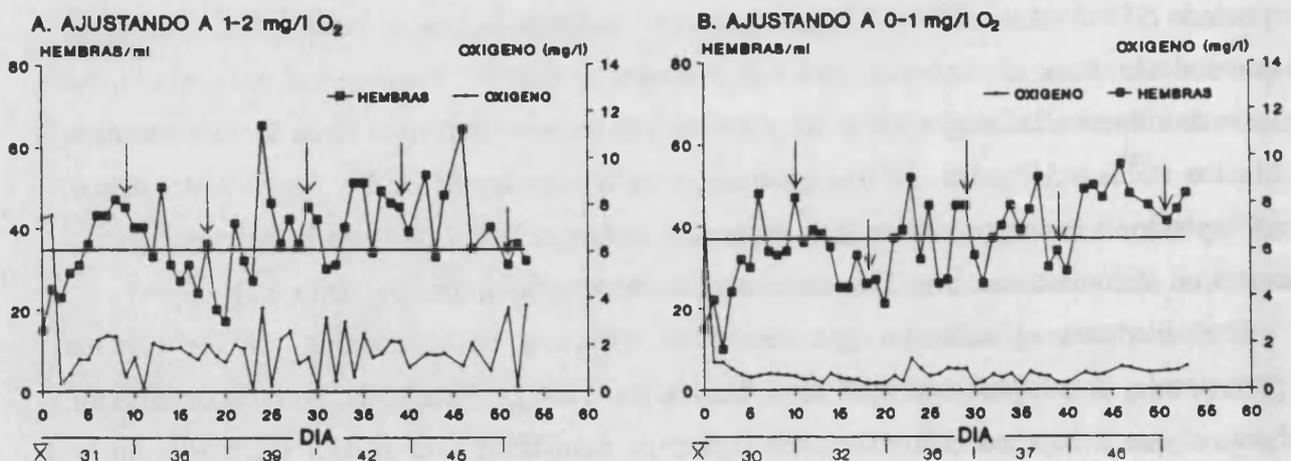
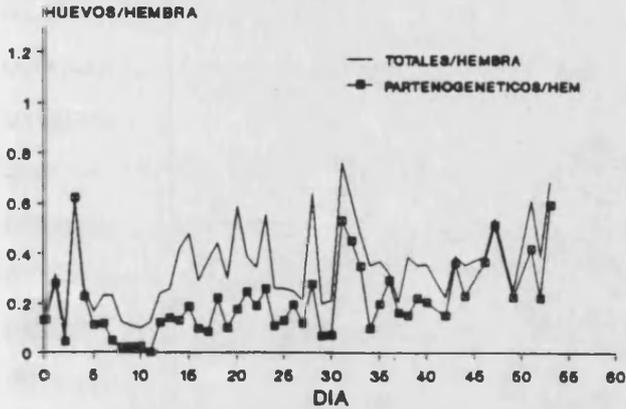


Figura 4.7. Experiencia 2. Variación diaria de la densidad poblacional y de la concentración de oxígeno en dos cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis*. Las concentraciones de oxígeno fueron ajustadas diariamente a aprox. 1-2 mg/l (A) y 0-1 mg/l (B). Las flechas en la figura indican los días en los cuales se suministró alimento. Las diluciones asociadas a la incorporación de alimento en la densidad de rotíferos fueron respectivamente 1:1.03 (décimo día), 1:1.02 (décimo octavo día), 1:1.03 (vigésimo noveno día) 1:1.13 (trigésimo noveno día) y 1:1.12 (quincuagésimo primer día).

A. AJUSTANDO A 1-2 mg/l O₂



B. AJUSTANDO A 0-1 mg/l O₂

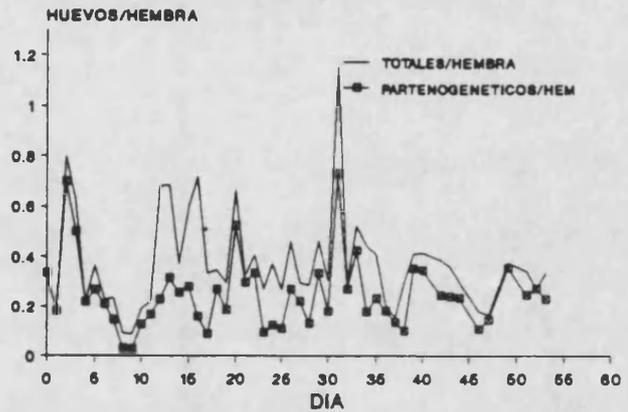
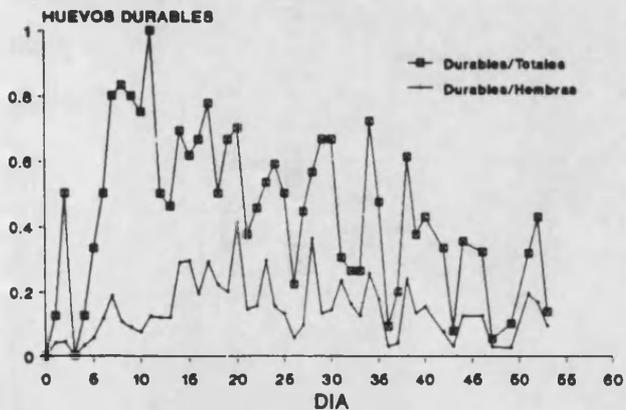


Figura 4.8. Experiencia 2. Variación diaria de la razón del número de huevos por hembra en dos cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis*. Las concentraciones de oxígeno fueron ajustadas diariamente a aprox. 1.2 mg/l (A) y 0.2 mg/l (B).

A. AJUSTANDO A 1-2 mg/l O₂



B. AJUSTANDO A 0-1 mg/l O₂

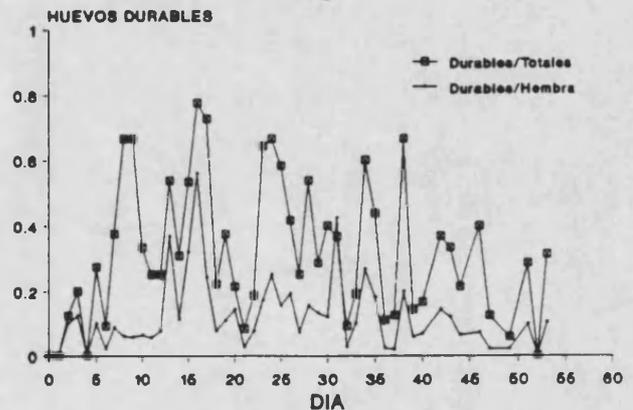


Figura 4.9. Experiencia 2. Días a los que se detectan producciones de huevos O₂ durables, expresados respecto al total de hembras y respecto al total de huevos producidos en el día en cuestión.

Tabla 4.1. Parámetros poblacionales y concentraciones medias de oxígeno para cultivos sometidos a bajas condiciones de aireación. Los valores entre paréntesis hacen referencia a las concentraciones de oxígeno, o su media en el momento, o en el intervalo en que fue evaluado el parámetro correspondiente. N x tiempo corresponde a la integración del número de rotíferos a lo largo del tiempo. HP, huevos partenogénicos. F, Hembras. HD, huevos durables.

	r, d ⁻¹	Densidad máxima, Ind·ml ⁻¹	Media (parámetro. ml ⁻¹ . día ⁻¹)			HP/F	HD/F	% HD/H	N x tiempo Ind·d·ml
			F	HP	HD				
Experiencia 1 (baja densidad inicial)									
CONTROL ^a	0.773(4.77)	78(8.90)	22.7	2.65	1.20	0.15	0.08	31.1	1836.7
A	0.701(0.95)	29(0.30)	12.3	1.94	0.05	0.17	0.01	2.6	-
B	0.528(0.90)	71(2.30)	26.3	3.37	0.34	0.21	0.02	9.3	787.9
C	0.564(0.92)	27(2.70)	13.4	1.38	0.47	0.15	0.04	25.3	698.8
Experiencia 2 (alta densidad inicial)									
A	0.147(1.20)	65(3.57)	38.4	7.47	5.22	0.20	0.12	41.5	-
B	0.336(0.78)	55(1.00)	37.1	8.34	4.27	0.25	0.12	33.4	-

a. Sin flujo de N₂.

oscilaciones poco pronunciadas alrededor de 37-38 hembras/ml y sorprendentemente se alcanza el mismo valor para las dos concentraciones de oxígeno. Algo similar ocurre con la producción de huevos que presenta una relación cercana a 0.4 huevos por hembra y por día. Es decir, en ésta última experiencia ambas poblaciones presentan parámetros muy similares para las dos concentraciones de oxígeno ensayadas. De cualquier forma parece ser que las concentraciones de oxígeno ligeramente bajas ejercen ya un efecto sobre las tasas de crecimiento, lo cual explicaría que se observe poco efecto entre los dos valores de la Experiencia 2. En realidad, si la concentración de oxígeno tiene una mayor influencia sobre la tasa de natalidad que sobre la de mortalidad, lo cual es esperable, y además, si la baja concentración de oxígeno reduce la tasa del metabolismo, con lo que aumentan los tiempos de desarrollo del huevo, de generación y de duración de la vida, todo ello se traduce en una igualación de las tasas de natalidad y mortalidad que conlleva a una reducción de la tasa de aumento poblacional. Es decir, las poblaciones después de un primer incremento resultante de unas condiciones aeróbicas iniciales reducen su crecimiento, de manera que se hace poco perceptible, sin embargo, cuando se calculan las medias de individuos de 10 en 10 días (figura, 4.7) se puede observar una clara tendencia de aumento de la población a lo largo del tiempo en ambas experiencias. Las concentraciones medias de oxígeno de la Experiencia 2 han sido evaluadas a largo plazo, sin embargo, es difícil el evaluar cual sería el comportamiento de la población a concentraciones de oxígeno medias inferiores a las obtenidas en este estudio de 0.78 mg/l, las cuales en principio son difíciles de conseguir en experiencias a largo plazo, puesto que siempre existe una pequeña oscilación en torno a los valores ajustados la cual podría ser extremadamente peligrosa ajustando a valores muy bajos, además probablemente tales concentraciones sólo podrían ser mantenidas durante periodos de tiempo muy limitados.

4.4 DISCUSION

Lo más destacable de los resultados de estas dos experiencias es que dan una prueba experimental de la tolerancia de *Brachionus plicatilis* a las bajas concentraciones de oxígeno durante prolongados periodos de tiempo independientemente de otros factores ambientales. Sin embargo, los cultivos sometidos a bajas concentraciones de oxígeno crecían a tasas muy bajas.

Esto parece estar de acuerdo con lo que se ha observado en otros invertebrados (p.e. De Zwaan y Wijsman, 1976; Gäde, 1984; Hochachka, 1986) en los que el principal efecto inducido por la baja disponibilidad de oxígeno consiste en un descenso de la tasa metabólica. La disminución paulatina de oxígeno disminuye el crecimiento incrementando el tiempo de supervivencia de la población y esto podría constituir un mecanismo de regulación, que sería una consecuencia de las bajas tasas metabólicas individuales. Así, en uno de los casos estudiados (Experiencia 1, población B) en el cual la población de *Brachionus plicatilis* alcanza altos valores, la población muere inmediatamente después del periodo de crecimiento incontrolado, mientras que en otros casos las poblaciones que no alcanzan densidades tan elevadas se mantienen por más tiempo. La disminución de las demandas energéticas en periodos de baja disponibilidad de oxígeno también podría verse confirmada por los resultados de Reale *et al.* (1993) en los que se demuestra que a bajas concentraciones de oxígeno se produce un descenso de la velocidad natatoria y un aumento de la sinuosidad de *Brachionus plicatilis*. La disminución del movimiento como una forma de ahorrar energía durante periodos de escasez energética es consecuente con el elevado costo atribuible a la locomoción en *Brachionus plicatilis* ya que se ha demostrado que los rotíferos gastan una importante proporción de energía metabólica en locomoción, o en movimiento de los cilios (> 60%; Epp y Lewis, 1980; 1984). Esto es probablemente debido a que la locomoción mediante cilios es un mecanismo insuficiente para organismos de gran tamaño como los rotíferos. Sin embargo el movimiento ciliar no sólo sirve para la locomoción, sino que también resulta ser el mecanismo empleado en la filtración del alimento. Así pues, disminuyendo el movimiento gastan menos energía pero también reducen las tasas de alimentación. En este sentido, Luciani (1982) describió que las hembras más viejas nadan más lentamente y sus recorridos son más sinuosos debido a la disminución de ATP.

Por otra parte nuestros resultados también demuestran una disminución del gasto energético atribuible a la reproducción. En este sentido, la producción total de huevos por hembra en la Experiencia 2 presenta un incremento con respecto a los valores obtenidos en la Experiencia 1, en la que los recursos son un factor limitante. Además respecto a la producción de huevos durables, también se obtienen mayores valores, lo cual puede ser debido al efecto conjunto de una mayor densidad poblacional y de mayores recursos (Snell y Garman, 1986; Pourriot y Snell, 1983; Gilbert, 1980). Respecto a la tasa de mixis a 25°C y 12 g/l de salinidad para la cepa CU se han obtenido valores del 64% (Serra, 1987), en nuestro caso los valores más altos obtenidos

son inferiores a dicho valor, sin embargo es difícil el intentar comparar ambas tasas, puesto que en nuestro caso nos encontramos con ciertas limitaciones como son el empleo de alimento tratado, la limitación de alimento en algunos casos y en otros las limitaciones de oxígeno. En el caso en el que el alimento no fue limitante y las condiciones de oxigenación fueron más altas es cuando detectamos la mayor tasa (Experiencia 2; Matraz A) que es siempre inferior a la detectada por Serra (1987) y que podría estar relacionada de alguna manera con la limitación de oxígeno. Además en la experiencia de Serra (1987) se obtiene una tasa de crecimiento de 0.68 que se encuentra bastante cercana a las obtenidas en esta experiencia.

Finalmente, el número integrado de rotíferos a través del tiempo en diferentes condiciones sugiere que en bajas concentraciones de oxígeno se realiza un uso de los recursos menos eficiente, probablemente, se disminuya el posible reciclaje de la materia orgánica del alimento y la procedente de los propios rotíferos, así como la producción de biomasa bacteriana.

En conclusión, *Brachionus plicatilis* puede mantener tasas metabólicas reducidas en condiciones microaerofílicas. Sin embargo el reemplazamiento individual ocurre a tasas muy bajas debido a una escasa reproducción y presumiblemente a unos tiempos de generación extremadamente largos. Además esta especie podría activar rutas metabólicas fermentativas, reduciendo así los requerimientos de oxígeno, pero también reduciendo la eficiencia energética.

5. ADAPTACIONES BIOQUÍMICAS DE LOS ANIMALES A CONDICIONES LIMITANTES DE OXÍGENO

Hace aproximadamente 3800 millones de años, cuando surgieron las primeras formas de vida, las condiciones físico-químicas de la biosfera eran muy diferentes de las actuales. El ambiente era anóxico, con unas elevadas temperaturas producidas en parte por la actividad interna de la Tierra y en parte por la acción directa de la radiación solar sobre la superficie del planeta. Posteriormente, con la aparición de los organismos fotosintéticos, fue aumentando la concentración de oxígeno atmosférico. Partiendo de una situación anóxica, el nivel de oxígeno había alcanzado un siete por cien de su nivel actual cuando aparecieron los primeros metazoos, y llegó a mediados del Paleozoico, a unos valores muy similares a los actuales (Could, 1983). Por ello, el mundo animal se encuentra primariamente adaptado a las condiciones oxidantes del medio, presentando mecanismos para resistir la oxidación de sus estructuras químicas y un metabolismo para la obtención de energía basado en el uso del oxígeno para la oxidación de moléculas ricas en energía: el metabolismo aeróbico. Pero el suministro de oxígeno generalmente está sujeto a variaciones. Bien sea por causas biológicas o ambientales, lo cierto es que en la mayoría de los organismos se pueden dar condiciones limitantes de oxígeno. Pequeños fallos en el suministro de oxígeno imposibilitan el uso inmediato del metabolismo respiratorio aerobio y ello podría ser extremadamente peligroso para organismos absolutamente dependientes del oxígeno. Por ello, los metazoos presentan adaptaciones a bajos niveles de oxígeno las cuales permiten su supervivencia durante episodios de carestía de este gas o bien les permiten colonizar ambientes subexplotados; se trata del metabolismo anaeróbico fermentativo.

Es posible extraer la máxima cantidad de energía de una molécula orgánica reducida, sea carbohidrato, lípido o proteína, si se oxida hasta CO_2 y H_2O . Ésto se puede conseguir de varias maneras. Una forma de conseguirlo en ausencia de oxígeno es utilizar el nitrato como aceptor de electrones, de forma que en función de este sustrato tenemos dos tipos de respiración, en una el nitrato es reducido hasta nitrógeno atmosférico (organismos desnitrificantes; $\Delta G'_o = -638 \text{ kcal}$) mientras que en la otra, el nitrato es reducido a nitrito ($\Delta G'_o = -422 \text{ kcal}$) ambas constituyen un proceso análogo al de respiración, aunque en el último caso la energía libre de Gibbs liberada es un 39% inferior a la del proceso aeróbico; es decir, está a medio camino entre el proceso aeróbico y la fermentación. Estas estrategias parecen ser exclusivas de grupos de procariotas

(véase Stanier *et al.*, 1986), sin embargo la reducción de nitratos a nitritos se ha descrito también en ciliados (Finlay, 1983), aunque probablemente sea debido a que dichos ciliados tenían bacterias reductoras de nitratos a nitritos en simbiosis. También ha sido descrita, en bacterias reductoras del sulfato, una ruta de sulfato reducción para la oxidación de compuestos orgánicos en capas reducidas de sedimentos bentónicos. En animales dicha ruta se ha relacionado con turbelarios y gastroticos que presentan adaptaciones a la desintoxicación de sulfídrico y enzimas pertenecientes al metabolismo del sulfato y del sulfídrico (Powell *et al.*, 1980), sin embargo, lo más probable es que sea exclusiva de las bacterias y que su relación con animales invertebrados inferiores sea debida a sus asociaciones con bacterias, ya que ambos organismos coexisten en estos ambientes, describiéndose en pogonóforos de dorsales oceánicas bacterias del azufre endosimbiontes (Hochanchka y Somero, 1984). El proceso de la sulfato reducción, en principio es bastante similar a las respiraciones dependientes del oxígeno y del nitrógeno. Sin embargo, la reducción del sulfato es llevada a cabo por organismos anaerobios estrictos, mientras que la nitrato reducción podría ser llevada a cabo también por organismos microaerofilos. Otro tipo de metabolismo anaeróbico consiste en la reducción del dióxido de carbono a metano (metanogénesis), dicha estrategia es típica de bacterias metanogénicas, aunque también se ha descrito la existencia de ciliados con bacterias metanogénicas en simbiosis (Finlay *et al.*, 1991).

Las vías descritas en metazoos para la obtención de energía en ausencia de oxígeno son solo las vías fermentativas, las cuales no llevan a una oxidación completa de la glucosa. El principal problema de las vías fermentativas queda patente cuando se compara su eficiencia metabólica con el de las vías aeróbicas. Así, tomando como referencia la fermentación láctica, una de la más comunes (Lenhninger 1978), se comprueba que sólo se producen 2 moles de ATP por mol de glucosa, frente a los 36 moles de ATP que se producen mediante el metabolismo oxidativo. Por esta razón el consumo de glucosa en los tejidos con carestía de oxígeno tendría que incrementarse si la demanda de ATP permanece inalterable; a este efecto se le ha denominado efecto Pasteur. Este efecto sorprendentemente, no se observa, con sus totales consecuencias, durante condiciones de anoxia en algunos animales anaerobios facultativos. Así, por ejemplo, el glucógeno del hígado en ciertos peces tolerantes a la anoxia no es totalmente consumido después de periodos extremos de anoxia (Hochachka y Somero, 1984). También en moluscos, los depósitos de glucógeno sólo son consumidos parcialmente después de varios días de anoxia (De Zwaan y Wijsman, 1976). Es evidente que, incluso si se movilizan las reservas de glucógeno

durante la anoxia, se evita la eliminación masiva y rápida de glucosa. Según Hochachka y Somero (1984) ello se puede conseguir al menos por tres mecanismos: 1) Almacenando más glucógeno endógeno en diversos tejidos además de en la reserva central del hígado; 2) Utilizando diversos tipos de fermentaciones; 3) Reduciendo las tasas metabólicas.

El almacenamiento de glucógeno endógeno en otros tejidos ha sido descrito por ejemplo en las branquias y músculos de *Mytilus* (De Zwaan y Wijsman, 1976), en músculos de peces y en diversos tejidos de muchos animales; sin embargo, dicha estrategia puede prolongar la tolerancia a la hipoxia en menor medida que las otras dos (Hochachka, 1986). Es por ello que la mayoría de los trabajos revisados aquí se centran en el estudio de los mecanismos de reducción de las tasas metabólicas y de la utilización de fermentaciones eficientes, como las principales formas de respuesta a condiciones extremas de límite en el suministro de oxígeno.

Las rutas de fermentación más importantes surgen a partir de la glucólisis y glucogenolisis. Estas rutas se han estudiado en diversos grupos de animales y como resultado de dichos estudios se ha constatado la diversidad de vías que se pueden presentar, así como su complejidad, en el conjunto de los organismos animales. Una idea de dicha diversidad y complejidad se puede observar en la información presentada en el Apéndice F, en dónde se recopilan por orden del año de publicación las principales observaciones referentes al metabolismo en ausencia o deficiencia de oxígeno de un gran número de metazoos pertenecientes a los grupos de Antozoos, Nematodos, Moluscos, Anélidos, Arácnidos, Crustáceos, Insectos, Peces, Anuros y Reptiles, así como de algunos protozoos. La información presentada hace referencia principalmente a los principales enzimas y metabolitos relacionados con la tolerancia a la anoxia. Evidentemente la información no es exhaustiva, sin embargo, representa una buena muestra de las principales adaptaciones metabólicas a la carencia de oxígeno.

A continuación se revisan las vías más generales, las cuales permiten entrever los principios que presiden la bioquímica de la adaptación a la carencia de oxígeno. Un resumen de dichas vías se presenta en la tabla 5.1. No obstante esta tabla supone una gran simplificación y hay que observar que no es sencillo asignar un metabolismo anaeróbico concreto a cada una de estas vías, ya que en la mayoría de los casos se emplean combinaciones de las mismas, de forma que los principales productos finales pueden ser formados por diversas rutas o combinaciones de ellas. Así pues, la mayoría de los autores no hacen distinciones precisas entre ellas, aunque Livingstone (1983) haciendo un esfuerzo de sistematización las clasifica en cuatro rutas

principales (figura 5.1): I) ruta del lactato (ruta 1; tabla 5.1), II) ruta de las opinas (ruta 2; tabla 5.1), III) ruta de la glucosa-succinato (ruta 3; tabla 5.1), y IV) ruta del aspartato-succinato (ruta 5; tabla 5.1). Cada una de las cuales a su vez puede incluir otras secundarias.

La ruta del lactato (I) es la ruta anaeróbica mejor estudiada, su eficiencia energética es baja (2 ATP por mol de glucosa) comparada con el ciclo de Krebs, pero la tasa de producción de energía puede ser incrementada aumentando el flujo glucolítico.

La ruta de las opinas (II) es similar a la del lactato pero difiere en la reacción final, de forma que la reducción del piruvato es reemplazada por una condensación reductiva con un α -aminoácido para formar un iminoácido llamado genéricamente opina (opinas: alanopina, lisopina, octopina, estrombina, tauropina). Dicha condensación es catalizada por enzimas distintos a la lactato-deshidrogenasa con actividad piruvato reductasa, llamados opinas-deshidrogenasas (alanopina-deshidrogenasa, octopina-deshidrogenasa, estrombina-deshidrogenasa y tauropina-deshidrogenasa). Todos estos enzimas cumplen una función muy importante en el mantenimiento del nivel redox citosólico en algunos invertebrados sometidos a condiciones de anaerobiosis, principalmente moluscos (Wiseman y Ellington, 1977; Gäde, 1988). La ruta de las opinas es funcionalmente análoga a la del lactato en cuanto a su eficiencia energética (2 moles de ATP por mol de glucosa) pero las máximas tasas de producción de energía que se pueden conseguir por unidad de tiempo son menores, al menos en el caso de la alanopina y la estrombina (Livingstone, 1983). Una diferencia importante entre ambas vías es que mientras que la vía del lactato se encuentra limitada exclusivamente por la reserva de glucógeno, la vía de las opinas se encuentra limitada también por la de aminoácidos, en concreto por el aminoácido específico de cada condensación, el cual puede estar implicado en otras actividades metabólicas. Una tercera diferencia importante entre ambas vías es que el producto formado en esta última es menos ácido que el ácido láctico.

En moluscos se dan comúnmente estas dos primeras vías (I y II) y han sido extensamente estudiadas agrupándose frecuentemente en una sola llamada ruta del pirúvico que conduce a la formación de lactato, octopina, estrombina, alanopina, tauropina y alanina. Incluso a veces dentro de esa denominación más general de ruta del pirúvico se incluyen las rutas 9 y 10 (tabla 5.1), que producen acetato y ethanol (Gäde y Grieshaber, 1986; Gäde, 1988).

Tabla 5.1. Principales rutas fermentativas utilizadas por los metazoos con indicación de su eficiencia energética (datos tomados de Hochachka y Somero, 1984).

Número	Sustrato	Productos finales	Eficiencia
1	glucosa	lactato (fermentación láctica)	2 moles ATP/mol glucosa
2	glucosa	octopina, lisopina, alanopina o estrombina	2 moles ATP/mol glucosa
3	glucosa	succinato	4 moles ATP/mol glucosa
4	glucosa	propionato	6 moles ATP/mol glucosa
5	aspartato	succinato	1 mol ATP/mol aspartato
6	aspartato	propionato	2 moles ATP/mol aspartato
7	glutamato	succinato	1 mol ATP/mol glutamato
8	glutamato	propionato	2 moles ATP/mol glutamato
9	glucosa	acetato	4 moles ATP/mol glucosa
10	glucosa	ethanol	2 moles ATP/mol glucosa
11	aminoácidos de cadenas ramificadas	ácidos grasos volátiles	1 mol ATP/mol sustrato

Las rutas 2-5 han sido descritas en varios moluscos bivalvos (Collicut y Hochachka, 1977; Holwerda y De Zwaan, 1980; Koormann y Grieshaber, 1980; Ho y Zubkoff, 1982; Gäde, 1988; Isani *et al.*, 1989). Las rutas 2 a 6, 9 y 11 a menudo son utilizadas por nematodos y anélidos (Saz y Vidrine, 1959; Surholt, 1977; Umezurike y Anya, 1978; Warren y Dales, 1980; Hoffmann, 1981; Schöttler y Wienhausen, 1981; Schöttler *et al.*, 1984; Siegmund *et al.*, 1985). Las rutas 6, 7 y 8 son teóricamente posibles en moluscos bivalvos pero no parecen ser utilizadas significativamente (Hochachka y Mustafa, 1972). La ruta 10 ha sido descrita en larvas de quironómidos (Wilps y Schöttler, 1980) y la 3 también ha sido descrita en crustáceos (Zebe, 1982).

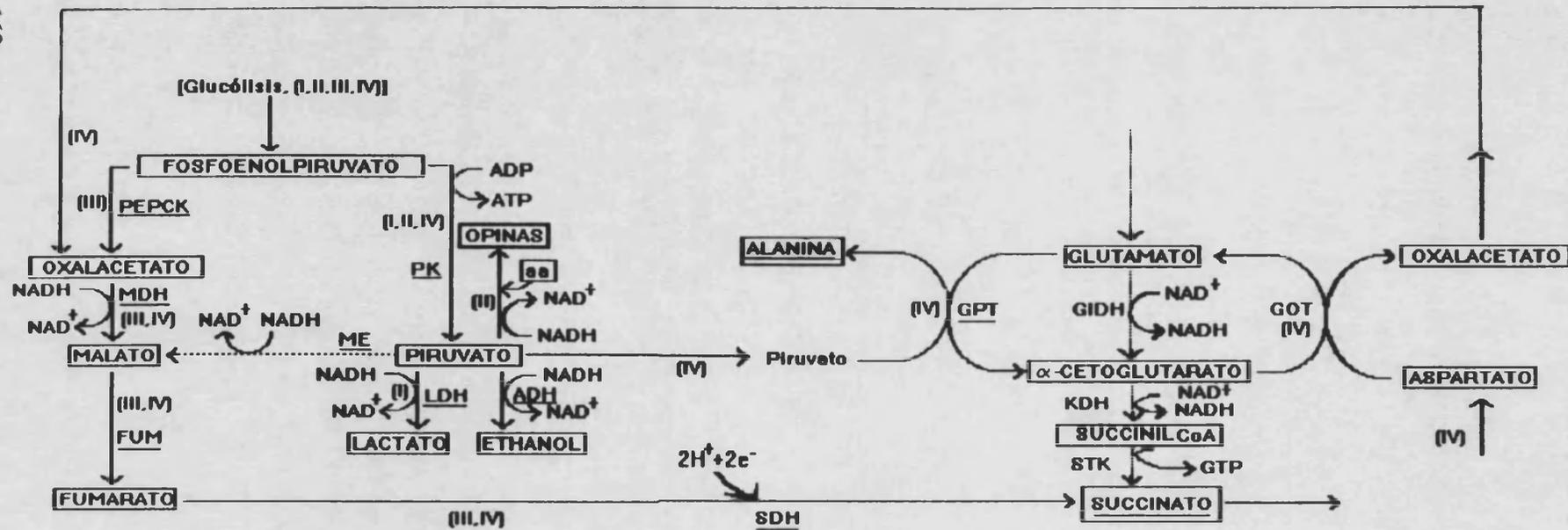


Figura 5.1. Rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo del fosfoenolpiruvato (PEP). Los números romanos entre paréntesis indican la pertenencia de los pasos metabólicos a las cuatro vías principales que se pueden distinguir atendiendo a la clasificación de Livingstone (1983). (I) Vía del lactato (producto final: lactato); (II) vía de las opinas (producto final: opinas); (III) vía de la glucosa-succinato (producto final: succinato); (IV) vía del aspartato-succinato (productos finales: succinato y alanina). Otras etapas y productos finales son también posibles (Hochachka y Mustafa, 1972). **PEPCK**, fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa; **PK**, piruvato-quinasa; **MDH**, malato-deshidrogenasa; **LDH**, lactato-deshidrogenasa; **ADH**, alcohol-deshidrogenasa; **GTP**, alanina-aminotransferasa; **ME**, enzima málico; **FUM**, fumarasa; **SDH**, succinato-deshidrogenasa; **KDH**, α-cetoglutarato-deshidrogenasa; **STK**, succínico-deshidrogenasa; **GOT**, aspartato-transaminasa; **GIDH**, glutamato-deshidrogenasa; **aa**, aminoácidos. Nota: las actividades enzimáticas y productos determinados en este trabajo se encuentran subrayados (véase el Capítulo 6).

La vía de la glucosa-succinato (III) se diferencia de las dos anteriores, correspondientes a la ruta del pirúvico, en que el fosfoenolpiruvato proveniente de la degradación glucolítica es carboxilado mediante el enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK) rindiendo oxalacetato, el cual puede ser metabolizado posteriormente a succinato y éste a propiónico o a otros ácidos grasos volátiles (rutas 3 y 4 tabla 5.1). Esta vía implica al fumarato como aceptor electrónico, y su eficiencia energética es dos veces mayor que la del lactato y la de las opinas. Se trataría pues de una ruta capaz de permitir resistir a los organismos periodos largos de tiempo en ambientes anóxicos (Livingstone, 1983). Esta ruta ha sido descrita en moluscos, helmintos y nematodos parásitos (Saz, 1981; Livingstone, 1983; Hochachka y Somero, 1984)

La vía del aspartato-succinato (IV) es similar a la de la glucosa-succinato (III), lo cual ha hecho que muchos autores la hayan descrito como parte de la misma ruta denominándola ruta del oxalacetato (p.e., Isani *et al.*, 1989). Además, respecto a esta ruta existe una gran confusión en los trabajos revisados, ya que en la mayoría de los estudios solamente se miden productos finales, sin discriminar entre las vías III y IV. En la vía del aspartato-succinato el succinato es también suministrado a partir de la reducción del oxalacetato pero la ruta difiere en que el oxalacetato no es producido por la carboxilación del fosfoenolpiruvato, sino que proviene del aspartato mediante una reacción de transaminación (Collicut y Hochachka, 1977). Esta vía requiere piruvato y NADH, y produce alanina y succinato, de forma que el aspartato parece proveer el esqueleto carbonado para el succinato, mientras que la alanina derivaría de la glucosa. Además, a su vez el succinato puede ser metabolizado a propionato (ruta 6, tabla 5.1). A menudo dentro de la ruta del aspartato-succinato son a su vez posibles las rutas 7 y 8 (tabla 5.1), aunque generalmente no suelen ser discriminadas como tales, ya que en la mayoría de los estudios se miden productos finales.

Se ha descrito para algunos organismos la combinación de varias vías según el tiempo de inicio y la duración de su incursión y permanencia en condiciones anóxicas. La ruta del aspartato-succinato ha sido descrita como más importante durante las primeras etapas de anaerobiosis antes de que entre en juego la ruta de la glucosa-succinato (Isani *et al.*, 1989; Ho y Zubkoff, 1982). Se ha puesto en evidencia que en el grupo de los moluscos, durante las primeras horas de anoxia, la fermentación de la glucosa está acoplada con el consumo de aspartato. Durante estas primeras etapas, la reserva de aspartato es consumida y la posterior producción de succinato depende por completo del flujo glucolítico (vía III). Esta transición implica la

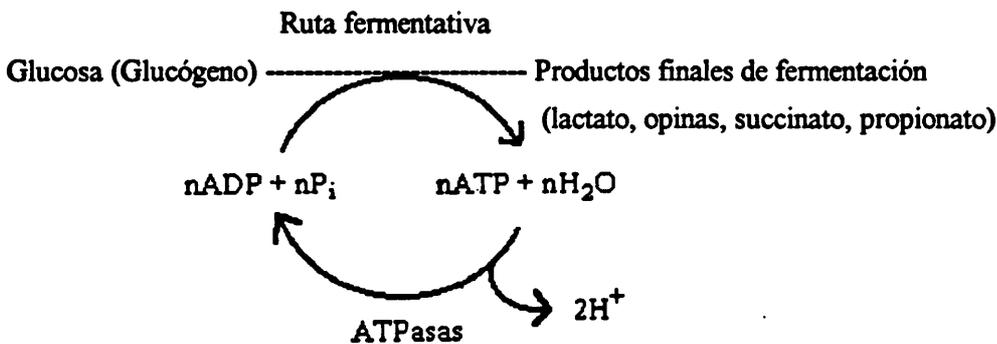
activación del enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK), el cual controla el paso inicial de la ruta de la glucosa-succinato. Una transición similar pero implicando a las vías I y III ha sido descrita en oligoquetos (*Tubifex sp.*, Hoffman, 1981), ya que estos organismos acumulan lactato en cortos periodos de anoxia y succinato en periodos prolongados.

Dada la red de vías que pueden combinarse en rutas específicas, realizar una estimación de la eficiencia energética de la glucólisis anaeróbica es complicado. Además, tal y como se ha señalado, puede ocurrir que en un mismo organismo entren en juego diferentes rutas dependiendo del tiempo de permanencia en anoxia. En cualquier caso, el ATP producido siempre es inferior al producido en condiciones aeróbicas. Es más, cualquier animal que emplea fermentaciones tiene una eficiencia en la producción de ATP que oscila entre la mitad y una cuarta parte de la que presentaría mediante la respiración aeróbica. Si no se manifiesta el efecto Pasteur, la alternativa para minimizar las demandas anaeróbicas de glucosa consiste en reducir la tasa metabólica, reduciendo con ello la demanda de ATP durante la anoxia. Esto ha sido estudiado en algunos vertebrados tales como determinados peces tolerantes a la anoxia y tortugas. Así, por ejemplo, se ha descrito que ciertos peces del género *Carassius*, a bajas temperaturas, son capaces de sobrevivir varios días en anoxia total. Se ha podido comprobar que si la tasa metabólica se mantiene, el animal puede sobrevivir de la glucosa derivada del glucógeno del hígado durante 2.2 días en anoxia, mientras que si la tasa metabólica se reduce 5 veces, aquel mismo suministro de energía puede mantener al pez durante aproximadamente 11 días de anoxia (Hochachka y Somero, 1984). La misma estrategia basada en reducir las demandas de glucosa en anaerobiosis, reduciendo la tasa metabólica, es también utilizada por moluscos bivalvos (Zwann y Wijsman, 1976). La reducción de la tasa metabólica, al menos en principio, parece ser la estrategia más general, ya que el funcionamiento de determinadas rutas de fermentación se encuentra filogenéticamente restringido, es decir, ciertas rutas son propias de determinados grupos taxonómicos y no ocurren en otros (Hochachka, 1986).

Aparte de las consideraciones energéticas, otra característica importante a tener en cuenta es que la tolerancia a la anoxia se encuentra limitada por la acumulación excesiva de productos finales de los procesos anaeróbicos que pueden resultar perjudiciales. Los principales problemas potenciales de esta acumulación son alteraciones en el pH por acumulación de protones, alteraciones osmóticas y alteraciones metabólicas debidas a efectos inhibitorios de los productos finales. De estos problemas, el de la acidificación es el más importante (Hochachka y Somero,

1984). El análisis del problema de la acumulación de protones es complicado ya que requiere evaluar los lugares metabólicos de producción de protones, las rutas para eliminar dichos protones y la estequiometría protónica de las diferentes rutas fermentativas. El principal sumidero de la cantidad excesiva de protones es la fosforilación oxidativa; de hecho, existe un balance entre las tasas de producción y eliminación de protones durante la resíntesis de ATP y reoxidación de componentes del sistema de transporte de electrones. Gracias a este balance, el pH permanece estable durante el metabolismo aeróbico. Sin embargo, durante la fermentación se produce una acumulación neta de protones. Es importante señalar, tal y como lo hacen Hochachka y Somero (1984) que el balance de protones durante las fermentaciones de hidratos de carbono por la vía láctica ó la de las opinas, con producción de ATP, varía con el sustrato, ya que, si por ejemplo, se parte de glucógeno y no de glucosa, existe un consumo de H^+ en las etapas iniciales a pH alrededor de la neutralidad; también influye el pH, aumentando la producción de protones a valores bajos de pH; así como la concentración de iones Mg^{+2} en el medio, que influye aumentando la producción de protones por mol de glucosa fermentada cuando el ATP está en forma de complejo Mg-ATP. Y por último también influye el producto final de la fermentación. Sin embargo, por la vía de la formación de succinato y propionato la estequiometría protónica es diferente. Durante la fermentación de la glucosa a propionato las reacciones consumen H^+ , a pH cerca de la neutralidad un mol de H^+ es consumido por mol de glucosa fermentada y a pH mayores (esperables en poiquilotermos a baja temperatura) el consumo de H^+ es todavía mayor. Si se parte de glucógeno se consume todavía más. Solo en el caso de valores de pH menores de 6.5 la fermentación de glucógeno a propionato produce H^+ (Hochachka y Somero, 1984). El aumento de H^+ y la acidosis observadas deriva fundamentalmente de la hidrólisis de ATP. El ATP, tanto si se ha generado fermentativamente como por metabolismo aeróbico, se hidroliza, mediante la catalización de las ATPasas, a ADP, P_i (fósforo inorgánico) y H^+ para proporcionar energía a las varias funciones y actividades celulares. La hidrólisis de ATP produce protones en una cantidad dependiente del pH (mayor producción a mayor pH, al contrario de lo que sucedía en la glucólisis) y de la concentración de Mg^{+2} . Obviamente, el balance de la hidrólisis del ATP producido en una vía fermentativa también dependerá del número de moléculas de ATP formadas, el cual vendrá determinado por la vía fermentativa que se emplee; esto es, por el producto de partida -p.e., glucosa o glucógeno- y por el producto final. Debido a los efectos opuestos del pH en la producción de H^+ por la

glucólisis o su producción por hidrólisis, el resultado sorprendente es que el balance global de hidrogeniones de las fermentaciones, es prácticamente invariante para las diferentes vías, valor de pH, y concentración de Mg^{2+} ; siempre que estos dos últimos factores tengan los mismos valores en los lugares de formación y de hidrólisis del ATP se producirán 2 protones por unidad de glucosa fermentada, con pocas excepciones (Hochachka y Mommsen, 1983).



Resumiendo, en el proceso aeróbico todos los productos de la hidrólisis del ATP son utilizados durante la fosforilación oxidativa. En cambio esto no es así en las fermentaciones y en cualquiera de las vías hasta ahora conocidas el resultado final es siempre de $2H^+$ por mol o por unidad glucosídica fermentada.

Esto no quiere decir que las diferentes vías fermentativas sean exactamente equivalentes en cuanto a la acidificación, ya que el costo en acidificación por molécula de ATP formada y reutilizada sí que es variable; por ejemplo, en el paso de la glucosa a lactato, la tasa de acidificación es de 1 mol de H^+ por mol de ATP, mientras que dicha tasa es de 0.3 para la fermentación de la glucosa a propionato (Hochachka y Somero, 1984).

El análisis del metabolismo de los organismos anaerobios facultativos revela que al menos son posibles cuatro mecanismos para minimizar el alcance de la acidosis: 1) Reducir la tasa de acumulación de productos finales deprimiendo la tasa metabólica durante la anoxia y con ello la demanda de ATP; 2) Tolerar altas acumulaciones de productos finales manteniendo altas capacidades tamponadoras en los medios inter e intracelulares, o poseer enzimas cuya función no se vea afectada por la acidosis; 3) Minimizar la acumulación de productos finales anaeróbicos metabolizándolos a otros productos o por su excreción; 4) Utilizar rutas con reacciones consumidoras de H^+ (Hochachka, 1986). Sin embargo, estas soluciones no excluyen otras

posibilidades.

De nuevo, la reducción de las tasas metabólicas surge como una de las estrategias adecuadas para la vida en condiciones anóxicas o microaerófilas, lo que convierte a dicha estrategia en una de las más probables ya que soluciona varios problemas a la vez, es decir reduce el consumo de glucosa y además minimiza los problemas de la acidificación.

Recientemente se han realizado algunos intentos para explicar la diversidad del metabolismo energético en términos de potencia y economía (P vs E) (Gnaiger, 1987). Se han distinguido dos tipos de estrategias, la estrategia de la potencia (p-estrategia), la cual consiste en utilizar la máxima cantidad de energía posible por unidad de tiempo para un crecimiento o trabajo rápidos y la de la economía (e-estrategia) consistente en utilizar los recursos lo más eficientemente posible a una tasa baja. Máxima potencia y máxima eficiencia se contraponen por razones termodinámicas, ya que las máximas eficiencias de un sistema se consiguen aproximando los procesos a la reversibilidad, y por lo tanto haciéndolos lentos, lo que comporta una pérdida de potencia. Esta contraposición, digamos esencial, queda ejemplificada significativamente en la estrategia bioquímica para la vida en anoxia. Durante periodos de fuerte actividad o de estrés, en que los animales no cubren sus necesidades con la respiración aeróbica normal, el trabajo muscular es alimentado energéticamente por la vía del lactato y de las opinas y el lactato en invertebrados, las cuales tienen dos características en común (1) se emplean cuando la demanda de ATP es elevada y (2) son vías en las que se obtiene la menor producción de ATP por unidad de sustrato, pero la mayor tasa de renovación de ATP por unidad de tiempo. No se utilizan sin embargo, las vías del succinato, propionato y acetato con altos rendimientos de ATP, ya que no resultan adecuadas por proporcionar una potencia moderada. Esto explica por qué incluso invertebrados que tienen la capacidad de realizar vías de alta eficiencia, pero a bajas tasas de renovación, utilizan la vía del lactato, menos eficiente, para potenciar el trabajo muscular (Gnaiger, 1983; 1987). Es decir, en el caso de anoxia fisiológica o de cortos periodos de anoxia ambiental, a los animales les resulta más rentable utilizar las vías del pirúvico, pero en casos de largos periodos de anoxia ambiental, las vías más eficientes del succinato, propionato y acetato son mucho más adecuadas para la supervivencia.

6. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE *BRACHIONUS PLICATILIS*

6.1 INTRODUCCIÓN

La tolerancia de *Brachionus plicatilis* a concentraciones de oxígeno muy bajas ha sido comprobada experimentalmente tal y como se ha descrito en el Capítulo 4 del presente trabajo, habiéndose observado una reducción de las tasas de crecimiento para valores bajos de oxígeno. Esto es consistente con la estrategia de reducción de la tasa metabólica comentada en el capítulo introductorio anterior (capítulo 5) que es una estrategia general para evitar los efectos de condiciones ambientales adversas, tales como bajas concentraciones de oxígeno, bajas temperaturas o condiciones de desecación (Hochachka y Somero, 1984; Storey y Storey, 1990). Además también puede interpretarse como una consecuencia de las bajas eficiencias energéticas asociadas al metabolismo fermentativo, tal y como se ha expuesto ampliamente también en el mismo capítulo 5.

En las experiencias anteriores pues hemos comprobado que *Brachionus plicatilis* es capaz de soportar bajas concentraciones de oxígeno durante periodos prolongados de tiempo. No obstante, queda por determinar cuales son los mecanismos fisiológicos que les permiten sobrevivir en tales condiciones. Así pues, nuestra intención en esta parte del trabajo consiste en esbozar una caracterización preliminar de las rutas metabólicas implicadas en la tolerancia de *Brachionus plicatilis* a bajos niveles de oxígeno, para lo cual se han determinado las actividades de los principales enzimas descritos en otros organismos que toleran condiciones microaerófilas, así como también algunos productos finales de las rutas energéticas mitocondriales.

6.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Los cultivos de rotíferos empleados para los análisis enzimáticos provienen de los cultivos de mantenimiento descritos anteriormente. Se trata de individuos de la especie *Brachionus plicatilis* (Clon CU) alimentados con el alga *Tetraselmis sp.* (0.8×10^6 cel/ml), tratada térmicamente (65-70°C. durante 90 min), cultivados con iluminación constante (PAR aprox. 35

$\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) y a una temperatura de 25°C.

La temperatura experimental es adecuada para estudios metabólicos, según los estudios realizados por Epp y Lewis (1980) sobre la respuesta metabólica al cambio de temperatura en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Estos autores determinaron el metabolismo por medio de la medida del consumo de oxígeno y calcularon el Q_{10} en un rango de temperaturas comprendido entre 15-32°C a intervalos de 2°C, encontrando que en el rango de los 20 a 28°C la población mantiene una tasa metabólica constante.

Se determinaron 10 actividades enzimáticas a diferentes concentraciones de oxígeno (tablas 6.1 y 6.2). Los enzimas escogidos para este estudio fueron: alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1); lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27); piruvato-quinasa (EC 2.7.1.40); fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (EC 4.1.1.32); malato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.37); alanina-aminotransferasa (EC 2.6.1.2); enzima málico (EC 1.1.1.39); alanina-deshidrogenasa (EC 1.4.1.1); fumarasa, (EC 4.2.1.2); y succinato-deshidrogenasa, (EC 1.3.99.1). También se determinó la concentración de los metabolitos alanina y succinato. A pesar de que el enzima alanina-deshidrogenasa no ha sido descrito en animales, se decidió incluirlo debido a que algunos autores (Ho y Zubkoff, 1982; Zwaan y Marrewijk, 1973) sugieren que su presencia debería ser examinada.

Las experiencias se llevaron a cabo transfiriendo 400 ml (para los ensayos de alcohol-deshidrogenasa, lactato-deshidrogenasa, piruvato-quinasa, fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, malato-deshidrogenasa, y alanina-aminotransferasa) y 800 ml (para los ensayos de enzima málico, fumarasa, alanina-deshidrogenasa, alanina y succinato) de un cultivo de rotíferos en fase exponencial alimentado inicialmente con una concentración de 0.8×10^6 cel/ml de *Tetraselmis sp.* tratadas térmicamente. Todos los cultivos se realizaron en matraces de tres bocas y la densidad de población, así como la concentración de oxígeno de cada uno, fueron determinados diariamente mediante un electrodo Orión 97-08-99. Cuando era necesario se ajustaba el nivel de oxígeno mediante el influjo de N_2 al medio de cultivo cuando las concentraciones de oxígeno eran elevadas, o insuflando aire mediante una jeringa de 50 ml cuando dichas concentraciones eran excesivamente bajas. Estos datos se registran en el apéndice G. Todas estas operaciones se realizaban con el electrodo de oxígeno situado en el medio de cultivo visualizando así las concentraciones de oxígeno resultantes después del ajuste. Ocasionalmente, se realizaron medidas de pH de los cultivos.

A fin de minimizar la colonización bacteriana se añadieron dos antibióticos al medio de cultivo. Los antibióticos elegidos fueron sulfato de estreptomicina y clorhidrato de tetraciclina y las concentraciones empleadas fueron de 10 µg por mililitro de medio de cultivo en ambos casos. La elección del tipo y concentración de los antibióticos fue efectuada teniendo en cuenta los ensayos de Pourriot y Delucharzes (1970). Dichos autores evaluaron la acción de 12 antibióticos clásicos sobre las bacterias presentes en los cultivos de rotíferos y encontraron no sólo que la estreptomicina y la tetraciclina eran los más efectivos, sino que su combinación era más eficaz que el uso de ambos por separado. También encontraron que la penicilina, antibiótico usado recientemente para la obtención de cultivos axénicos (Plasota *et al.*, 1980), interfería en las medidas de oxígeno. Por otra parte, King y Snell (1978) también encontraban efectos negativos en el uso de la penicilina, la cual reducía la tasa reproductiva de *Asplanchna* a un tercio. Pourriot y Delucharzes (1970), asimismo, también evaluaron la influencia de la concentración de estos antibióticos (concentraciones de 10, 20, 50, y 100 ppm) sobre el consumo de oxígeno por los rotíferos. Sus resultados mostraron que el consumo de oxígeno no era afectado por la adición de estos antibióticos a las concentraciones ensayadas y que la menor de dichas concentraciones era suficiente para disminuir a la población bacteriana en una gran proporción.

Se realizó una extracción a partir de un cultivo distinto para la medida de cada uno de los enzimas y metabolitos indicados anteriormente y para cada concentración de oxígeno. Las extracciones se realizaron a diferentes concentraciones de oxígeno para estudiar la relación existente entre la actividad enzimática y la concentración de oxígeno. El procedimiento empleado para la concentración de los rotíferos y extracción de enzimas o metabolitos se esquematiza en la figura 6.1. Al objeto de retener los agregados algales que se forman en el cultivo, el contenido de los matraces era filtrado a través de una gasa. Posteriormente, se filtraba por una malla de nital de 30 µm de poro. Los rotíferos retenidos en dicha malla se depositaban en un vial Ependorff, se reuspendían en un mililitro de la solución tampón o de extracción específica del ensayo correspondiente (tabla 6.1 y 6.2) y se homogeneizaban sobre un baño con hielo mediante un sonicador Labsonic 2000 (punta Needle probe) aplicando 8 pulsos de 41W durante 15 segundos cada uno, separados por intervalos de 30 segundos. El número de pulsos necesarios para la ruptura de los organismos se estableció mediante observación de la muestra con un estereomicroscopio. Posteriormente, se tomaron partes alícuotas del extracto para la determinación de proteínas totales y para la determinación enzimática o metabólica

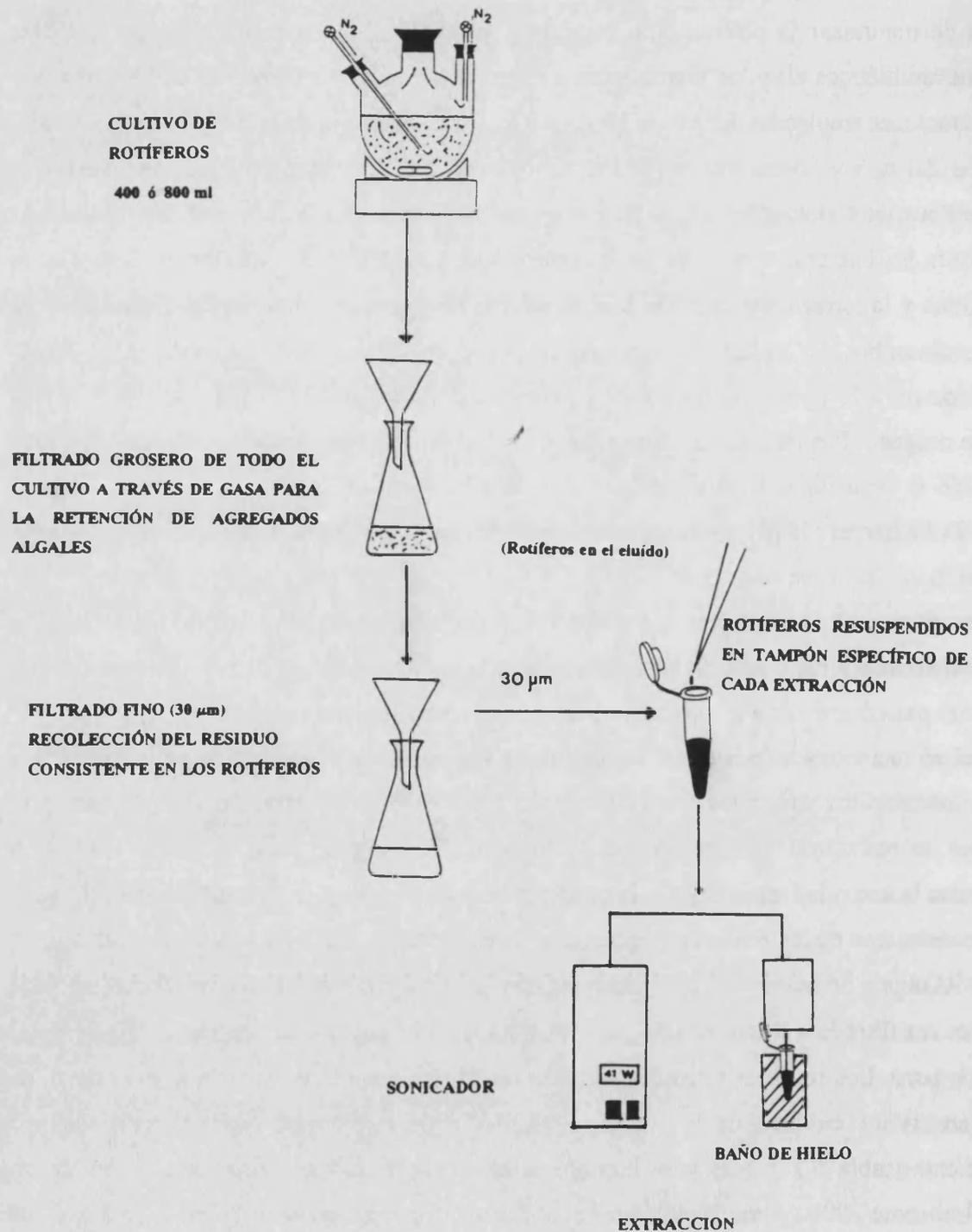


Figura 6.1. Procedimiento empleado en la concentración y extracción de las sustancias específicas de *Brachionus plicatilis* para la determinación de las actividades enzimáticas y de la concentración de metabolitos.

correspondiente.

Los métodos empleados en los ensayos enzimáticos y metabólicos se han resumido en las tablas 6.1 y 6.2 respectivamente, mostrándose en ellas detalladamente para cada uno de los enzimas o metabolitos estudiados los reactivos con sus correspondientes concentraciones empleados en los respectivos ensayos.

Con objeto de referir las determinaciones enzimáticas a una cierta biomasa, se determinó la concentración de proteínas en partes alícuotas de cada muestra, tomándose para ello varios volúmenes de muestra dentro del intervalo de 6 a 100 μ l, según el método de Bradford (1976). Los resultados se expresan en equivalentes de albúmina por comparación con una curva patrón efectuada con 0-15 μ g de BSA (0.5 mg/l) y 3 ml de Coomassie Brilliant Blue G. La concentración de BSA se comprobó mediante el coeficiente de extinción a 280/260 nm (método de Warburg y Chistian, en Dawson, 1969).

En el caso de la determinación de la actividad del enzima málico (EM), la solución de extracción empleada posee BSA en su composición, lo cual interfiere con la determinación de la concentración de proteínas totales utilizada. Por ello, el filtrado de rotíferos se dividió en dos porciones, las cuales fueron pesadas y destinadas una a la medida de proteínas y otra a la determinación enzimática. La primera fue resuspendida en 1 ml de tampón DEA (DEA, 0.1mol/l, pH 9.2 conteniendo 5 mmol/l de MgCl), mientras que la segunda porción fue resuspendida en un vial Ependorff conteniendo 1 ml de la solución de extracción, tal y como se indica en la tabla 6.1. Posteriormente ambas fueron homogeneizadas mediante sonicación y el cálculo de la cantidad de proteínas de la muestra dedicada a la determinación enzimática se extrapoló tomando los datos de proteínas por peso húmedo obtenidos en la primera porción.

En los ensayos de los metabolitos alanina y succinato, los homogeneizados fueron divididos en dos fracciones, una para la determinación de proteínas totales y otra para la determinación de metabolitos. Estas últimas fueron rápidamente desproteinizadas, según los métodos resumidos en la tabla 6.2. La determinación de proteínas totales se llevó a cabo con el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-7 conectado a un ordenador IBM modelo 5155. Cuando era necesario los reactivos fueron atemperados en un baño termostataado a temperatura constante y para la centrifugación se empleó una centrífuga Heraeus sepatech Biofuge-A. Para registrar los datos y calcular las

Tabla 6.1. Métodos y condiciones empleadas en las determinaciones de las actividades enzimáticas.

Alanina-aminotransferasa (L-Alanina: 2-oxoglutarato aminotransferasa EC 2.6.1.2)

Referencia: Horder y Rej, en Bergmeyer (1983).
Solución de extracción: Tampón Tris (Tris, 110 mmol/l; pH 7.3).

Solución de ensayo:

L-Alanina	500.00	mmol/l
Tampón Tris (pH 7.3)	100.00	mmol/l
NADH	0.18	mmol/l
Fosfato de piridoxal	0.11	mmol/l
2-Oxoglutarato	15.00	mmol/l
LDH	>1200.00	U/l
Muestra	100.00	μl
Volumen final	1.20	ml

Longitud de onda: 339 nm

L-Alanina-deshidrogenasa (L-Alanina: NAD⁺ oxidoreductasa (Desaminasa), (EC 1.4.1.1)

Referencia: Bergmeyer (1983), con pequeñas modificaciones.
Solución de extracción: Tampón Carbonato (50 mmol/l; pH 10.0).

Solución de ensayo:

Tampón carbonato (pH 10.0)	45.50	mmol/l
L-Alanina	15.00	mmol/l
NAD ⁺	0.42	mmol/l
Muestra	50.00	μl
Volumen final	1.10	ml

Longitud de onda: 339 nm

Tabla 6.1. Continuación.

Alcohol-deshidrogenasa (Alcohol: NAD⁺ oxidoreductasa EC 1.1.1.1)

Referencia: Bergmeyer (1983)

Solución de extracción: Tampón pirofosfato sódico (0.1 mol/l pH 9.0; conteniendo 1.67 mg/ml de glicina).

Solución de ensayo:

Tampón pirofosfato sódico (pH 9.0)	85.50	mmol/l
Glicina	19.10	mmol/l
Semicarbácida clorhidrato	6.20	mmol/l
Ethanol	0.60	mol/l
NAD ⁺	1.80	mmol/l
GSH	1.00	mmol/l
Muestra	100.00	μl
Volumen final	1.004	ml

Longitud de onda: 339 nm

Enzima Máfico (L-Malato: NAD⁺ oxidoreductasa (descarboxilasa) EC 1.1.1.39)

Referencia: Outlaw y Springer, en Bergmeyer (1983).

Solución de extracción: (Hepes, 50 mmol/l; pH 7.6; MnCl₂, 2 mmol/l; DTT, 10 mmol/l; BSA, 1% y PVP-40 1%).

Condiciones: Añadir 5 μl de Triton X-100, esperar 15 min, centrifugar a 12000 rpm 1 min, llevar a 25°C 30 min antes del ensayo.

Solución de ensayo:

Tampón Hepes (pH 7.6)	48.38	mmol/l
Ácido málico	4.03	mmol/l
NAD ⁺	1.61	mmol/l
EDTA	0.16	mmol/l
CoA	0.08	mmol/l
DTT	5.64	mmol/l
NADH	4.03	μmol/l
MDH-NADH	500.00	U/l
Muestra	200.00	μl
MnCl ₂	4.00	mmol/l
Volumen final	1.24	ml

Condiciones ensayo: Cubeta con todos los reactivos excepto MnCl₂, esperar 5 min antes de añadir MnCl₂

Longitud de onda: 339 nm

Tabla 6.1 Continuación

Fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (GTP: oxalacetato carboxilasa EC 4.1.1.32)

Referencia: Mustafa y Hochachka (1973).

Solución de extracción: Tampón Tris (Tris 0.01 M; pH 6.5; conteniendo EDTA, 2mM)

Solución de ensayo:

Tampón Trismaleato (pH 6.5)	100.00	mmol/l
SO ₄ Mn	2.50	mmol/l
KHCO ₃	20.00	mmol/l
PEP	2.00	mmol/l
IDP	0.40	mmol/l
NADH	0.14	mmol/l
MDH	5.00	U/ml
Muestra	30.00	μl
Volumen final	1.00	ml

Longitud de onda: 339 nm

Fumarasa (L-Malato hidro-liasa, EC 4.2.1.2)

Referencia: Stitt, en Bergmeyer (1983).

Solución de extracción: Tampón fosfato potásico (0.1 mol/l; pH 7.5).

Solución de ensayo:

Tampón fosfato (pH 7.5)	84.00	mmol/l
Malato	46.00	mmol/l
Muestra	120.00	μl
Volumen final	1.19	ml

Condiciones ensayo: Soluciones atemperadas a 30°C antes del ensayo.

Longitud de onda: 240 nm

Tabla 6.1 Continuación

Lactato-deshidrogenasa (L-Lactato: NAD oxidoreductasa EC 1.1.1.27)

Referencia: Vassault, en Bergmeyer (1983), con pequeñas modificaciones.
Solución de extracción: Tampón Tris/NaCl (Tris, 81.3 mmol/l; NaCl, 203.3 mmol/l; pH 7.2)

Solución de ensayo:

Tampón Tris (pH 7.2)	67.73	mmol/l
NaCl	169.30	mmol/l
NADH	0.17	mmol/l
Piruvato	1.35	mmol/l
Muestra	200.00	μl
Volumen final	1.99	ml

Longitud de onda : 339 nm

Malato-deshidrogenasa (L-Malato: NAD⁺ oxidoreductasa EC 1.1.1.37)

Referencia: Smith, en Bergmeyer (1983), con pequeñas modificaciones.
Solución de extracción: Tampón Diethanolamina (DEA, 0.1 mol/l; pH 9.2; conteniendo 5 mmol/l de MgCl₂).

Solución de ensayo:

Tampón DEA (pH 9.2)	94.70	mmol/l
NAD ⁺	3.05	mmol/l
MgCl ₂	4.74	mmol/l
Malato	6.32	mmol/l
Muestra	50.00	μl
Volumen final	0.95	ml

Condiciones ensayo: Incubar la solución sin el malato a temperatura ambiente 1 hora; llevar a 37°C de 5 a 15 min; después añadir el malato.

Longitud de onda: 339 nm

Tabla 6.1 Continuación.

Piruvato-quinasa (ATP: piruvato 2-O-fosfotransferasa EC 2.7.1.40)

Referencia: Fuji y Miwa, en Bergmeyer (1983).

Solución de extracción: Tampón Tris (Tris, 1 mol/l; pH 8.0; conteniendo 1.86 mg/ml de EDTA)

Solución de ensayo:

Tampón Tris (pH 8.0)	100.0	mmol/l
EDTA	0.5	mmol/l
KCl	100.0	mmol/l
MgCl ₂	10.0	mmol/l
NADH	0.2	mmol/l
ADP	1.5	mmol/l
PEP	5.0	mmol/l
LDH	60.0	U/l
Muestra	100.0	μl
Volumen final	1.0	ml

Condiciones ensayo: Incubar a 37°C 10 min antes de añadir PEP

Longitud de onda : 339 nm

Succinato-deshidrogenasa (Succinato: (aceptor) oxidoreductasa EC 1.3.99.1)

Referencia: Veeger *et al.*, en Colowick y Kaplan (1969).

Solución de extracción: Tampón fosfato potásico, libre de O₂ (0.3 M, pH 7.6)

Solución de ensayo:

Tampón fosfato potásico	0.30	mol/l
EDTA (pH 7.6)	1.03	mmol/l
K ₃ Fe(CN) ₆	5.17	mmol/l
Succinato	0.04	mol/l
KCN	1.03	mmol/l
BSA	10.00	%
Muestra		
Volumen final	1.45	ml.

Condiciones ensayo: Cubeta conteniendo todo excepto K₃Fe(CN)₆ atemperada a 38°C durante 5 minutos.

Longitud de onda: 450 nm

Tabla 6.2. Condiciones empleadas en las determinaciones de los metabolitos.

L-Alanina (L-(+)-2-Ácido aminopropiónico)

Referencias: (1) G. Gäde, en Bergmeyer (1983), con pequeñas modificaciones.
 (2) D.H. Williamson, en Bergmeyer (1983), con pequeñas modificaciones.

Solución de extracción: Tampón Tris (Tris, 0.2 mol/l pH 9.0)

Desproteinización (1):

- 500 µl de muestra homogeneizada en tampón Tris (0.2 mol/l pH 9.0)
- 100 µl de perclórico (3 ml/l)
- 300 µl de agua helada
- Centrifugación a 12000 g, 20 min, 4°C
- Neutralización con 270 µl KHCO₃ (2 mol/l)
- Centrifugación a 12000 rpm, 20 min, 4°C
- Atemperar a 25°C

Solución de ensayo (2):

Tampón Tris (pH 9.0)	19.05	mmol/l
Hidrazina	0.47	mol/l
EDTA	0.66	mmol/l
NAD ⁺	0.87	mmol/l
AlADH	1650.00	U/l
Muestra	433.00	µl
Volumen final	0.909	ml

Condiciones del ensayo: Medida contra cubeta conteniendo tampón Tris/Hidrazina EDTA pH 9.0

Longitud de onda: 339 nm

Tabla 6.2 Continuación.

Succinato (Acido Butanodioico ácido ethano dicarboxílico)

Referencia:s: (1) H-O. Beutler en Begmeyer (1983) con pequeñas modificaciones.
 (2) Mannheim Boheringer, Biochemical analysis food analysis, Cat. No 176281.

Solución de extracción: Tampón glicilglicina (0.3 mol/l, pH 8.4; Mg⁺², 41 mmol/l).

Desproteización (1):

- 400 µl de muestra homogeneizada en tampón glicilglicina (0.3 mol/l, pH 8.4; Mg⁺², 41 mmol/l).
- Introducir en un baño a 100°C
- 400 µl de perclórico (0.8 mol/l)
- Centrifugación a 12000 g, 20 min, 4°C
- Ajustar pH 5.5-6.0 con 400 µl de TEA (TEA 0.2 mol/l K₂CO₃ 2.3 mol/l pH 8.2)
- Centrifugación a 12000 rpm, 20 min, 4°C

Solución de ensayo (2):

Tampón glicilglicina	105.00	mmol/l
Mg ⁺² (pH 8.4)	4.00	mmol/l
NADH	314.00	µmol/l
CoA	383.00	µmol/l
ITP	523.00	µmol/l
PEP	732.00	µmol/l
PK	10.50	KU/l
LDH	9.60	KU/l
Succinil CoA sintetasa	350.00	U/l
Agua	633.00	µl
Muestra	33.30	µl
Volumen final	1.022	ml

Longitud de onda: 339 nm

actividades enzimáticas se emplearon respectivamente los programas, DATA CAPTURE, y LOTUS-123.

Se podría argüir que las algas no ingeridas por los rotíferos y que son arrastradas en el extracto podrían interferir en la determinación proteica. Sin embargo, el tratamiento térmico inferido y el procedimiento de filtrado parecen suficiente garantía como para producir la desnaturalización de las proteínas algales o su eliminación. No obstante, se realizó una medida de proteínas totales en una muestra conteniendo una concentración algal de 0.8×10^6 cel/ml, sometidas al tratamiento térmico habitualmente empleado y sonicadas en las mismas condiciones empleadas para la extracción de las proteínas de los rotíferos. En estas condiciones, se determinaron las proteínas totales para 25, 50 y 100 μ l de la misma muestra, y se encontró que los tres valores eran muy próximos y similares al valor del blanco.

6.3 RESULTADOS

Las figuras 6.2, 6.3 y 6.4 presentan las relaciones entre los niveles de oxígeno y algunas de las actividades enzimáticas o productos finales del metabolismo fermentativo en el rotífero *Brachionus plicatilis*. En dichas figuras se muestra la relación de la actividad enzimática con la concentración de oxígeno medida en el día en que se realizó la extracción y el ajuste de dicha relación a una función logarítmica con indicación de los niveles de significación. Estos parámetros metabólicos se expresaron también en relación con la concentración media de oxígeno para los dos días previos a cada extracción, encontrándose patrones muy similares a los representados en las figuras 6.2, 6.3 y 6.4. De los enzimas ensayados, solamente la alcohol-deshidrogenasa (ADH) y la succinato-deshidrogenasa (SDH) no mostraron ningún tipo de actividad. Estos resultados indican que los rotíferos no emplean la vía anaeróbica de la formación de etanol, además los rotíferos no incluyen alcohol en sus dietas, por lo que este enzima no tiene porque tener una actividad elevada. La actividad succinato-deshidrogenasa fue medida con el método para evaluar el enzima del ciclo de Krebs (EC. 1.3.99.1), este método en realidad, puede presentar problemas para medir la actividad implicada en la reducción del fumarato durante la hipoxia, ya que actúa en sentido opuesto, aunque otros autores (Hochachka y Mustafa, 1972; Hammen, 1975; Collicut y Hochachka, 1977) encuentran resultados positivos

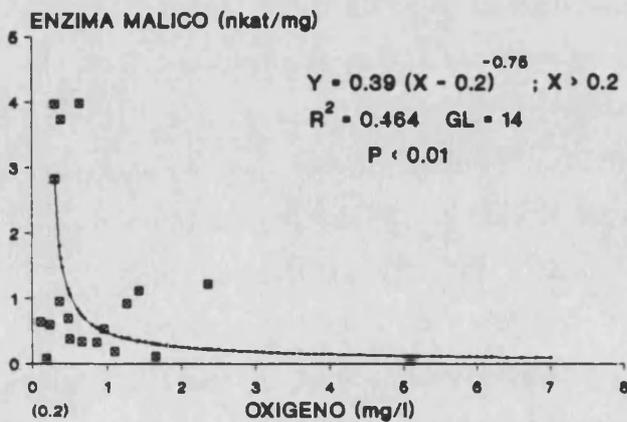
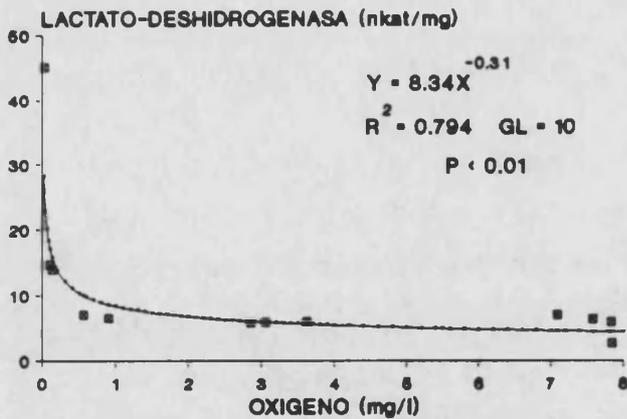
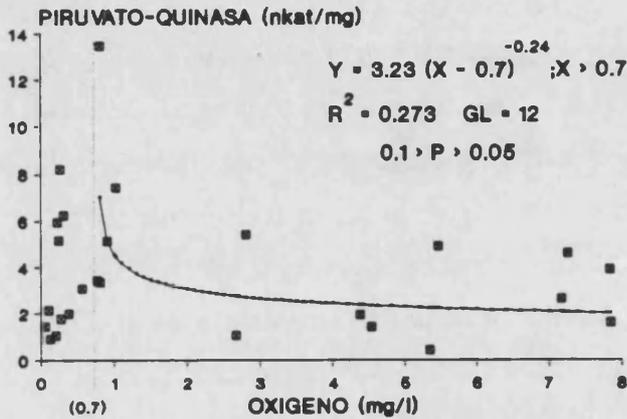


Figura 6.2. Relación entre las actividades enzimáticas implicadas en la vía del lactato y el nivel de oxígeno del medio, en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Las ecuaciones que se muestran en las figuras han sido calculadas a partir de regresiones de las variables transformadas logarítmicamente. Asimismo se indican los coeficientes de correlación (R^2), los grados de libertad (GL) y los niveles de significación del ajuste. Los valores correspondientes a los niveles de oxígeno inferiores al número indicado entre paréntesis no fueron empleados en los ajustes de la primera y tercera relación.

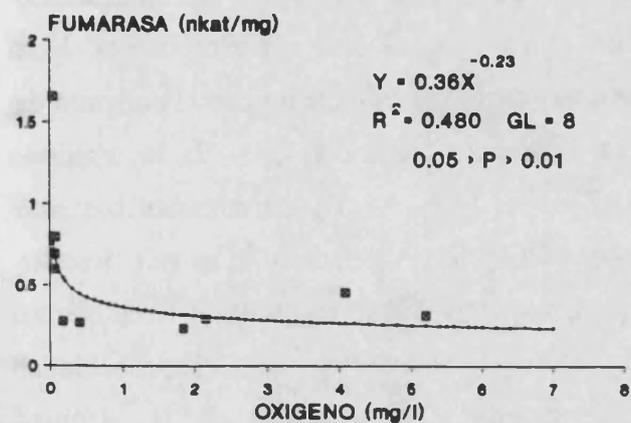
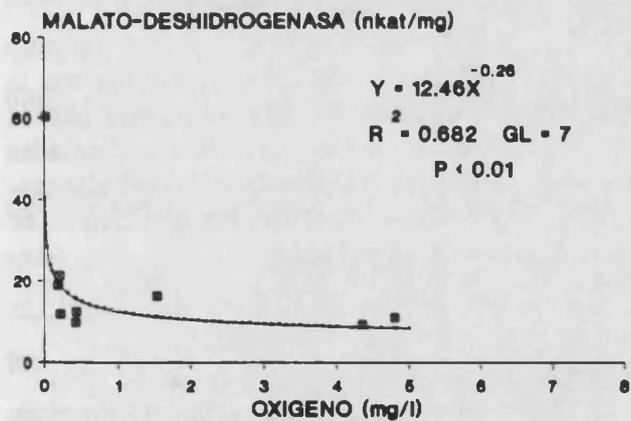
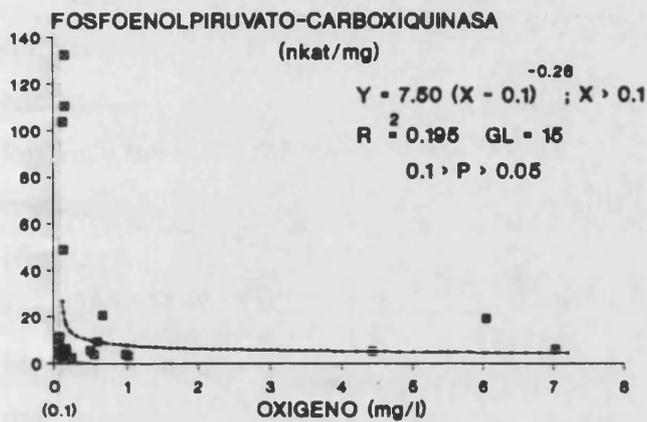


Figura 6.3. Relación entre las actividades enzimáticas implicadas en la vía de la glucosa-succinato y el nivel de oxígeno del medio, en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Las ecuaciones que se muestran en las figuras han sido calculadas a partir de regresiones de las variables transformadas logarítmicamente. Asimismo se indican los coeficientes de correlación (R^2), los grados de libertad (GL) y los niveles de significación del ajuste. Para la primera relación los valores correspondientes a los niveles de oxígeno inferiores al número indicado entre paréntesis (0.1) no fueron empleados en el ajuste.

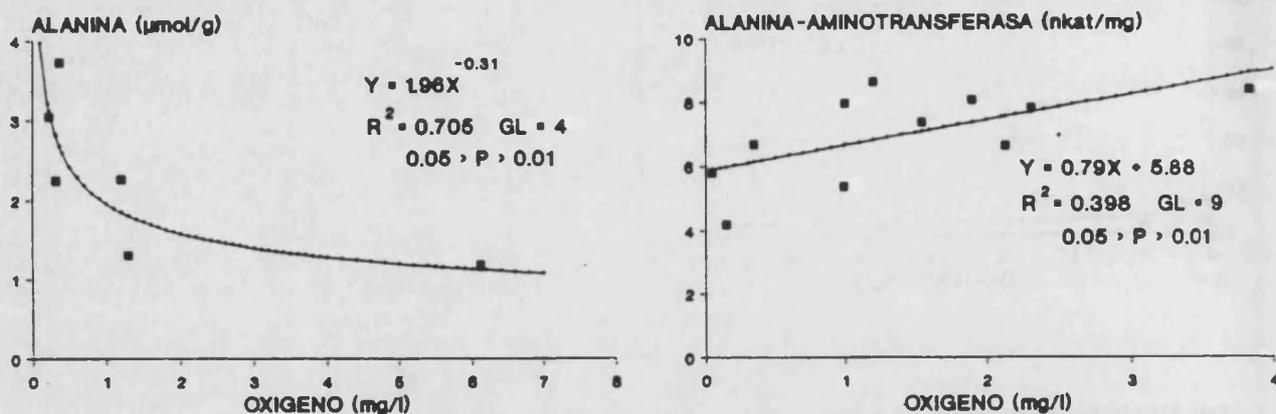


Figura 6.4. Relación de la actividad alanina-aminotransferasa y de la concentración de alanina con la concentración de oxígeno en el medio, en el rotífero *Brachionus plicatilis*. Las ecuaciones que se muestran en las figuras han sido calculadas a partir de regresiones de las variables transformadas logarítmicamente en el caso de la concentración de alanina, mientras que para la actividad alanina-aminotransferasa ha sido empleado el ajuste a una recta. Asimismo se muestran los coeficientes de correlación (R^2), los grados de libertad (GL) y los niveles de significación del ajuste.

con este método en moluscos. En el caso de los rotíferos, tal y como se ha dicho, no muestra niveles apreciables

La pauta más general en casi todas las actividades enzimáticas estudiadas fue un descenso de la actividad con el incremento en la concentración de oxígeno, salvo en dos excepciones: 1) la alanina-aminotransferasa (GTP), cuya actividad muestra un ligero incremento con el aumento de oxígeno con una alta dispersión en torno a esta tendencia (figura 6.4), y 2) la alanina-deshidrogenasa cuyos valores son muy bajos (0.177 ± 0.01 nkat/mg) y permanecen bastante estables, independientemente de los valores de oxígeno. De hecho, este enzima no ha sido descrito en animales y su actividad ha sido examinada debido a que Ho y Zubkoff (1982) sugieren que su presencia debería ser evaluada en animales. Sin embargo, en nuestro caso es probable el interpretar que la actividad detectada puede ser debida a la actividad de la alanina-

aminotransferasa y glutamato-deshidrogenasa que pudieran estar presentes en los extractos de rotíferos.

Los enzimas lactato-deshidrogenasa (LDH) (figura 6.2), malato-deshidrogenasa (MDH) y fumarasa (FUM) (figura 6.3) muestran un fuerte aumento de sus actividades para bajas concentraciones de oxígeno (<0.5 mg/l), con una dispersión muy baja en torno a el ajuste logarítmico realizado. La actividad del enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK) presenta una respuesta similar, si bien la dispersión entre las actividades medidas es elevada, (figura 6.3); además, no puede descartarse un descenso de las actividades de este enzima para las concentraciones más bajas ensayadas; ya que en este ajuste no se han considerado los valores de las actividades enzimáticas correspondientes a concentraciones de oxígeno inferiores a 0.1 mg/l, que provenían de cultivos en los que la concentración de oxígeno había descendido muy rápidamente (apéndice G). También se ha encontrado un tendencia al incremento de las actividades enzimáticas para valores de oxígeno inferiores a 1 mg/l en los enzimas piruvato-quinasa (PK) y enzima málico (EM), aunque se observan grandes variaciones para los niveles bajos de oxígeno. La actividad del enzima piruvato-quinasa desciende para los niveles de oxígeno más bajos, de forma que la relación logarítmica inversa descrita en la figura 6.2 solo es válida para concentraciones de oxígeno superiores a 0.7 mg/l. Del mismo modo, respecto al enzima málico la significación fue alta solo cuando no se han consideraron las actividades obtenidas en cultivos de concentraciones de oxígeno extremadamente bajas (< 0.2). Se ha de destacar que en los enzimas piruvato-quinasa y fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, las mayores actividades se obtienen para concentraciones de oxígeno distintas, es decir, para la primera las concentraciones son algo más elevadas que para la segunda.

Las concentraciones de los productos finales son solo indicativas puesto que pueden variar muy deprisa durante la manipulación de los rotíferos, antes de su homogenización. Sin embargo se observó que la concentración de alanina mostró también un incremento cuando el nivel de oxígeno desciende (figura 6.4), mientras que el succinato mostraba una tendencia inversa con valores de 0.258, 0.411 y 0.813 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ a 0.07, 0.10 y 5.30 mg/l de oxígeno respectivamente.

Las variaciones del pH en los cultivos experimentales no fueron altas debido a que los cultivos se realizaron con agua de mar diluida, la cual posee una alta capacidad tamponadora. En los cultivos en los que las concentraciones de oxígeno eran inferiores a 0.5 mg/l, el pH osciló entre 7.3 y 6.4.

6.4 DISCUSIÓN

Las dos vías principales de producción de energía a partir de la glucosa son la vía del lactato y la de la glucosa-succinato (véase figura 5.1 Capítulo 5). Dichas vías han sido tradicionalmente descritas en relación con la deficiencia de oxígeno, y a menudo se han denominado de una manera más general como vía del piruvato y del oxalacetato respectivamente, incluyendo tales denominaciones otras vías adicionales (véase el Capítulo 5).

Nuestros resultados muestran claramente (figura 6.2) que *Brachionus plicatilis* utiliza la vía del lactato para la producción de energía en condiciones limitantes de oxígeno, puesto que los enzimas implicados en ella incrementan sus actividades a bajas concentraciones de oxígeno. Así pues, se ha detectado una actividad lactato-deshidrogenasa (LDH) elevada para concentraciones de oxígeno inferiores a 0.2 mg/l, indicando una importante producción de NAD⁺ mediante dicha vía. Sin embargo, no debe descartarse la presencia de otras vías compatibles con ésta descritas para otros organismos (Livingstone, 1983). En función de este resultado, la vía de las opinas no ha sido evaluada, fundamentalmente porque su ocurrencia es escasa o de menor importancia si está presente la vía del lactato (Bowen, 1987).

La alternancia entre la vía del lactato y la de la glucosa-succinato viene gobernada por las actividades de los enzimas fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK) que da entrada a la vía de la glucosa-succinato, y el enzima piruvato-quinasa (PK) el cual da entrada a la vía del lactato.

En los rotíferos estudiados se encuentra crecimiento de la actividad de ambos enzimas a bajas concentraciones de oxígeno, si bien las concentraciones de oxígeno en las que muestran sus máximas actividades no coinciden. Los valores de las mayores actividades del enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa corresponden a las concentraciones de oxígeno más bajas (inferiores a 0.2 mg/l), mientras que para la piruvato-quinasa se encuentran en un rango superior (>0.7 mg/l), lo cual podría implicar algún mecanismo de regulación. En este sentido, Mustafa y Hochachka (1973) sugieren que la afinidad de fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa por el fosfoenolpiruvato depende de factores microambientales. De esta forma, a bajos valores de pH, aumenta la afinidad de fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa por el fosfoenolpiruvato, mientras que a altos valores ocurre el caso contrario. De hecho se ha descrito en moluscos que la piruvato-quinasa es inhibida por alanina y por el descenso de pH (De Zwaan y Marrewijk, 1973; Vooy, 1973).

1980; Ho y Zubkoff, 1982).

No obstante, en nuestro caso la contraposición entre estas actividades no parece ser tan marcada como la sugerida por otros autores trabajando con moluscos, los cuales encuentran bajas producciones de lactato y altas de succinato y alanina cuando el enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa está presente (Simpson y Awapara, 1966; De Zwaan y Marrewijk, 1973)

En la vía de la glucosa-succinato iniciada con la activación del enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, se encuentran implicados otros enzimas tales como malato-deshidrogenasa, fumarasa y succinato-deshidrogenasa. De ellos las actividades de los dos primeros fueron estudiadas mostrando una clara relación con el oxígeno, y los patrones de variación de sus actividades son consistentes con la idea de que la vía de la glucosa-succinato se activa a muy bajas concentraciones de oxígeno. Por otra parte la actividad de la succinato-deshidrogenasa no fue medida con el método más adecuado para este enzima. Respecto de medidas de succinato también es difícil establecer conclusiones ya que las concentraciones de metabolitos en los organismos frecuentemente se encuentran sometidas a rápidas variaciones.

Se ha de señalar que la vía del aspartato-succinato (figura 5.1, Capítulo 5) solapa algunos pasos con la vía de la glucosa-succinato, por lo que algunas actividades detectadas (p.e. malato-deshidrogenasa, fumarasa) pueden ser interpretadas como pertenecientes a la primera, sin embargo, la activación del enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa de una forma similar a malato-deshidrogenasa y fumarasa, hace pensar que el flujo glucolítico aporta los sustratos principales para dichos enzimas.

Se ha postulado que la alanina desempeña una importante función en la regulación del metabolismo aeróbico/anaeróbico, ya que algunos estudios han demostrado que es un inhibidor de la piruvato-quinasa y un activador de la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (Hochachka y Mustafa, 1972; De Zwaan y Marrewijk, 1973; Ho y Zubkoff, 1982). Además, es uno de los productos finales de algunas vías metabólicas (véase el Capítulo 5). La evidencia de un mecanismo tal de regulación para los rotíferos es débil a partir de nuestros resultados ya que sólo se ha detectado un ligero incremento de alanina con las bajas concentraciones de oxígeno (por debajo de 1.2 mg/l). Además, no se ha encontrado ninguna evidencia de relación entre la producción de alanina y vías dependientes de la glucosa, ya que el enzima alanina-deshidrogenasa muestra unos valores muy bajos, probablemente indistinguibles de un fondo de actividad debido a interferencia en el método de determinación, y por otro lado el enzima alanina-aminotransferasa

presenta un patrón muy poco afectado por los niveles de oxígeno. El incremento de alanina detectado aquí para concentraciones de oxígeno bajas podría entenderse mejor considerando los resultados de Foreman y Ellington (1983), trabajando con *Crassostrea virginica*, quienes encontraron una pérdida en el efecto del iodoacetato (inhibidor del flujo glucolítico) sobre la producción de alanina, lo cual indicaría que la producción de alanina observada por dichos autores no depende exclusivamente de la glucólisis. En este sentido, el incremento de alanina podría ser una consecuencia de la adaptación a periodos cortos de anoxia, con un incremento de la disponibilidad de aminoácidos (glutamato, alanina y otros) por proteólisis a partir de proteínas de la dieta o de los tejidos del animal (M. Alemany, comunicación personal). Dichos aminoácidos podrían ser utilizados en las primeras etapas de anaerobiosis como una fuente adicional de piruvato o de otros productos los cuales permitirían mantener el metabolismo intermediario.

Una característica importante de la tolerancia a la anoxia es la acumulación de productos finales anaeróbicos y la acidificación. Se han descrito varias estrategias que permitirían solventar este problema, la más sencilla consiste en una reducción de la tasa de acumulación de productos finales por reducción de la tasa metabólica. Dicha estrategia parece ser utilizada por *Brachionus plicatilis* si se atiende a la dinámica poblacional que presenta en condiciones de microaerofilia (véase el Capítulo 4). De cualquier modo, las alteraciones del pH no parecen ser excesivamente problemáticas para *Brachionus plicatilis*, ya que suele ocupar habitats salobres o altamente alcalinos, lo cual podría permitir un metabolismo fermentativo sin excesivas variaciones del pH.

En el caso de los organismos anaeróbicos facultativos se han descrito dos tipos de estrategias metabólicas (Storey y Storey, 1990). Una consistiría en vías en las cuales el principal producto final sería el lactato, dicha estrategia tolera la acidosis ya que posee una alta capacidad tamponadora capaz de compensar los cambios iónicos. Otra, sería aquella en la cual los principales productos finales son alanina y succinato o propionato; dicha estrategia consiste en la producción alternativa de productos finales acoplados a la formación de ATP. En *Brachionus plicatilis* parece que existe una activación de la vía del lactato, pero también muestran una importante actividad enzimática que participarían en la segunda estrategia bioquímica. De esta forma parece posible la adopción por parte de los rotíferos de una estrategia combinada en la cual el suministro de NAD⁺ necesario para mantener la producción de energía en condiciones deficitarias de oxígeno y para mantener el potencial redox fisiológico dentro de la célula, sería provisto tanto por las reacciones de los enzimas lactato-deshidrogenasa como de malato-

deshidrogenasa.

La presencia de las vías lactato y glucosa-succinato es también consistente con la posición filogenética de los rotíferos ya que ambas rutas han sido simultáneamente descritas en pseudocelomados (nematodos) y en otros *phyla* de organismos no celomados (Saz, 1981; Livingstone, 1983). De acuerdo con esta interpretación, los rotíferos poseerían una vía con alta eficiencia y bajas tasas de producción de energía, dada por la vía de la glucosa-succinato y otra con baja eficiencia pero con tasas más altas de producción de energía provista por la vía del lactato. La primera es adaptativa para condiciones hipóxicas a largo plazo y la segunda a corto plazo.

III. CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

Numerosos trabajos que abordan el estudio de las comunidades de rotíferos en ambientes naturales describen la presencia de rotíferos en ambientes que en un principio parecen bastante inhóspitos para los organismos eucariotas. En concreto, muchos de ellos se relacionan con una cierta tolerancia a ambientes con escasa oxigenación (George y Ferrando, 1969; Larsson, 1971; Ruttner-Kolisko, 1980; Boagert y Dumont, 1989; Berzins y Pejler, 1989a; 1989c).

En una atmósfera eminentemente aerobia la concentración de oxígeno supone un importante factor para el desarrollo de la vida tal y como la conocemos, de manera que, en principio, algunos de los organismos capaces de sostener un metabolismo estrictamente anaeróbico podrían representar los últimos vestigios de los supervivientes de una atmósfera primitiva que han quedado relegados a ambientes muy especiales. Sin embargo, muchos organismos han desarrollado mecanismos de defensa orientados a solventar situaciones de emergencia en cuanto a la concentración de oxígeno (Capítulo 5; II parte). Son soluciones que no permiten un mantenimiento indefinido en tales condiciones pero que sí de alguna manera resultan adecuadas para resolver el problema de la limitación de oxígeno, bien sea a nivel celular o ambiental. En el caso de los rotíferos, a pesar de los innumerables problemas que plantean toda una serie de factores adversos, el lograr unas pequeñas adaptaciones que les permitan una cierta tolerancia supone una gran ventaja frente a aquellos organismos incapaces de tales sutilezas, colocándolos en una situación muy favorable frente a la explotación de zonas ricas en recursos energéticos.

A la hora de abordar este trabajo nos encontrábamos con un compromiso entre lo que realmente sucede en la naturaleza, con unos hechos un tanto sorprendentes como son la ubicación de abundantes poblaciones de rotíferos en capas que en un principio parecerían adecuadas solo para bacterias y protistas y el tratar de responder como logran subsistir en estos nichos tan adversos. Algunos trabajos que abordan el estudio de las distribuciones verticales de los rotíferos nos muestran que existen migraciones verticales a lo largo de la columna de agua (Miracle, 1977) de tal forma que los patrones de distribución observados en los resultados podrían ser la consecuencia de una migración puntual de escasa duración a las capas microaerófilas profundas, o quizás la consecuencia de la acumulación de organismos que, provenientes de estratos superiores se encuentran finalmente atrapados en su sedimentación por

unos gradientes de densidad con unas condiciones desfavorables. Sin embargo tales cosas no son realmente así, sino que existen verdaderas poblaciones estables de rotíferos en dichas capas, esto, es algo que ya ha sido demostrado y que nos conduce a una pregunta mucho más intrigante, se trata de desvelar cuales pueden ser los mecanismos que les permiten sobrevivir en condiciones tan adversas. Este trabajo ha constituido un primer intento de resolver estas cuestiones.

Así pues, en el caso de los rotíferos se ha evaluado realmente su capacidad de tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno (Capítulo 4; II parte) y los mecanismos metabólicos implicados en ella (Capítulo 6; II parte). Sin embargo, previamente debíamos solventar toda una serie de problemas metodológicos como son la elección del organismo sobre el que relizar los estudios, la alimentación de los organismos en condiciones limitantes de oxígeno y el control de dichas condiciones, cuestiones todas ellas que han sido tratadas en los capítulos 2 y 3 de la segunda parte de este trabajo y que a su vez abren nuevas perspectivas para el estudio y control de este factor en otros grupos de rotíferos, así como permiten el establecimiento a largo plazo de poblaciones de *Brachionus plicatilis*, alimentadas con un tipo de alimento no empleado comunmente para este organismo. En cuanto a los mecanismos metabólicos implicados en la tolerancia las bajas concentraciones de oxígeno, las respuestas obtenidas son muy similares a las que se dan en otros grupos de organismos enfrentados con el mismo problema, tales como bivalbos, nematodos o crustáceos. Dos soluciones que no son incompatibles se entrelazan, la reducción de la tasa metabólica y la adopción de rutas metabólicas capaces de minimizar las demandas de oxígeno, en las que los enzimas lactato-deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa y malato-deshidrogenasa juegan un importante papel.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados elaborados en el presente trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Existen poblaciones de rotíferos extraordinariamente densas en una delgada capa cerca de la zona anóxica de la laguna de La Cruz. Estas poblaciones están determinadas por las especiales características físico-químicas de la laguna que presenta una importante estratificación, originando varios gradientes de los principales parámetros físico-químicos; concretamente, presenta una termoclina y una oxiclina cuyos gradientes son más acusados en los meses de primavera y verano. La oxiclina es permanente ya que la laguna es meromítica y es en esta interfase donde puede tener lugar el crecimiento de las densas poblaciones de rotíferos

2. Se pueden diferenciar dos grupos de especies a partir del estudio de la distribución vertical de rotíferos en la laguna de La Cruz, y son: 1) especies con una alta proporción de individuos en el hipolimnion y la oxiclina tales como *A. miraclei*, *F. hofmanni*, *A. fissa*, *P. dolichoptera* y *K. quadrata* y 2) especies epi-metalimnéticas situadas en o por encima de la termoclina, o que aunque se pueden localizar en otras profundidades, desarrollan grandes poblaciones en el epilimnion, tales como *H. mira*, *T. similis*, *S. pectinata*, *A. girodi*, *A. saltans* y *A. ecaudis*. Además existe una diferencia numérica entre las densidades poblacionales de las especies epi-metalimnéticas e hipolimnéticas, de forma que las densidades de las especies epi-metalimnéticas son inferiores que las de las especies hipolimnéticas.

3. La distribución de las especies epi-metalimnéticas es muy similar a la de otros lagos y viene determinada por una sucesión estacional, más o menos típica que marca una distinción entre especies estivales tales como, *T. similis*, *H. mira*, *A. saltans* y *A. girodi*; especies con máximos en primaverales, tales como, *A. ecaudis*, y especies permanentes con máximos otoñales, tales como, *S. pectinata*,

4. La distribución de las especies hipolimnéticas se encuentra estrechamente relacionada con la posición de la oxiclina y la termoclina, su posición a lo largo del año viene determinada por estas

zonas de gradiente. Unas especies más generalistas están en todo el perfil en la época de mezcla y se sitúan en la termoclina y después en la oxiclina a medida que avanza el verano o periodo de estratificación tales como *P. dolichoptera*, *K. quadrata* y *A. fissa*, mientras que otras están bien adaptadas a la oxiclina y migran con ella, si ésta cambia su profundidad, tales como, *A. miraclei* y *F. hofmanni*. La nueva especie, *A. miraclei* de reciente descripción, es la que se encuentra más estrechamente asociada a condiciones extremas de oxígeno.

5. Los parámetros físico-químicos más importantes en la distribución de las especies de rotíferos son la temperatura y el oxígeno, de forma que las especies epi-metalimnéticas se sitúan a altos valores de oxígeno y temperatura, mientras que las hipolimnéticas lo hacen a valores bajos de estos parámetros. El resto parámetros físico-químicos estudiados marcan distinciones menos aparentes.

6. El potencial de óxido-reducción y el pH marcan una ligera distinción entre especies superficiales y especies hipolimnéticas. Respecto al potencial de óxido-reducción las especies que muestran sus máximas abundancias en un amplio rango de este parámetro son: *T. similis*, *H. mira*, *A. ecaudis* y *K. quadrata* mientras que *P. dolichoptera*, *A. fissa*, *A. miraclei* y *F. hofmanni* se localizan en los mismos rangos que las anteriores pero muestran sus máximos valores en un rango más estrecho. En cuanto al pH, los máximos poblacionales de las especies epi-metalimnéticas se presentan a pH superiores al de los máximos de las especies hipolimnéticas.

7. Las especies congénéricas *A. fissa* y *A. miraclei* muestran una alternancia no solo vertical sino también en su dimensión temporal, siendo *A. fissa* una especie más dispersa que reduce su nicho cuando coexiste con *A. miraclei*. En general, la dominancia de las distintas especies en la laguna de La Cruz depende de la situación de la oxiclina y la termoclina a lo largo del año, siendo la diferencia fundamental entre los dos años de estudio una producción y descomposición mayor en 1988 que en 1987, lo cual al final del verano de 1988 aproxima la termoclina con la oxiclina restringiendo a las verdaderas especies de la oxiclina y favoreciendo a *A. fissa*.

8. Los picos de crecimiento de las poblaciones algales van seguidos por crecimientos en las poblaciones de rotíferos. Del estudio de la relación entre las comunidades fitoplanctónicas y

zooplanctónicas pocas conclusiones se pueden extraer acerca de las relaciones tróficas directas, sin embargo, se pueden asociar *A. girodi* con el grupo algal de *Peridinium*; el grupo algal de *Pedinomonas* con *A. fissa* y los grupos de *Cryptomonas* y *Rhodomonas* con *Polyarthra*.

9. *Anuraeopsis fissa* es un organismo filtrador de partículas pequeñas poco móviles ya que el análisis experimental de la alimentación de *A. fissa* revela que existe una mayor respuesta para las combinaciones *Monoraphidium minutum* viva-oscuridad y *Monoraphidium minutum* congelada-luz. Estos hechos vienen apoyados por el carácter detritívoro de *A. fissa*, y de ellos se deduce que *Monoraphidium minutum* congelado puede ser una fuente de alimentación para el cultivo de dicho rotífero.

10. La alimentación de *Brachionus plicatilis* con algas *Tetraselmis sp.* térmicamente tratadas durante 90 minutos a 65–70 ° C, en condiciones de no agitación, permite la obtención de cultivos estables durante un número indefinido de generaciones. El tratamiento térmico de 65–70°C durante 90 minutos constituye un tratamiento térmico adecuado para la inactivación de las algas *Tetraselmis sp.* y representa una ventaja en la estandarización de cultivos de *Brachionus plicatilis* ya que permite el control de las condiciones de oxigenación de los mismos.

11. En la alimentación del rotífero *Brachionus plicatilis* con algas y con levaduras, los mejores rendimientos se obtienen alimentando con algas. El tratamiento térmico no afecta de igual modo al valor alimenticio de los cultivos de algas que a los de levaduras, dando las algas tratadas térmicamente mayores crecimientos de rotíferos de los que cabría esperar si el efecto del tratamiento fuera el mismo.

12. El rotífero *Brachionus plicatilis* es capaz de tolerar concentraciones de oxígeno por debajo de 1 mg/l durante prolongados periodos de tiempo.

13. La concentración de oxígeno parece tener un efecto sobre la tasas de crecimiento de las poblaciones de *Brachionus plicatilis* así como sobre las densidades máximas, puesto que dichos parámetros decrecen cuando descienden los niveles medios de oxígeno.

14. *Brachionus plicatilis* puede mantener tasas metabólicas reducidas en condiciones microerofílicas, de forma que la disminución paulatina del oxígeno disminuye la tasa de aumento poblacional e incrementa la duración de la vida de la población, constituyendo un mecanismo de regulación como consecuencia de las bajas tasas metabólicas individuales y de un reemplazamiento individual a tasas muy bajas debido a una escasa reproducción.

15. *Brachionus plicatilis* utiliza las vías del lactato y de la glucosa-succinato para la producción de energía en condiciones limitantes de oxígeno, puesto que los enzimas implicados en ellas (lactato-deshidrogenasa, malato-deshidrogenasa, fumarasa y fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa) incrementan sus actividades a bajas concentraciones de oxígeno.

16. *Brachionus plicatilis* es capaz de adaptarse a situaciones de corta y larga duración de bajas concentraciones de oxígeno ya que posee una vía con alta eficiencia y bajas tasas de producción de energía, dada por la vía de la glucosa-succinato, capaz de utilizar los recursos lo más eficientemente posible a una tasa baja y otra vía con baja eficiencia, pero, con más altas tasas de producción de energía, la vía del lactato, adecuada para utilizar la máxima cantidad de energía por unidad de tiempo.

En resumen, este trabajo pone de manifiesto que la distribución de las comunidades de rotíferos en ambientes naturales es algo que viene determinado en parte por una gran serie de factores de entre los cuales hemos destacado a los factores físico-químicos y de ellos nos hemos centrado en el estudio del oxígeno, el cual desempeña un importante papel. De hecho, algunos rotíferos, por lo menos el estudiado, *Brachionus plicatilis*, es capaz de adaptarse a condiciones desfavorables de este factor mediante la reducción de las tasas metabólicas y la adopción de vías metabólicas fermentativas. Al mismo tiempo el presente trabajo abre una perspectiva metodológica para el estudio de otras especies de rotíferos capaces de colonizar ambientes similares.

IV. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, T.A. y A.E. Chaplin, 1979. Seasonal variations in the anaerobic metabolism of the mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 64B: 331-356.
- Albert, J. L. y W.R. Ellington, 1985. Patterns of energy metabolism in the stone crab, *Menippe mercenaria*, during severe hypoxia and subsequent recovery. *J. Exp. Zool.* 234: 175-183.
- Alfonso, M.T., M.R. Miracle y M. Serra, 1987. Análisis estadístico de las comunidades zooplantónicas de una cubeta meromítica y de una laguna anóxica del sistema cárstico de Banyoles. IV Congreso Español de Limnología. Act. 116-122.
- Alfonso, M.T. y M.R. Miracle, 1987. Variación temporal de las poblaciones zooplanctónicas de la laguna anóxica del Cisó (Gerona). *Limnetica.* 3: 167-177.
- Amsellen, J., y C. Ricci, 1982. Fine structure of the females genital apparatus of *Philodina* (Rotifera, Bdelloidea). *Zoomorphology* 100: 89-105.
- Arndt, H., 1993. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates)- a review. *Hydrobiologia* 255/256: 231-246.
- Ávila, A., L. Burrell, A. Domingo, E. Fernández, J. Godal y J.M. Llopert, 1984. Limnología del Lago Grande de Estanya (Huesca). *Oecologia aquatica* 7: 3-24.
- Bender, K. y W. Kleinow, 1988. Chemical properties of the lorica and related parts from the integument of *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B: 483-487.
- Bergmeyer, H.U., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol II. Verlag Chemie Weinheim. Deerfield Beach, Florida, Basel 426 pp.
- Betterton, H. y H. Dowda, 1976. An analysis of oxidative metabolism in *Trichomonas gallinae*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 163-165.
- Bérszins, B., 1960. Rotatoria IV. Order: Monogonta. Sub-order Ploima. Family: Brachionidae Genera: *Brachionus*, *Kellicottia*, *Argonotholca* *Notholca*, *Pseudonotholca*, *Euchalanis*, *Tripleuchlanis*. *Cons. Sci. Explor. Mer Zooplankton Sheet*, 87.
- Bérszins, B. y B. Pejler, 1987. Rotifer occurrence in relation to pH. *Hydrobiologia* 147:107-116.
- Bérszins, B. y B. Pejler, 1989a. Rotifer occurrence and trophic degree. *Hydrobiologia* 182:171-180.
- Bérszins, B. y B. Pejler, 1989b. Rotifer occurrence in relation to temperature. *Hydrobiologia* 175: 223-231.

- Bérszins, B. y B. Pejler, 1989c. Rotifer occurrence in relation to oxygen content. *Hydrobiologia* 183: 165–172.
- Beutler, H-O., 1983. Succinic acid, UV method. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol VII (Edited by Bergmeyer H.U.) pp 25–33. Verlag Chemie Weinheim. Deerfield Beach, Florida Basel.
- Bock, S., U. A. Sedlmeier y K.H. Hoffmann, 1989. Metabolism of absorbed short-chain carboxylic acids by the freshwater oligochaete *Tubifex tubifex*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 35–40.
- Bogaert, G. y H.J. Dumont, 1989. Community structure and coexistence of the rotifers of an artificial crater lake. *Hydrobiologia* 186/187: 167–179.
- Bogdan, K. G. y J.J. Gilbert, 1982. Seasonal patterns of feeding by natural populations of *Keratella Polyarthra* and *Bosmina*: clearance rates, selectivities and contributions to community grazing. *Limnol. and Oceanogr.* 27: 918–934.
- Bogdan; K. G. y J.J. Gilbert, 1987. Quantitative comparison of food niches in some freshwater zooplankton. *Oecologia* 72: 331–340.
- Boraas, M.E., 1983. Populations dynamic of food-limited in two-stage chemostat-culture. *Limnol. Oceanogr.*, 28: 546–563.
- Bowen, C. E., 1984. Facultative anaerobiosis in *Haliotis* (Ormer/Abalone): Pyruvate kinase and phosphoenol-pyruvate carboxykinase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B: 197–200.
- Bowen, C.E., 1987. Pyruvate metabolism in *Haliotis* (Omer/Abalone): Lactate dehydrogenase, pyruvate kinase and opine dehydrogenase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B: 219–226.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Brinkhurst, R.O., P.M. Chapman y M.A. Farrell, 1983. A comparative study of respiration rates of some aquatic oligochaetes in relation to sublethal stress. *Int. Rev. gesamtem. Hydrobiol.* 68: 683–699.
- Carmona, M.J., M.Serra y M.R. Miracle, 1989. Protein patterns in rotifers: the timing of aging. *Hydrobiologia* 186/187: 325–330.
- Carlsson, K.H. y G. Gäde, 1986. Metabolic adaptation of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*, during exercise and environmental hypoxia and subsequent recovery. *Biol. Bull.* 171: 217–235.
- Carvajal, N. y E. Kessi, 1988. Properties of octopine dehydrogenase from the foot muscle of *Concholepas concholepas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 77–79.
- Cataldi-Flombaum, M.A., J.J. Cannata, J.J. Cazulo y E.L. Segura, 1977. CO₂-Fixing enzymes in *Tripanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B 67–69.

- Cazon, A., C. Caitanaki, B. Michaelisli, A. Papadopoulos y J. Beis, 1987. Purification catalytic and regulatory properties of malate dehydrogenase from the foot of *Patella caerulea* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 1033–1040.
- Chen, C. y J. Awapara, 1969. Effect of oxygen on the end-products of glycolysis in *Rangia cuneata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 31: 395–401.
- Clément, P., 1977. Ultrastructural research on rotifers. *Archiv für hydrobiologie Beiheft* 8:270–297
- Clément, P., 1980. Phylogenetic relationships of rotifers, as derived from photoreceptor morphology and other ultrastructural analysis. *Hydrobiologia* 73: 93–117.
- Clément, P., E. Wurdack y J. Amsellem, 1983. Behavior and ultrastructure of sensory organs in rotifers. *Hydrobiologia* 104: 89–130.
- Clément, P., 1993. The phylogeny of rotifers: molecular ultrastructural and behavioural data. *Hydrobiologia* 255/256: 527–544..
- Collicutt, J.M. y P.W. Hochachka, 1977. The anaerobic oyster heart: coupling of glucose and aspartate fermentation. *J.Comp. Physiol.* 115: 147–157.
- Could, P., 1983. La biosfera. *Investigación y Ciencia* 86: 116–127.
- Culver, D.A. y G.L. Brunskill, 1969. Fayetteville Green lake New York V. Studies of primary production and zooplankton in a meromictic marl lake. *Limnol. Oceanogr.* 14:
- Dasí, M.J. 1990. Distribución vertical y variación anual del fitoplancton de una laguna cársica meromítica de Cuenca, la laguna de La Cruz. Tesis de licenciatura. Universidad de Valencia
- Dasí, M.J. y M.R. Miracle, 1991. Distribución vertical y variación estacional del fitoplancton de una laguna cársica meromítica, la laguna de La Cruz (Cuenca, España). *Limnetica*, 7: 37–59.
- Dawidowicz, P. y J. Pijanowska, 1991. Competitive interactions between cladocerans and rotifers: an experimental study. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 917–920.
- Dawson, R.M.C., D.C. Elliot, W.H. Elliot y K.M. Jones, 1969. Data for biochemical research. 2 ed. Clarendon press–Oxford. Oxford University Press. 654 pp.
- De Beauchamp, P., M. 1951. Sur la variabilité spécifique dans le genre *Asplanchna*. *Bull. Biol. France et Belg.* 85: 137–175.
- De Beauchamp, P., M. 1965. Classe des Rotifères. En P.P. Grassé (ed.). *Traité de Zoologie, Anatomie Systematique, Biologie IV* 3: 1225–1379.
- De Zwaan, A. y W.J.A. Marrewijk, 1973. Anaerobic glucose degradation in the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 44B: 429–439.

- De Zwaan, A. y T.C.M. Wijsman, 1976. Anaerobic metabolism in bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 313-324.
- Dixon, W.J., M. B. Brown, L. Engelman, J. W. Frane, M. A. Hill, R. I. Jennrich y J. D. Toporek. BMDP statistical software. Printing with additions. Univ. California Berkeley. 773pp.
- Doohan, M., 1973. An energy budget for adult *Brachionus plicatilis* Müller (Rotatoria). *Oecologia* 13: 351-362.
- Dumont, H.J., 1983. Biogeography of rotifers. *Hydrobiologia.* 104: 19-30.
- Edmonson, W.T., 1965. Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature. *Ecol. Monogr.* 35: 61-111.
- Enig, M., J. Ramsay y D. Eby, 1976. Effect of temperature on pyruvate metabolism in the frog. The role of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 53B: 145-148.
- Epp, R.W. y P.W. Wiston, 1977. Osmotic regulation in brackish water rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *J. Exp. Biol.* 68:151-156.
- Epp, R.W. y P.W. Winston, 1978. The effect of salinity and pH on the activity and oxygen consumption of *Brachionus plicatilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 59A: 9-12.
- Epp, R.W. y W.M. Lewis, 1980. Metabolic uniformity over the environmental temperature range in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Hydrobiologia* 73: 145-147.
- Epp, R.W. y W.M. Lewis, 1984. Cost and speed of locomotion for rotifers. *Oecologia* 61: 289-292.
- Eraso, A., V. Lopez-Acevedo, M.A. Lopez, J.V. Navarro, J. Suso y V. Santos, 1979. Estudio de las torcas de Palancares y Cañada del Hoyo en el karst de la Serrania de Cuenca. Kobie (Bilbao). Diputación Foral de Vizcaya, Boletín nº 9, 69pp.
- Finlay, B.J., A.S.W. Span y J.M.P. Harman, 1983. Nitrate respiration in primitive eukaryotes. *Nature* vol 303-5919: 333-336.
- Finlay, B.J., K.J. Clarke, E. Vicente y M.R. Miracle, 1991. Anaerobic ciliates from a sulphide-rich solution lake in Spain. *Europ. J. Protistol.* 27: 148-159.
- Fontaine, C. T. y D. B. Revera, 1980. The mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* for use as foodstuff in aquaculture. *World Maricul. Soc. Proc.* 11:211-218.
- Foreman, R. A. y W. R. Ellington, 1983. Effects of inhibitors and substrate supplementation on anaerobic energy metabolism in the ventricle of the oyster *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 74B: 543-547.

- Frank, C., 1983. Ecology production and anaerobic metabolism of *Chironomus plumosus* L. larvae in a shallow lake II. Anaerobic metabolism. Arch. Hydrobiol. 96-3: 354-362.
- Fry, M. y E.P. Brazeley, 1984. NADH-Fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in mitochondria of *Ascaricha galli* and *Nippostrongylus brasiliensis*. Comp. Biochem. Physiol. 77B: 143-150.
- Fuji, H. y S. Miwa, 1983. Pyruvate Kinase. UV-method. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol III. (Edited by Bergmeyer H.U.), pp 496-507. Verlag Chemie Weinheim. Deerfield Beach, Florida Basel.
- Furukawa, I. y Hidaka K., 1973. Technical problems encountered in the mass culture of the rotifer using marine yeast as food organisms. Bull. Plankton Soc. Japan. 20: 61-71.
- Gäde, G., 1983a. Energy produccion during anoxia and recovery in the adductor muscle of the file shell *Lima hians*. Comp. Biochem. Physiol. 76B: 73-77.
- Gäde, G., 1983b. Octopina. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol VIII. (Edited by Bergmeyer H.U.) pp 419-425. Verlag Chemie Weinheim. Deerfield Beach, Florida Basel.
- Gäde, G., 1984. Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish *Orconetes limosus*. Comp. Biochem. Physiol. 77A: 495-502.
- Gäde, G. y M. K. Grieshaber, 1986. Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 83B: 255-272.
- Gäde, G., 1988. Energy metabolism during anoxia and recovery in shell adductor and foot muscle of the gastropod mollusc *Haliothis lamellosa*: Formation of the novel anaerobic end product Tauropine. Biol. Bull. 175: 122-131.
- Galkovskaja, G.A., J. Ejsmont-Karabin y V.N. Evdokimov, 1987. Relative protein metabolism in rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas in realtion to temperature. Int. Revue. ges. Hydrobiol. 72(1): 59-69.
- Gatesoupe, F.J. y L. Luquet, 1981. Practical diet for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*: aplication to larval rearing of sea bass *Dicentrathus labrax*. Aquaculture 22:149-163.
- Gatesoupe, F.J. y J.H. Robin, 1981. Commercial single-cell proteins either as sole food source or in formulated diets for intensive and continuos production of rotifers (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture 25: 1-5.
- George M. G. y C.H. Ferrando, 1969. Seasonal distribution and vertical migration of planktonic rotifers in two lakes in Eastern Canada. Verh. Internat. Verein. Limnol. 17: 817-829.
- Gilbert, R.J., 1980. Female polymorphism and sexual reproducition in the rotifer *Asplanchna*: evolution of their relationship and control by the dietary tocopherol. Am. Nat. 116: 409-431.

- Gilbert, R.J., R.A. Klen y P.G.G. Miller, 1983. The role of threonine in the metabolism of acetyl coenzyme A by *Trypanosoma brucei brucei*. *Comp. Biochem. Physiol.* 74B: 277-281.
- Gilbert, R.J., y K.G. Bogdan, 1984. Rotifer grazing: In situ studies on selectivity and rates. En D. G. Meyers y J.R. Strickler (Eds.). *Trophic interactions within aquatic ecosystems*. A. A.A. S. Selected Symposium 85. 97-133. N.Y.
- Gilbert, J.J., y R. Stemberger, 1985. Control of *Keratella* populations by interference competition from *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 30(1): 180-188.
- Gnaiger, E., 1983. Heat dissipation and energetic efficiency in animal anoxibiosis: Economy contra Power. *J. Exp. Zool.* 228:471-490.
- Gnaiger, E., 1987. Optimum efficiencies of energy transformation in anoxic metabolism. The strategies of power and economy. En *Evolutionary physiological ecology*. Ed. Calow. Cambridge University Press. 239 pp.
- Goncalves-De Barros E. y R. De Araujo-Caldas, 1983. Partial purification and characterization of glutamina-pyruvic transaminase from *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 74B: 449-452.
- Gonzalez, M., T.M. Frost y P. Mont, 1990. Effects of experimental acidification on rotifer population dynamics in little rock lake Winsconsin, USA. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 449-456.
- Green, J., 1967. Associations of rotifera in the zooplankton of the lake source of the white Nile. *J. Zool. Lond.* 151: 343-378.
- Green, J., 1972. Frashwater ecology in the Mato Grosso central Brazil III. Associations of rotifea in meander lakes of the Rio Sua Missú. *J. Nat. Hist.* 6: 229-241.
- Green, J., y O. Biauwan, 1974. *Asplanchna* and the spines of *Brachionus calyciflorus* in two javanese sewage ponds. *Freshwat. Biol.* 4: 223-226.
- Guerrero, R., C. Abella y 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.
- Guillard, R.L. y J.M. Ryther, 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.
- Guisett, A., 1977. General distribution of planktonic rotifers in Spanish reservoirs. *Arch. Hydrobiol. Beich.* 8: 222-225.
- Hakim, G., E. Carpena, P. Cortesi y G. Isani, 1985. Regulation by phosphorylation dephosphorylation of pyruvate kinase in *Venus gallina* and *Scapharca inaequivalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 109-112.

- Halarnkar, P.P. y G. J. Blomquist, 1989. Mini-Rewiew. Comparative aspects of propionate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 227-231.
- Hammen, C.S., 1975. Succinate and lactate oxidoreductases of bivalve mollusks. *Comp. Biochem. Physiol.* 50B: 407-412.
- Herzig, A., 1987. The analysis of planktonic rotifer populations: A plea for long-term investigations. *Hydrobiologia* 147: 163-180.
- Hino, A y R. Hirano, 1980. Relationship between body size of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the maximum size of particles ingested. *Bull. Jpn. Sci. Fish.* 46: 1217-1222.
- Hino, A y R. Hirano, 1984. Relationship between body size of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the minimum size of particles ingested. *Bull. Jpn. Sci. Fish.* 50: 1139-1144.
- Hirata, H. y Y. Mori, 1967. Mass-culture of the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*, fed on the bread yeast. *Saibai-gyogyo* 5: 36-40.
- Hirata, H., 1979. Rotifer culture in Japan. *Spc. Publ. Europ. Maricult. Soc.*, 4: 361-388.
- Hirata, H., 1980. Culture methods of the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Min. Rev. Data File Fish. Res.*, 1: 27-46.
- Hirayama, K., Watanabe y T. Kusano, 1973. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. III Influence of phytoplankton density on population growth. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39: 1123-1127.
- Hirayama, K. y K. Watanabe, 1973. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. IV Nutritional effect of yeast on population growth rotifer. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39: 1223-1127.
- Hirayama, K. y K. Nakamura, 1976. Fundamental studies on the physiology of rotifers in mass culture. V. Dry *Chlorella powder* as food for rotifers. *Aquaculture*, 8: 301-307.
- Hirayama, K., K. Takagi y H. Kimura, 1979. Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.* 45(1): 11-16.
- Hirayama, K. y H. Funamoto, 1983. Supplementary effect of several nutrients on nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 49: 505-510.
- Hirayama, K., 1985. Biological aspect of the rotifer *Brachionus plicatilis* as a food organism for mass culture seedling. *Coll. Fr. Japon. Oceanogr. Marseille* 12-21 Sep 85 8:41-50.
- Hirayama, K., 1987. A consideration of why mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with baker's yeast is unstable. *Hydrobiologia* 147: 269-270.

- Hirayama, K., I. Maruyama y T. Maeda, 1989. Nutritional effect of freshwater *Chlorella* on growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 186/187: 39–42.
- Ho M. S. y P.L. Zubkoff, 1982. Anaerobic metabolism of the ribbed mussel *Geukensia demissa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 931–936.
- Hochachka, P.W. y T. Mustafa, 1972. Invertebrate facultative anaerobiosis. *Science* 178: 1056–1060.
- Hochachka, P.W. y T.P. Mommsen, 1983. Protons and anaerobiosis. *Science* 219: 1391–1397.
- Hochachka, P.W. y G.N. Somero, 1984. *Biochemical adaptation*. Princeton University Press. New Jersey, 537 pp.
- Hochachka, P.W., 1986. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231: 234–241.
- Hoffmann, K.H., 1981. Inhibition of *Tubifex* pyruvate kinase by storage phosphagens and adenosine triphosphate. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B: 77–83.
- Hofmann, W., 1975. The influence of spring circulation on zooplankton dynamics in the Plußsee. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19: 1241–1250.
- Hofmann, W., 1977. The influence of abiotic environmental factors on population dynamics in planktonic rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 77–83.
- Hofmann, W., 1987. Population dynamics of hypolimnetic rotifers in the Plußsee (North Germany). *Hydrobiologia* 147: 197–201.
- Hofmann, W. y H.J. Krambeck, 1991. Manipulation of the thermocline in a eutrophic lake: the response of the zooplankton. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24: 786–790.
- Holwerda, D. A. y A. De Zwaan, 1980. On the role of fumarate reductase in anaerobic carbohydrate catabolism of *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 447–453.
- Holwerda, D.A. y P.R. Veenhof, 1984. Aspects of anaerobic metabolism in *Anodonta cygnea* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 707–711.
- Holder, M., y Rej R., 1983. Alanine Aminotransferase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Voll III. Edited by Bergmeyer H.U.), pp 444–456. Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach. Florida Basel.
- Hutchinson, G.E., 1967. *A treatise of limnology*. Vol. 2. Wiley N.Y. 1115 pp.
- Isani, G., O. Cattani, E. Carpené, S. Tacconi y P. Cortesi, 1989. Energy metabolism during anaerobiosis and recovery in the posterior adductor muscle of the bivalve *Scapharca inaequivalvis* (Bruguere). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 193–200.

- Ito, T., 1960. On the culture of mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller in the sea water. Rep. Fac. Fish. Prefect. Univ. Mie. 3: 708-740.
- James, C.M., M. Bou-Abbas, A.M. Al-Khars, S. Al-Hinty y A.E. Salman 1983. Production of the rotifer *Brachionus plicatilis* for aquaculture in Kuwait. *Hydrobiologia* 104: 77-84.
- James, M.C., P. Dias y A.E. Salaman, 1987. The use of marine yeast (*Candida sp*) and bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in combination with *Chlorella sp.* for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 147: 263-268.
- Jorgensen, B. B., J.G. Kuenen y Y. Cohen, 1979. Microbial transformations of sulfur compounds in stratified lake (Solar Lake, Sinai). *Limnol. Oceanogr.* 24: 799-822.
- Kawano, T., A.M. Al-Khars, S. Al-Mattar y S.M. Kamel, 1978. Marine microorganism culture and production under Kuwait conditions. *Kuwait Inst. Sci. Res., Ann. Res. Rep.*: 63-67.
- King, C. E., 1967. Food age and the dynamics of a laboratory population of rotifers. *Ecology* 48:111-128.
- King, C.E. y T.W. Snell, 1977. Sexual recombination in rotifers. *Heredity* 39:357-360.
- King, C.E. y T.W. Snell, 1978. Culture media (natural and synthetic): Rotifera CRC Handbook series in nutrition and food (Section G: Diets, culture media, food supplements): 71-75.
- King, C.E., 1980. The genetic structure of zooplankton populations. In: Kerfoot W.C. (Ed) The structure of zooplankton communities. New England University Press. In press.
- King, C.E. y M.R. Miracle, 1980. A perspective on aging in rotifers. *Hydrobiologia* 73: 13-19.
- Kjensmo, J., 1967. The development and some main features of "iron-meromictic" soft water lakes. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 32: 137-312.
- Kleinow, W., 1993. Biochemical studies on *Brachionus plicatilis*: hydrolytic enzymes, integument proteins and composition of trophi. *Hydrobiologia* 255/256: 1-12.
- Kluytmans, J.H., A.M.T. De Bont, J. Janus y T.C.M. Wijsman, 1977. Time dependent changes in the accumulation of anaerobic fermentation products in the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B: 81-87.
- Kluytmans, J.H., D.I. Zandee, W. Zurburg y H. Pieters, 1980. The influence of seasonal changes on energy metabolism in *Mytilus edulis* (L.). III Anaerobic energy metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 307-315.
- Kluytmans, J. H. , A.M.T. De Bont, E.C.J. Krutwagen, H.J.L. Ravesteyn y P.R. Veenhof, 1983. Anaerobic capacities and anaerobic energy production of some mediterranean bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B: 171-179.

- Koormann, R. y M. Grieshaber, 1980. Investigations on the energy metabolism and on octopine formation of the common whelk *Buccinum undatum* L. during escape and recovery. *Comp. Biochem Physiol.* 65B: 543–547.
- Koste, W., 1978. *Rotatoria* (2 vols). Borntraeger Berlin 637pp + 234 pls.
- Koste, W., 1980a. Portrait of Rotifera: *Brachionus plicatilis*, a freshwater rotifer. *Mikrokosmos* 69:148–155.
- Koste, W., 1980b. On two planktonic rotifers, *Filinia australiensis* n. sp. and *Filinia hofmanni* n. sp. with remarks on the taxonomy of the longiseta–terminalis group. Genus *Filinia* Bory de St. Vincent, 1824, Family Filiniidae Bartos 1959, (Superorder Monogononta). *Arch. Hydrobiol.* 90, 2: 230–256.
- Koste, W. 1991. *Anuraeropsis miraclei* a new planktonic rotifer species in karstic lakes. *Hydrobiologia* 209:169–173.
- Larsson, P., 1971. Vertical distribution of planktonic rotifers in a meromictic lake, Blankvatn near Oslo, Norway. *Norweg. J. Zool.* 19: 47–75.
- Lehninger, A.L., 1978. *Bioquímica*. Ed. Omega (Barcelona). 1117 pp.
- Leimeroth, N., 1980. Respiration on different stages and energy budgets of juvenile *Brachionus calyciflorus*. *Hydrobiologia* 73: 195–197.
- Lindström, K. y B. Pejler, 1975. Experimental studies on the seasonal variation of the rotifer *Keratella cochlearis* (Gosse). *Hydrobiologia* 2–3: 191–197.
- Livingstone, D.R., 1983. Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. *J. Geol. Soc. London* 140:27–37.
- Loomis, S.H., J.F. Carpenter, T.J. Anchoroguy, J.H. Crowe y B.R. Branchini, 1989. Cryoprotective capacity of end products of anaerobic metabolism. *J. Exp. Zool.* 252: 9–15.
- Lorenzen, S., 1985. Phylogenetic aspects of pseudocoelomate evolution. 210–223. En: S Conway Morris, J. D. George y H.M. Platt (Ed). *The origins and relationships of lower invertebrates*. Systematics Association, Vol 28. Clarendon Press, Oxford.
- Lubzens, E., 1981. Rotifer resting eggs and their application to marine aquaculture. *Eur. Maricult. Soc. Spec. Publ.* 6: 163–179.
- Lubzens, E., 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147: 245–255.
- Luciani, A., 1982. Contribution à l'étude du vieillissement chez le rotifere *Brachionus plicatilis*: nage, cils et battements ciliares, métabolismes énergétique. Thèse de doctoract 3^{ème} cycle. Université Lyon I.
- Maëmets, A., 1983. Rotifers as indicators of lake types in Estonia. *Hydrobiologia* 104: 357–361.

- Margalef, R., 1955. Los organismos indicadores en la limnología. Ministerio de Agricultura (Inst. Forestal Inv. y Exp.), Madrid, 300 pp.
- Margalef, R., D. Planas, J. Armengol, A. Vidal, N. Prat, A. Guiset, J. Toja y M. Estrada, 1976. Limnología de los embalses españoles. Ministerio de Obras Públicas Vol I. Publicación nº 123, 422pp. Madrid.
- Massana, R. y Pedrós-Alió, 1992. Feeding by a metalimnetic *Anuraeopsis* on phototrophic purple bacteria. Actas VI International Rotifers Symposium. Banyoles (Spain).
- Matveeva, L. K., 1986. pelagic rotifers of lakes Glubokoe from 1897 to 1984. Hydrobiologia 141: 45-54.
- May, L., 1983. Rotifer occurrence in relation to water temperature in Loch Leven Scotland. Hydrobiologia 104: 311-315.
- May, L., 1985. The use of procaine hydrochloride in the preparation of rotifer samples for counting. Verh. Internat. Verein. Limnol. 22: 2987-2990.
- Meinardus-Hager, G. y G. Gäde, 1981. Anaerobic metabolism of the common cockle (*Cardium edule*) IV. Time dependent changes of metabolites in the foot and gill tissue induced by anoxia and electrical stimulation. Comp. Biochem. Physiol. 70B: 271-277.
- Meinardus-Hager, G. y G. Gäde, 1987. Recovery from environmental anaerobiosis and muscular work in the cockle *Cardium tuberculatum*: Oxygen debt and metabolic responses. J. Exp. Zool. 242: 291-301.
- Mikschi, E., 1989. Rotifer distribution in relation to temperature and oxygen content. Hydrobiologia 186/187: 209-214.
- Minkoff, G., E. Lubzens y D. Kahan 1983. Environmental factors affecting hatching of rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting eggs. Hydrobiologia 104: 61-69
- Miracle, M.R., 1976. Distribución en el espacio y en el tiempo de las especies del zooplancton del lago de Banyoles. Ministerio de agricultura, instituto nacional para la conservación de la naturaleza. Monografías 5, Madrid 270pp.
- Miracle, M.R., 1977. Migration, patchiness, and distribution in time and space of planktonic rotifers. Arch. Hydrobiol. Beich. 8: 19-37.
- Miracle, M.R., 1982. Biogeography of the freshwater zooplanktonic communities of Spain. J. Biogeogr. 9: 455-467.
- Miracle, R., y E. Vicente, 1983. Vertical distribution and rotifer concentrations in the chemocline of meromictic lakes. Hydrobiologia 104: 259-267.

- Miracle, M.R., y 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., M. Serra, E. Vicente y C. Blanco, 1987. Distribution of *Brachionus* species in spanish mediterranean wetlands. *Hydrobiologia* 147: 75–81.
- Miracle, M.R., M. Serra, R. Oltra, y E. Vicente, 1988. Differential distributions of *Brachionus* species in three coastal lagoons. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 23: 2006–2015.
- Miracle, M.R., y M. Serra, 1989. Salinity and temperature influence in rotifer life history characteristics. *Hydrobiologia* 186/187: 81–102.
- Miracle, M.R., E. Vicente, R.L. Croome y P.A. Tyler, 1991. Microbial microcosms of the chemocline of a meromictic lake in relation to changing levels of PAR. *Ver. Internat. Verein. Limnol.* 24: 1139–1144.
- Miracle, M.R., E. Vicente y C. Pedrós–Alió, 1992. Biological studies of spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica* 8: 59–77
- Miracle, M.R. y M.T. Alfonso. 1993. Rotifer vertical distributions in a meromictic basin of lake Banyoles (Spain). *Hydrobiologia* 255/256: 371–380.
- Mourik, J., 1983. Oxidations in the tricarboxylic acid cycle by intact mitochondria isolated from the lateral red muscle of goldfish (*Carassius auratus* L.). Effects of anoxia on the oxidation of pyruvate and glutamate. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B: 851–859.
- Mustafa, T. y P.W. Hochachka, 1973. Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs II. Basic catalytic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase in oyster adductor muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 45B: 639–655.
- Navarro, E. y M. Ortega, 1984. Amino acid accumulation from glucose during air exposure and anoxia in the sea anemone *Actinia equina* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 199–202.
- Nogrady, T., 1988. The littoral rotifer plankton of the Bay of Quinte (lake Ontario) and its horizontal distribution as indicators of trophy. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 79 2/3: 145–165.
- Ortega, A., E. Santaella, A. Garcia, M. Olmedo y J.B. Peleteiro, 1983. Cultivo de dorada *Sparus aurata* L. en el centro del Mar Menor durante la temporada 1978–1979. *Inf. Téc. Inst. Esp. Oceanogr.* 5: 1–29
- Outlaw, W.H. y S.A. Springer, 1983. Malic Enzyme. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol III. (Edited by Bergmeyer H.U.) pp 176–183. Verlag Chemie Weinheim. Deerfield Beach, Florida Basel.
- Pant, M.C., A. Joshi y P. C. Sharma, 1985. Species composition, temporal abundance and community structure of zooplankton in lake SatTal (U.P.), India. *Arch. Hydrobiol.* 102 4: 519–535.

- Pejler, B., 1956. Introgression in planktonic rotatoria with some points of view on its causes and conceivable results. *Evolution* 10: 246-261.
- Pejler, B., 1957a. Taxonomical and ecological studies on planktonic rotatoria from Northern Swedish Lapland. *K. Svenska Vet. Akad. Handl. ser. 4*, 6(5): 1-68.
- Pejler, B., 1957b. Taxonomical and ecological studies on planktonic rotatoria from Central Sweden. *K. Svenska Vet. Akad. Handl. ser. 4*, 6(7): 1-52.
- Pejler, B., 1961. The zooplankton of Osbysjon, Djursholm. I. Seasonal and vertical distribution of the species. *Oikos*. 12: 225-248.
- Pejler, B., 1965. Regional-ecological studies of Swedish fresh-wates zooplankton. *Zool. Bidrag, Uppsala Bd* 36:4 408-515.
- Pejler, B., 1974. On the Rotifer Plankton of Some East African Lakes. *Hydrobiologia* 44: 389-396.
- Pejler, B., 1977a. On the global distribution of the family Brachionidae (Rotatoria). *Arch. Hydrobiol. suppl.* 53: 255-306.
- Pejler, B., 1977b. General problems on rotifer taxonomy and global distribution. *Arch. Hydrobiol. Beih* 8: 212-220.
- Pejler, B., 1983. Zooplanktic indicators of trophy and their food. *Hydrobiologia*. 101: 111-114.
- Person-Le Ruyet, J., 1975. Techniques d'élevage en masse d'un rotifère (*Brachionus plicatilis* Müller) et d'un Crustacé Branchiopode (*Artemia salina* L.). 10th Europ. Symp. Mar. Biol., Ostend, Belgium, Sept. 17-23, 1975, 1: 331-343.
- Plasota, K., M. Plasota y W.J.H. Kunicki-Goldfinger, 1980. Methods for obtaining an axenic culture of *Habrotocha rosa* Donner 1949. *Hydrobiologia* 73: 37-38.
- Pourriot, R., 1965. Recherches sur l'écologie des rotifères. Supplément 21 a "Vie et milieu". Masson, Paris. 224pp.
- Pourriot, R., y M. Deluzarches, 1970. Sur la consommation d'oxigene par les rotiferes. *Ann. Limnol.* 6: 229-248.
- Pourriot, R., 1973. influence de la teneur en protéines, de la température et du jeûne sur la respiration de rotifères héléoplanctoniques. *Verh. internat. Verein. Limnol.* 18:1429-1433.
- Pourriot, R., 1977. Food and feeding habits of rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 243-260.
- Pourriot, R. y P. Champ, 1981. Relations entre respiration et pois du corps chez le zooplancton d'eau douce. *Ann. Limnol.* 17(3): 237-241.

- Pourriot, R. y T.W. Snell 1983. Resting eggs in rotifers. *Hydrobiologia* 104: 213–214.
- Powell, E.N., M.A. Crenshaw y R.M. Rieger, 1980. Adaptations to sulfide in sulfide–system meiofauna. Endproducts of sulfide detoxification in three Turbellarians and a Gastrotrich. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2: 169–177.
- Prestwich, K.N. y N.H. Ing, 1982. The activities of enzymes associated with anaerobic pathways glycolysis and the Krebs cycle in Spiders. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B: 295–302.
- Reale, D., P. Clément y A. Esparcia, 1993. Influence of the concentration of oxygen on the swimming path of *Brachionus plicatilis* (Rotifers). *Hydrobiologia* 255/2256: 87–93.
- Reguera, B., C. Mosquera y C. Fernandez, 1982. Consideraciones acerca de la producción masiva del rotífero *Brachionus plicatilis* O.F. Müller alimentado con levadura de panificación. *Inf. Téc. Inst. Esp. Oceanogr.* 2:1–19.
- Ricci, C., 1987. Ecology of bdelloids: how to be successful. *Hydrobiologia* 147: 117–127.
- Rodrigo, M.A., E. Vicente y M.R. Miracle, 1993. Short–term calcite precipitation in the karstic meromictic lake La Cruz (Cuenca, Spain). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* (en prensa).
- Rojo, C., y M.R. Miracle, 1987. Poblaciones fitoplanctónicas de la laguna de La Cruz (Cuenca). Una laguna cársica meromíctica. *Act. VI Simp. Nac. Bot. Cript.*
- Rumengan, I.F.M., H. Kayano y K. Hirayama, 1991. Karyotypes of S and L type strains of the rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Müller. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 154: 171–176.
- Ruttner–Kolisko, A., 1972a. Rotatoria. *Die Binnengewässer* Bd. 26(1): 99–234.
- Ruttner–Kolisko, A., 1972b. Der Einfluss von Temperatur und Salzgehalt des Mediums auf Stoffweschel–und Vermehrungs Intensität von *Brachionus plicatilis* (Rotatoria). *Dt. Zool. Ges.* 65: 89–95.
- Ruttner–Kolisko, A., 1974. Plankton rotifers. *Biology and taxonomy. Biennengewässer* 26, 146pp.
- Ruttner–Kolisko, A. 1975. The vertical distribution of plankton rotifers in a small alpine lake with a sharp oxygen depletion (Lunzer Obersee). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19:1286–1294.
- Ruttner–kolisko, A., 1977. Amphoteric reproduction in a population of *Asplanchna priodonta*. *Archv. für Hydrobiologie Beiheft* 178–181.
- Ruttner–Kolisko, A., 1980. The abundance and distribution of *Filinia terminalis* in various types of lakes as related to temperature, oxygen, and food. *Hydrobiologia* 73: 169–175.

- Ruttner-Kolisko, A., y G. Malicky, 1988. Succession and abundance of rotifers in Lunzer Untersee as determined by biological interactions and abiotic events. *Verh. Internat. Vereim. Limnol.* 23: 510-515.
- Sakamoto, H. y K. Hyrayama, 1983. Dietary effect of *Thiocapsa roseopersicina* (Photosynthetic bacteria) on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Fac. of Fish. Nagasaki University.* 54:13-20.
- Saz, H.J. y A. Vidrine, 1959. The mechanism of formation of succinate and propionate by *Ascaris lumbricoides* mucle. *J. Biol. Chem.* 234: 2001-2005.
- Saz, H.J., 1981. Energy metabolism of parasitic helminths: Adaptations to parasitism. *Ann. Rev. Physiol.* 43: 323-341.
- Schlüter, M., 1980. Mass culture experiments with *Brachionus rubens*. *Hydrobiologia* 73: 45-50.
- Schlüter, M., J. Groeneweg y C. J. Soeder, 1987. Impact of rotifer grazing on population dynamics of green microalgae in high-rate ponds. *Water Research* 10: 1293-1297.
- Schöttler, U., 1977. The energy-yielding oxidation of NADH by fumarate in anaerobic mitochondria of *Tubifex sp.*. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B:151-156.
- Schöttler, U. y G. Wienhausen, 1981. The importance of the phosphoenolpyruvate-carboxykinase in the anaerobic metabolism of two marine polychaetes. In vivo investigations on *Nereis virens* and *Arenicola marina*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B: 41-48.
- Schöttler, U., G. Wienhausen y J. Westermann, 1984. Anaerobic metabolism in the lugworm *Arenicola marina* L.: The transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 93-103.
- Scott, J.M., 1981. The vitamin B₁₂ requeriment of the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 61: 983-994.
- Scott, J.M., 1983. Rotifer nutrition using supplemented monoxenic cultures. *Hydrobiologia* 104: 155-166.
- Serra, M. y M.R. Miracle, 1983. Biometric analysis of *Brachionus plicatilis* ecotypes from spanish lagoons. *Hydrobiologia* 104: 279-291.
- Serra, M., 1987. Variabilidad morfológica, isoenzimática y demográfica en poblaciones de *Brachionus plicatilis*. Diferenciación genética y plasticidad fenotípica. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Serrano, L., M.R. Miracle y M.Serra, 1986. Differential response of *Brachionus plicatilis* (Rotifera) ecotypes to various insecticides. *J. Environ. Biol.* 7: 259-275.
- Shulz, T.K.F. y J.H. Kluytmans, 1983. Pathway of propionate synthesis in the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B: 365-372.

- Siegmund, B., M. Grieshaber, M. Reitze, y E. Zebe, 1985. Alanopine and strombine are end products of anaerobic glycolysis in the lugworm *Arenicola marina* L. (Annelida Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.* 82B: 337-345.
- Simon, L.M., E.D. Robin y J.Theodore, 1979. Effects of sustained oxygen depletion on tissue PK activities in the freshwater turtle *Pseudemys scripta elegans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 283-285.
- Simpson, J. W. y J. Awapara, 1964. Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 12: 457-464.
- Simpson, J. W. y J. Awapara, 1966. The pathway of glucose degradation in some invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 18: 537-548.
- Smith, A.F., 1983. Malate dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol III. (Edited by Bergmeyer H.U.), pp 163-171. Verlag Chemie Weinheim. Deerfield Beach, Florida Basel.
- Skorkowski, E., J. Swlarczyński y Z. Aleksandrowicz, 1977. High activity of NADP-dependent malic enzyme in mitochondria from abdomen muscle of the crayfish *Orconetes limosus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B: 297-301.
- Skorkowski, E.I., 1988. Mini-Review. Mitochondrial malic enzyme from crustacean and fish muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 19-24.
- Snell, T.W. y B.L. Garman, 1986. Encounter probabilities between male and females rotifers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 97: 221-230.
- Snell, T.W y F.H. Hoff, 1987. Fertilization and male fertility in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 147: 329-334.
- Snell, T.W., M.J. Childress, E.M. Boyer y F.H. Hoff, 1987. Assessing the status of rotifer mass cultures. *Journal of the World Aquaculture Society* 18: 270-277.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf, 1979. *Biometría*. Ed. Blume, Madrid. 832 pp.
- Sorokin, Y. I., 1970. Interrelation between sulphur and carbon turnover in meromictic lakes. *Arch. Hydrobiol.* 66: 391-446.
- Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Whewlis y P.R. Painter, 1986. *The microbial world*. Pentice-Hall International, New Jersey USA. 689 pp.
- Starkweather, P.L., 1980. Aspects of the feeding behavior and trophic ecology of suspension-feeding rotifers. *Hydrobiologia*. 73: 63-72.
- Starkweather, P.L. y K. G. Bogdan, 1980. Detrital feeding in natural zooplankton communities: discrimination between live and dead algal foods. *Hydrobiologia*. 73: 83-85.

- Stewart, L.J. y D.G. George, 1987. Environmental factors influencing the vertical migration of planktonic rotifers in a hypereutrophic tarn. *Hydrobiologia*. 147: 203-208.
- Stitt, T.M., 1983. Fumarase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol IV. (Edited by Bergmeyer H.U.), pp 359-362. Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach. Florida Basel.
- Storey, K.B., 1986. Aspartate activation of pyruvate kinase in anoxia tolerant molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 807-812.
- Storey, K.B. y J.M. Storey, 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis hibernation and estivation. *Quat. Rev. Biol.* 65: 145-174.
- Sudzuki, M., 1964. New systematical approach to the japanese planktonic rotatoria. *Hydrobiologia* 23: 1-124.
- Surholt, B., 1977. Production of volatile fatty acids in the anaerobic carbohydrate metabolism of *Arenicola marina*. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B: 147-150.
- Swift, M.C. y U.T. Hammer, 1979. Zooplankton population dynamics and *Diaptomus* production in Waldsea lake, a saline "meromictic" lake in Saskatchewan. *J. Fish. Res. Board. Can.* 36: 1431-1438.
- Sylvester, D. y M. Krassner, 1976. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.* 55B: 443-447.
- Teshima, S.J., A. Kamazawa y M. Sakamoto, 1981. Attempts to culture the rotifers with microencapsulated diets. *Bull. jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47: 1575-1578.
- Theilacker, G.H. y M.F. McMaster, 1971. Mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* and its evaluation as a food for larval anchovies. *Mar. Biol.* 10: 183-188.
- Thillart, G. Van Den y I. De Vries, 1985. Excretion of volatile fatty acids by anoxic *Mytilus edulis* and *Anodonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B. 299-301.
- Umezurike, G.M. y A.O. Anya, 1978. Studies of energy metabolism in the endoparasite *Strongyluris brevicaudata* (Nematoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 59B: 147-151.
- Umezurike, G. M. y F.C. Chilaka, 1982. Succinate-DCPiP and NADH-Fumarate oxidoreductases in submitochondrial particles of the giant african snail (*Achatina achatina*) foot muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B: 181-185.
- Vassault, A., 1983. Lactate Dehydrogenase. UV-method with Pyruvate and NADH. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol III. (Edited by Bergmeyer H.U.), pp 118-126. Verlag Chemie Weinheim. Deerfield Beach, Florida Basel.

- Veeger, C., D.V. Der Vartanian y W.P. Zeylemaker, 1969. Succinate dehydrogenase. S.P. Colowick & N.O. Kaplan. Methods in enzymology Vol XIII. Citric Acid Cycle. Ed. J.M. Lowenstein. Academic Press New York and London.
- Vicente, E. y M.R. Miracle, 1988. Physicochemical and microbial stratification in a meromictic karstic lake of Spain. Verh. Internat. Verein. Limnol. 23: 522-529
- Voos, De C.G.N., 1980. Anaerobic metabolism in sublitoral living *Mytilus galloprovincialis* lam in the Mediterranean II. Partial adaptation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate-carboxykinase. Comp. Biochem. Physiol. 65B: 513-518.
- Voos, De C.G.N. y D.A. Holwerda, 1986. Anaerobic metabolism in sublitoral living *Mytilus galloprovincialis* lam. in the Mediterranean. III. The effect of anoxia and osmotic stress on some kinetic parameters of adductor muscle pyruvate kinase. Comp. Biochem. Physiol. 85B: 217-221.
- Waarde, A. V. y M. De Wilde-Van Berge Henegouwen, 1982. Nitrogen metabolism in Goldfish *Carasius auratus* (L.). Pathway of aerobic and anaerobic glutamate oxidation in Goldfish liver and muscle mitochondria. Comp. Biochem. Physiol. 72B: 133-136.
- Waarde, A.V., 1983. Review. Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. Comp. Biochem. Physiol. 74B: 675-684.
- Waarde, A.V., 1988. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds including the use of aminoacids for anaerobic energy production. Comp. Biochem. Physiol. 91B: 207-228.
- Walker, K.F., 1973. Studies on a saline lake ecosystem. Aust. J. Mar. Freshwat. Res. 24: 21-71.
- Walker, K.F., 1981. A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller 1786. Hydrobiologia 81: 159-167.
- Warren, L.M. y R.P. Dales, 1980. Glucose degradation in the polychaete annelid *Owenia fusiformis* delle Chiaje under anaerobic conditions. Comp. Biochem. Physiol. 65B: 443-445.
- Wicks, M.A. y P.R. Morgan, 1976. Effects of salinity on three enzymes involved in aminoacid metabolism from the american oyster *Crassostrea virginica*. Comp. Biochem. Physiol. 53B: 339-343.
- Weider, L.J. y W. Lampert, 1985. Differential response of *Daphnia* genotypes to oxygen stress: respiration rates, hemoglobin content and low-oxygen tolerance. Oecologia 65:487-591.
- Widdows, J., R.I.E. Newell y R. Mann, 1989. Effects of hypoxia and anoxia on survival energy metabolism and feeding of oyster larvae (*Crassostrea virginica* Gmelin). Biol. Bull. 177: 154-166.
- Wijsman, T.C.M., H.C.V. Lugt y H.P. Hoogland, 1985. Anaerobic metabolism in the fresh water snail *Lymnaea stagnalis*: Haemolymph as a reservoir of D-lactate and succinate. Comp. Biochem. Physiol. 81B: 889-895.

- Wijsman, T.C.M. y M.A. Hemminga, 1985. Anoxia, infection with *Trichobilharzia ocellata* and removal of the lateral lobes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. A re-evaluation of the hormonal control of oxidative ATP production. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 241-244.
- Wijsman, T.C., J.J. Maaskant, P. Balm y J. Klijnsstra, 1988. Hyperglycaemia in relation to anoxia and stress in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B: 55-63.
- Willamson, D.H., 1983. L-Alanine. Determination with alanine dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol VIII. (Edited by Bergmeyer H.U.) pp 341-344. Verlag Chemie Weinheim. Deerfield Beach, Florida Basel.
- Williamson, C. E., 1987. Predator-prey interaction between omnivorous diaptomid copepods and rotifers: the role of prey morphology and behavior. *Limnol. Oceanogr.* 32(1): 176-177.
- Wilms, A. L., R.D. Gulati y G. Postema, 1991. First attempt to measure the clearance rate of *Anuraeopsis fissa*. *Verch. Internat. Verein. Limnol.* 24: 742-744.
- Wilps, H. y U. Schöttler, 1980. In vitro-studies on the anaerobic formation of ethanol by the larvae of *Chironomus thummi thummi* (Diptera). *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 239-242.
- Windholz, M., S. Budavari, L.V. Stroumtsos y M.N. Fertig, 1976. The Merck Index. Pub. Merck & CO. IN (USA) 1313 pp.
- Wiseman, R.W. y W.R. Ellington, 1987. Energetics of contractile activity in isolated radula retractor muscles of the whelk *Busycon contrarium*: Anaerobic end product accumulation and release. *Biol. Bull.* 173: 277-288.
- Wissing, J. y E. Zebe, 1988. The anaerobic metabolism of the bitterling *Rhodeus amarus* (Cyprinidae, Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.* 89B: 299-303.
- Yasuda, K. y N. Taga, 1980. Culture of *Brachionus plicatilis* using bacteria as food. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46: 933-940.
- Yúfera, M. y E. Pascual, 1980. Estudio del rendimiento de cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis* O.F. Müller alimentados con levadura de panificación. *Inv. Pesq.* 44: 361-368.
- Yúfera, M., 1982. Aislamiento, caracterización y puesta en cultivo de una cepa de pequeño tamaño de *Brachionus plicatilis* O.F. Müller (1786). Tesis Doctoral U. de Sevilla, Sevilla.
- Zebe, E., 1982. Anaerobic metabolism in *Upogebia pugettensis* and *Callinasa californiensis* (Crustacea Thalassinidea). *Comp. Biochem. Physiol.* 72B-4: 613-617.
- Zurburg, W. y J.H. Kluytmans, 1986. Organ specific changes in energy metabolism due to anaerobiosis in the sea mussel *Mytilus edulis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 317-322.

V. APÉNDICES

A. DATOS CORRESPONDIENTES A LOS RECuentOS DE ROTÍFEROS EFECTUADOS EN LA LAGUNA DE LA CRUZ

En las siguientes tablas se muestran para cada uno de los meses y profundidades de muestreo los números de individuos (ind/l) de las diferentes especies de rotíferos localizadas en la laguna de La Cruz.

JUNIO (17-6-1987)

ROTÍFEROS (ind/l)	PROFUNDIDAD (m)									
	0.0	5.0	7.0	9.0	11.0	13.0	14.0	14.1	14.3	14.4
<i>Keratella quadrata</i>	0.2	18.0	56.7	44.3	31.0	127.0	251.0	136.5	65.5	26.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	0.0	1.0	25.3	10.7	9.3	27.7	49.0	24.5	12.5	2.5
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	4.5	8.0
<i>Trichocerca similis</i>	21.2	47.3	79.3	17.0	5.7	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.2	4.7	54.7	31.0	23.0	10.3	55.5	15.5	8.5	8.5
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.2	14.7	3.0	3.7	1.7	0.7	2.5	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.0	13.3	12.0	8.3	1.3	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	0.8	3.7	0.3	0.7	2.7	57.0	254.0	533.5	700.0	502.0
<i>Filinia hofmanni</i>	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Hexarthra mira</i>	0.4	26	0.7	0.3	1.0	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0

JULIO (17-7-1987)

ROTÍFEROS (ind/l)	PROFUNDIDAD (m)									
	0.2	5.0	7.0	9.0	11.0	12.5	13.0	13.2	13.4	13.6
<i>Keratella quadrata</i>	3.7	10.7	8.7	8.7	16.7	18.0	33.5	27.5	36.0	49.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	15.3	19.3	4.7	58.7	12.5	32.0	30.5	27.5	20.5	21.5
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0
<i>Trichocerca similis</i>	43.0	27.0	13.0	6.0	0.7	0.3	0.5	3.0	1.0	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.3	0.3	12.7	22.7	12.7	10.3	12.0	9.0	11.0	4.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.5	1.5	2.5	7.0	0.0	0.0	2.0	1.0	0.0	1.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	6.0	4.0	26.0	182.6	15.3	10.3	20.5	34.5	39.5	88.0
<i>Filinia hofmanni</i>	1.0	2.0	3.0	5.0	0.0	1.0	3.0	2.0	6.0	0.0
<i>Hexarthra mira</i>	133.0	145.5	15.7	4.0	1.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0

AGOSTO (27-8-1987)

ROTÍFEROS (ind/l)	PROFUNDIDAD (m)											
	5.0	7.0	9.0	10.0	12.0	13.0	14.0	14.5	14.7	15.0	15.2	15.5
<i>Keratella quadrata</i>	0.3	0.0	0.5	3.0	0.7	1.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.5
<i>Anuraeopsis fissa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	1.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	26.5	1424.0	3.5	1.0	0.5	4.5
<i>Trichocerca similis</i>	9.5	4.7	3.5	11.5	6.3	1.0	3.0	27.0	0.5	1.5	0.5	1.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	2.7	2.0	0.0	1.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.5	0.0	33.0	131.5	35.0	4.5	1.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	1.5	2.5	5.0	10.0	29.3	16.0	24.5	19.5	0.0	0.0	0.0	0.5
<i>Filinia hofmanni</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Hexarthra mira</i>	53.3	40.7	60.5	83.0	19.7	12.5	17.5	3.0	0.5	0.0	0.0	1.5

SEPTIEMBRE (25-9-1987)

ROTÍFEROS (ind/l)	PROFUNDIDAD (m)									
	1.0	5.0	9.0	10.0	10.5	11.5	12.0	13.5	13.7	13.9
<i>Keratella quadrata</i>	0.0	1.0	0.0	0.5	0.0	1.5	0.5	1.5	0.0	1.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	44.5	81.0	164.0	86.0	35.0	145.0	114.0	126.0	34.0	44.0
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	11.0	1.0	3.5	2.5	10.5	10.5	3.0	338.0	1166.0	10569.0
<i>Trichocerca similis</i>	13.5	37.5	13.0	4.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.0	0.0	0.0	1.5	3.5	6.5	2.5	4.0	0.0	1.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.0	5.5	3.5	0.0	2.0	3.0	3.0	0.5	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	1.5	7.5	11.0	23.0	8.5	1.5	0.5	0.5	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	3.5	1.5	2.0	1.5	6.5	86.0	106.0	544.0	303.0	343.0
<i>Filinia hofmanni</i>	0.0	0.0	1.0	1.0	0.5	2.0	0.5	0.0	1.0	0.0
<i>Hexarthra mira</i>	41.5	25.5	23.5	22.0	28.0	80.5	97.5	8.5	2.0	1.0

SEPTIEMBRE (25-9-1987)

ROTÍFEROS (ind/l)	PROFUNDIDAD (m)								
	14.0	14.2	14.4	14.5	14.6	14.7	14.8	14.9	15.0
<i>Keratella quadrata</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	26.0	88.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	2.0
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	22830.0	24202.0	28037.0	15000.0	2419.0	534.0	187.0	6.0	4.0
<i>Trichocerca similis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	226.0	32.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Filinia hofmanni</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Hexarthra mira</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0

NOVIEMBRE (27-11-1987)

ROTÍFEROS (ind/l)	PROFUNDIDAD (m)							
	16.9	17.0	17.1	17.2	17.3	17.4	17.5	18.0
<i>Keratella quadrata</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	5.0	2.0	2.0	9.0	1.0	1.5	0.0	2.0
<i>Trichocerca similis</i>	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	0.5	0.5	1.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
<i>Filinia hofmanni</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Hexarthra mira</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

FEBRERO (20-2-1988)

	PROFUNDIDAD (m)					
ROTÍFEROS (ind/l)	18.4	18.5	18.6	18.7	18.8	19.0
<i>Keratella quadrata</i>	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	2.7	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	936.7	608.0	8.0	17.0	51.3	15.0
<i>Trichocerca similis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	22.0	7.0	2.0	1.7	1.3	0.0
<i>Filinia hofmanni</i>	4.3	2.0	0.0	0.7	0.3	0.7
<i>Hexarthra mira</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

ABRIL (14-4-1988)

	PROFUNDIDAD (m)											
ROTÍFEROS (ind/l)	15.8	15.9	16.0	16.1	16.2	16.3	16.4	16.5	16.6	16.7	16.8	17.0
<i>Keratella quadrata</i>	0.5	0.5	0.0	1.5	0.0	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	6.0
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	98.5	85.5	98.5	268.0	85.0	6.0	4.0	19.5	27.5	25.5	10.5	0.0
<i>Trichocerca similis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	15.0	16.5	14.5	25.5	6.0	0.0	1.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0
<i>Filinia hofmanni</i>	1.0	9.5	2.5	3.5	2.0	0.0	0.0	0.5	2.5	1.5	0.0	0.0
<i>Hexarthra mira</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

JUNIO (4-6-1988)

ROTÍFEROS (ind/l)	PROFUNDIDAD (m)										
	13.1	13.2	13.3	13.4	13.5	13.6	13.7	13.8	13.9	14.0	14.2
<i>Keratella quadrata</i>	26.5	15.0	30.0	18.0	11.0	4.0	1.0	0.0	0.5	0.0	0.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	1526.5	1051.5	1381.5	1138.0	725.5	475.0	119.0	23.0	7.5	51.0	78.5
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	18.5	7.5	21.5	102.5	662.5	1328.5	236.0	44.5	10.0	1.5	64.0
<i>Trichocerca similis</i>	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	1.0	1.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	99.0	81.0	78.0	123.0	120.0	127.0	48.5	6.5	1.5	0.5	1.0
<i>Filinia hofmanni</i>	9.0	4.5	7.0	19.0	33.5	60.0	12.0	7.5	1.5	0.5	3.5
<i>Hexarthra mira</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

SEPTIEMBRE (30-9-1988)

ROTÍFEROS (ind/l)	PROFUNDIDAD (m)									
	0.5	5.0	7.7	11.0	12.0	12.5	12.7	13.0	13.1	13.2
<i>Keratella quadrata</i>	0.7	2.5	5.0	16.0	89.0	175.0	374.0	322.0	257.0	197.0
<i>Anuraeopsis fissa</i>	470.0	415.0	1876.0	3806.0	5584.0	11667.0	6213.5	12634.0	8694.0	8839.0
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	0.0	1.5	3.0	7.0	1.0	16.0	14.0	27.0	18.0	5.0
<i>Trichocerca similis</i>	37.0	19.0	11.0	7.0	3.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	0.4	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Synchaeta pectinata</i>	0.0	0.0	9.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	3.0	14.0	174.0	558.0	735.5	522.0	632.5	2152.0	1746.0	1390.0
<i>Filinia hofmanni</i>	1.0	1.5	1.0	7.5	2.0	0.0	1.0	4.0	8.0	10.0
<i>Hexarthra mira</i>	80.5	38.0	107.0	13.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

**B. DATOS CORRESPONDIENTES A LAS MÁXIMAS POBLACIONES DE ROTÍFEROS
PARA CADA ESPECIE Y MES**

Apéndice B. Valores de los parámetros físico-químicos en los que se detectan las máximas poblaciones de rotíferos (ind/l) para cada especie y mes.

	1987				1988					
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP
	----- Mezcla									
<i>Anuraeopsis fissa</i>										
Nº máximo	49	118	-	164	-	27.7	20.7	2565	9365	33379
Profundidad	14	14.4	-	9	-	10	0.5	12.5	10	13.4
Oxígeno	2.4	0.6	-	9.1	-	7.3	11.0	2.9	14.3	1.1
Temperatura	6.9	7.9	-	21.1	-	5.8	12.7	6.0	10.9	7.8
Conductividad	500	509	-	465	-	495	454	499	486	505
pH	8.5	8.1	-	8.8	-	8.5	8.5	8.1	8.8	7.8
Redox	409	276	-	371	-	395	345	328	394	325
<i>Anuraeopsis miraclei</i>										
Nº máximo	32	21	1424	28037	726	1209	268	1329	750	34
Profundidad	14.7	14.6	14.5	14.4	16.6	18.2	16.1	13.6	12.4	13.5
Oxígeno	0.2	0.5	1.1	0.8	3.5	3.2	1.4	0.3	1.1	0.6
Temperatura	6.5	7.7	8.4	8.8	8.9	5.7	5.5	5.9	7.1	7.6
Conductividad	504	509	504	520	533	502	519	503	512	506
pH	8.3	8.1	8.4	8.4	8.6	8.1	7.9	7.9	8.0	7.8
Redox	410	280	367	394	382	397	359	346	414	324
<i>Polyarthra dolichoptera</i>										
Nº máximo	700	626	29	544	77	178	122	127	478	4488
Profundidad	14.3	14.6	12.0	13.5	16.6	5.0	10.0	13.6	12.4	13.3
Oxígeno	1.0	0.5	8.3	6.6	3.5	5.8	11.3	0.3	1.1	1.6
Temperatura	6.7	7.7	11.2	9.9	8.9	7.8	6.0	5.9	7.1	7.8
Conductividad	502	509	504	495	533	494	431	503	512	505
pH	8.4	8.1	8.7	8.7	8.6	8.5	8.7	7.9	8.0	7.9
Redox	409	280	387	380	382	396	340	346	414	328

Apéndice B. Continuación.

	1987				1988					
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP

	Mezcla									
<i>Keratella quadrata</i>										
Nº máximo	251	751	3	2	1	2	244	30	702	428
Profundidad	14.0	14.4	10.0	11.5	5.0	0.0	0.5	13.3	12.2	13.3
Oxígeno	2.4	0.6	12.8	11.2	7.0	8.0	11.0	0.8	1.6	1.6
Temperatura	6.9	7.9	15.0	13.2	9.4	6.7	12.7	5.9	7.2	7.8
Conductividad	500	509	504	480	488	495	454	502	511	505
pH	8.5	8.1	8.8	8.8	8.7	8.5	8.5	7.9	8.0	7.9
Redox	409	276	383	378	384	396	345	347	414	328
<i>Filinia hofmanni</i>										
Nº máximo	1	18	1	1	3	4	10	60	304	28
Profundidad	7.0	14.6	14.5	11.5	16.6	18.4	15.9	13.6	12.4	13.7
Oxígeno	13.3	0.5	1.1	11.2	3.5	2.0	2.5	0.3	1.1	0.3
Temperatura	17.0	7.7	8.4	13.2	8.9	5.7	5.5	5.9	7.1	7.6
Conductividad	471	509	504	480	533	506	473	503	512	506
pH	8.8	8.1	8.4	8.8	8.6	7.9	8.0	7.9	8.0	7.9
Redox	395	280	367	378	382	385	360	346	414	321
<i>Hexarthra mira</i>										
Nº máximo	26	146	83	98	-	-	-	200	69	107
Profundidad	5.0	5.0	10.0	12.0	-	-	-	0.5	7.7	7.7
Oxígeno	9.9	10.0	12.8	10.5	-	-	-	9.3	17.1	10.1
Temperatura	19.6	24.0	15.0	12.3	-	-	-	20.2	17.7	18.6
Conductividad	479	474	504	480	-	-	-	478	478	458
pH	8.8	8.7	8.8	8.8	-	-	-	8.8	8.8	8.7
Redox	390	280	383	376	-	-	-	355	385	308

Apéndice B. Continuación.

	1987				1988					
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP
	----- Mezcla									
<i>Trichocerca similis</i>										
Nº máximo	79	43	27	38	4	-	12	45	54	37
Profundidad	7.0	0.2	14.5	5.0	10.0	-	0.5	0.5	0.5	0.5
Oxígeno	13.3	10.1	1.1	8.9	7.1	-	11.0	9.3	9.5	9.9
Temperatura	17.0	24.0	8.4	21.3	9.4	-	12.7	20.2	24.8	18.6
Conductividad	471	475	504	465	480	-	454	478	457	457
pH	8.8	8.8	8.4	8.8	8.7	-	8.5	8.8	8.7	8.9
Redox	395	278	367	375	387	-	345	355	367	297
<i>Synchaeta pectinata</i>										
Nº máximo	13	7	132	23	94	4	1	31	45	10
Profundidad	5.0	9.0	10.0	10.0	10.0	5.0	15.5	5.0	10.0	7.7
Oxígeno	9.9	14.4	12.8	12.2	7.1	7.8	3.3	10.5	14.3	10.1
Temperatura	19.6	14.8	15.0	16.6	9.4	5.9	5.5	18.6	10.9	18.6
Conductividad	479	470	504	465	480	494	473	478	486	458
pH	8.8	8.7	8.8	8.8	8.7	8.5	8.0	8.8	8.8	8.7
Redox	390	297	383	372	387	396	365	347	394	308
<i>Ascomorpha ecaudis</i>										
Nº máximo	56	23	1	7	9	1	3	-	-	1
Profundidad	14.0	9.0	5.0	11.5	15.0	5.0	5.0	-	-	11.0
Oxígeno	2.4	14.4	8.7	11.2	7.0	7.8	14.5	-	-	12.5
Temperatura	6.9	14.8	23.2	13.2	9.3	5.9	9.5	-	-	11.9
Conductividad	500	470	504	480	475	494	448	-	-	487
pH	8.5	8.7	8.8	8.8	8.7	8.5	8.8	-	-	8.6
Redox	409	297	390	378	385	396	334	-	-	319

Apéndice B. Continuación.

	1987				1988					
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP
	----- Mezcla									
<i>Ascomorpha saltans</i>										
Nº máximo	15	-	3	6	-	-	-	-	1	5
Profundidad	5.0	-	5.0	5.0	-	-	-	-	4.7	5.0
Oxígeno	9.9	-	8.7	8.9	-	-	-	-	11.3	10.1
Temperatura	19.6	-	23.2	21.3	-	-	-	-	23.2	18.6
Conductividad	479	-	504	465	-	-	-	-	457	457
pH	8.8	-	8.8	8.9	-	-	-	-	8.7	8.8
Redox	390	-	390	375	-	-	-	-	370	297
<i>Asplanchna girodi</i>										
Nº máximo	-	-	-	2	-	-	-	15	1	-
Profundidad	-	-	-	5	-	-	-	5	0.5	-
Oxígeno	-	-	-	8.9	-	-	-	10.5	9.5	-
Temperatura	-	-	-	21.3	-	-	-	18.6	24.8	-
Conductividad	-	-	-	465	-	-	-	478	457	-
pH	-	-	-	8.9	-	-	-	8.8	8.7	-
Redox	-	-	-	375	-	-	-	347	367	-

Unidades utilizadas: Profundidad (m); Temperatura (°C); Oxígeno (mg/l); Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$); Potencial de óxido-reducción (mV).

C. DATOS CORRESPONDIENTES A LOS CÁLCULOS DE LAS DISTRIBUCIONES EPI E HIPOLIMNÉTICAS DE LOS RECUENTOS DE ALGAS Y ROTÍFEROS EFECTUADOS EN LA LAGUNA DE LA CRUZ

Apéndice C. Distribución de organismos (Individuos. $10^3/m^2$) en la columna de agua durante el periodo de muestreo. E zona epilimnética. H zona hipolimnética.

	1987				1988						
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP	
Especies de rotíferos	----- Mezcla										
<i>Anuraeopsis fissa</i>	E	75.5	261.9	0.0	1209.5	0.0	219.7	62.8	3214.7	12294.8	14172.0
	H	96.5	121.8	0.0	110.6	0.0	18.4	0.8	10051.3	16638.1	27939.3
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	E	0.0	0.0	6.0	67.1	203.7	341.7	33.2	0.0	3.0	25.5
	H	9.5	6.9	557.3	16308.5	251.8	1155.6	185.4	545.2	282.1	30.7
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	E	16.9	537.5	41.5	224.5	437.2	1315.3	718.1	11.5	142.8	1422.5
	H	671.9	378.2	71.1	464.1	27.2	21.9	44.9	182.3	362.7	2770.3
<i>Keratella quadrata</i>	E	263.5	85.9	7.9	6.1	1.7	14.2	619.5	51.9	22.0	46.9
	H	443.9	466.3	2.1	1.1	0.0	0.5	1.5	67.1	1282.6	443.5
<i>Filinia hofmanni</i>	E	0.6	28.0	0.0	5.8	0.0	1.0	1.8	1.5	210.0	9.8
	H	0.0	12.2	0.3	0.2	1.5	2.2	4.8	23.1	400.2	12.2
<i>Hexarthra mira</i>	E	94.0	882.5	657.8	505.0	0.0	0.0	0.0	1015.5	379.0	692.5
	H	14.0	3.6	46.6	5.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Trichocerca similis</i>	E	411.2	243.0	94.8	228.3	38.2	0.0	29.8	196.1	260.0	212.0
	H	13.6	2.9	20.9	0.0	1.2	0.0	0.1	2.9	3.0	4.5
<i>Synchaeta pectinata</i>	E	87.2	29.0	315.5	87.4	1036.6	20.4	1.0	123.0	105.3	30.0
	H	2.9	1.5	41.0	0.3	17.2	0.0	0.1	4.6	11.2	0.0
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	E	188.4	83.9	4.0	11.8	88.2	3.0	16.7	0.0	0.0	1.5
	H	100.0	38.4	0.0	2.6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Ascomorpha saltans</i>	E	65.4	0.0	22.5	35.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	18.1
	H	5.8	0.0	1.3	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Asplanchna girodi</i>	E	0.0	0.0	0.0	7.6	0.0	0.0	0.0	158.7	2.5	0.0
	H	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Prof. metalimnética		10.0	10.5	11.5	13.0	16.0	16.0	13.5	9.0	10.0	11.0
Prof. extinción del O ₂		15.0	15.0	14.9	14.9	16.9	18.7	16.6	13.9	12.7	14.1

Apéndice C. Continuación.

		1987				1988					
		JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP
Grupos de algas		----- Mezcla -----									
<i>Peridinium</i>	E	272.0	266.1	307.9	1104.1	710.8	1647.9	4524.0	2053.7	1773.7	699.4
	H	235.1	40.4	429.8	333.4	21.7	86.1	18.3	225.3	15.4	315.3
<i>Gymnodium</i>	E	118.5	194.3	175.6	273.1	249.8	1194.8	405.9	183.8	199.9	73.6
	H	291.9	0.0	217.4	81.6	1.8	72.9	5.6	26.9	4.7	17.1
<i>Ceratium</i>	E	33.6	12.9	65.5	92	14.7	7.7	0.0	0.0	0.5	42.8
	H	9.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Cryptomonas</i>	E	416.1	551.6	904.9	1595.1	1665.2	2970.9	3352.0	1284.2	1074.9	1827.1
	H	3328.2	1694.8	3277.6	1993.4	258.8	593.6	606.7	1009.4	361.4	1433.1
<i>Rhodomonas</i>	E	1251.6	1013.8	4048.5	2938.1	1407.5	1988.7	1608.8	4216.5	8417.5	3388.9
	H	599.8	102.9	2722.0	200.9	85.6	57.3	41.7	799.4	39.6	298.9
<i>Cyclotella</i>	E	496.7	611.2	1331.1	5164.5	4160.7	3555.5	1179.6	1595.1	4532.2	3808.8
	H	10087.2	155.9	193.5	45.5	33.8	20.8	217.9	2329.5	709.7	120.6
<i>Navicula</i>	E	17.5	39.9	22.8	47.8	93.5	26.9	0.0	0.0	9.2	5708.9
	H	0.0	0.0	21.2	3.5	0.4	0.0	3.0	0.0	0.8	0.4
<i>Nitzschia</i>	E	0.0	1.4	0.0	98.8	26.9	41.7	83.1	13.9	0.0	2875.5
	H	13.7	1.0	94.3	22.4	6.4	0.9	7.1	13.4	1.3	37.0
<i>Crisoficeas</i>	E	855.3	983.1	1059.7	1647.2	1060.9	1438.8	4869.9	221.1	26.5	97.2
	H	435.2	582.2	1471.9	592.6	6.8	13.7	1.2	1.7	4.9	23.0
<i>Mallomonas</i>	E	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	H	6.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Astasia</i>	E	0.0	0.0	0.0	6.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0
	H	80.6	196.2	91.2	78.3	163.7	42.9	7.3	125.3	83.0	254.5
<i>Euglena</i>	E	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0
	H	0.0	8.7	3.9	0.0	3.9	0.1	0.5	0.1	1.4	1.5
Prof. metalimnética		10.0	10.5	11.5	13.0	16.0	16.0	13.5	9.0	10.0	11.0
Prof. extinción del O ₂		15.0	15.0	14.9	14.9	16.9	18.7	16.6	13.9	12.7	14.1

Apéndice C. Continuación.

		1987				1988					
		JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP
Grupos de algas		----- Mezcla									
<i>Trachelomonas</i>	E	10.7	4.9	8.9	77.9	31.6	49.3	1.4	0.0	0.9	5.5
	H	64.2	56.8	81.8	28.2	21.8	9.4	5.4	9.3	1.46	8.1
<i>Cosmarium</i>	E	24.9	29.1	1.5	217.7	0.0	5.3	0.0	0.0	7.75	3.1
	H	1.9	4.4	5.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0
<i>Monoraphidium</i>	E	88.3	2139.3	1436.4	1656.1	526.3	533.2	213	76.1	3803.9	919.4
	H	14.6	88.9	533.6	122.7	112.7	34.4	19.7	66.4	23.7	84.7
<i>Tetraedron</i>	E	0.0	0.0	0.0	22.2	52.9	24.7	0.0	0.0	0.0	58.1
	H	0.0	0.0	0.0	0.0	10.7	1.4	0.2	0.0	0.0	0.2
<i>Pedinomonas</i>	E	562.9	3728.5	10776.4	6824.6	1610.8	1459.8	17087.0	1327.1	2555.2	21443.7
	H	114.1	66.2	44473.8	1378.8	16.7	3.3	0.0	295.9	42.9	2141.4
<i>Scenedesmus</i>	E	90.5	533.2	43.4	171.8	147.9	365.3	235.2	104.6	389.6	1674.8
	H	8.1	51.95	144.1	29.5	20.2	44.4	50.9	103.0	18.8	125.5
<i>Chlorella</i>	E	293.5	544.4	399.2	257.3	0.0	53.0	0.0	28.1	1359.7	161.5
	H	101.0	15.2	0.0	255.2	0.0	0.0	0.0	0.0	68.7	46.1
<i>Crucigenia</i>	E	11189.9	55744.5	1996.9	1063.1	37.2	59.5	0.0	20.7	23134.7	7144.7
	H	843.5	4065.1	793.3	192.5	0.3	0.0	0.0	0.0	346.9	1757.6
<i>Pseudoquadrigula</i>	E	1884.3	742.2	128.4	0.0	34.7	0.0	0.0	52.5	0.0	0.0
	H	262.1	228.9	153.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.2
<i>Planctonema</i>	E	0.0	0.0	0.0	38.8	28.2	1.3	0.0	2.5	117.1	1050.3
	H	0.0	0.0	0.0	0.0	7.3	0.3	0.0	0.3	0.1	423.3
<i>Chlamydomonas</i>	E	66.2	629.2	1979.4	15.5	172.9	0.0	186.7	834.3	580.3	345.2
	H	413.0	126.7	2413.3	1.7	13.4	0.0	2.9	35.4	4.3	95.5
Prof. metalimnética		10.0	10.5	11.5	13.0	16.0	16.0	13.5	9.0	10.0	11.0
Prof. extinción del O ₂		15.0	15.0	14.9	14.9	16.9	18.7	16.6	13.9	12.7	14.1

**D. DATOS CORRESPONDIENTES A LOS CÁLCULOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-
QUÍMICOS CORRESPONDIENTES A LOS CENTROS DE GRAVEDAD DE LAS
DISTRIBUCIONES DE ROTÍFEROS EN EL PERFIL VERTICAL**

Tabla D.1. Temperatura media correspondiente al centro de gravedad de la distribución en el perfil vertical de cada especie de rotífero en cada fecha de muestreo. Además se calcularon las medias del periodo de mezcla y la de los periodos de estratificación.

Especies de rotíferos	1987				1988							Media	
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP	Mezcla	Estrat.	

										Mezcla	Estrat.		
<i>Anuraeopsis fissa</i>	9.0	10.3	-	14.6	-	5.8	9.4	6.3	9.1	8.2	7.6	9.6	
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	6.5	7.7	8.4	9.0	8.9	5.7	5.5	5.7	7.1	8.2	6.7	7.5	
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	6.7	8.7	11.1	10.0	9.1	5.9	6.1	5.6	7.9	8.2	7.0	8.3	
<i>Keratella quadrata</i>	8.3	8.1	12.5	13.3	9.4	6.0	12.5	6.2	7.3	8.2	9.3	9.1	
<i>Filinia hofmanni</i>	17.0	9.6	8.4	14.6	8.9	5.7	5.5	5.6	8.3	8.4	6.7	10.3	
<i>Hexarthra mira</i>	16.6	23.5	17.2	15.5	-	-	-	19.6	19.6	18.2	9.2	18.6	
<i>Trichocerca similis</i>	17.3	21.5	13.2	20.5	9.3	-	12.4	17.7	22.7	17.4	10.9	18.6	
<i>Synchaeta pectinata</i>	16.3	14.4	14.6	17.9	9.3	5.9	8.7	17.1	12.7	17.9	7.9	15.8	
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	10.3	11.5	19.1	12.8	9.4	5.8	9.1	-	-	11.9	8.1	13.1	
<i>Ascomorpha saltans</i>	16.2	-	19.9	16.9	-	-	-	-	23.2	18.6	-	18.9	
<i>Asplanchna girodi</i>	-	-	-	21.3	-	-	-	16.6	17.9	-	-	18.6	

Tabla D.2. Concentraciones de oxígeno (mg/l).

Especies de rotíferos	1987				1988							<u>Media</u>	
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP	Mezcla	Estrat.	
<i>Anuraeopsis fissa</i>	6.4	4.8	-	8.3	-	6.0	7.5	4.1	6.5	2.3	6.8	5.4	
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	0.3	0.6	1.4	1.7	3.5	3.1	2.6	0.5	1.1	2.4	3.1	1.1	
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	1.1	2.3	6.1	5.6	5.3	6.8	7.1	1.6	3.2	2.8	6.4	3.2	
<i>Keratella quadrata</i>	5.3	1.2	7.9	8.5	7.0	6.3	10.8	3.0	1.7	3.2	8.0	4.4	
<i>Filinia hofmanni</i>	13.3	3.3	1.1	9.9	4.1	2.3	2.6	0.8	3.5	2.3	3.0	4.9	
<i>Hexarthra mira</i>	10.4	10.4	10.5	10.3	-	-	-	9.8	14.8	10.2	6.4	10.9	
<i>Trichocerca similis</i>	11.8	10.4	6.0	9.1	6.4	-	10.8	11.6	10.2	10.1	8.6	9.9	
<i>Synchaeta pectinata</i>	11.6	10.5	12.0	10.9	6.8	7.7	6.7	13.4	13.9	10.3	7.1	11.8	
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	7.2	8.7	10.8	10.0	6.9	7.5	14.1	-	-	12.5	9.5	9.8	
<i>Ascomorpha saltans</i>	10.3	-	9.2	9.7	-	-	-	-	11.3	10.1	-	10.1	
<i>Asplanchna girodi</i>	-	-	-	8.9	-	-	-	15.6	11.9	-	-	12.1	

Tabla D.3. Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$).

Especies de rotíferos	1987				1988							<u>Media</u>	
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP	Mezcla	Estrat.	
<i>Anuraeopsis fissa</i>	489	496	-	483	-	497	473	497	501	504	485	495	
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	504	508	504	519	532	503	493	503	512	503	509	508	
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	502	503	504	503	508	496	462	501	508	503	489	503	
<i>Keratella quadrata</i>	492	507	504	486	489	497	455	498	511	504	480	500	
<i>Filinia hofmanni</i>	471	501	504	479	531	506	489	502	506	503	509	495	
<i>Hexarthra mira</i>	478	474	504	476	-	-	-	476	469	459	489	477	
<i>Trichocerca similis</i>	474	476	504	459	490	-	454	478	461	462	472	473	
<i>Synchaeta pectinata</i>	475	481	504	468	487	494	465	479	485	461	482	479	
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	487	486	504	483	479	494	446	-	-	487	473	490	
<i>Ascomorpha saltans</i>	478	-	504	462	-	-	-	-	457	457	-	472	
<i>Asplanchna girodi</i>	-	-	-	465	-	-	-	478	472	-	-	472	

Tabla D.4. pH.

Especies de rotíferos	1987				1988							<u>Media</u>	
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP	Mezcla	Estrat.	

	Mezcla									Mezcla	Estrat.		
<i>Anuraeopsis fissa</i>	8.6	8.3	-	8.8	-	8.4	8.3	8.1	8.3	7.9	8.4	8.3	
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	8.3	8.1	8.4	8.5	8.6	8.1	8.0	7.9	8.0	7.9	8.2	8.2	
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	8.4	8.2	8.6	8.7	8.7	8.4	8.3	7.9	8.1	8.0	8.5	8.3	
<i>Keratella quadrata</i>	8.6	8.1	8.6	8.8	8.8	8.4	8.5	8.1	8.0	8.1	8.6	8.3	
<i>Filinia hofmanni</i>	8.8	8.3	8.4	8.8	8.6	8.0	8.0	7.9	8.1	7.9	8.2	8.3	
<i>Hexarthra mira</i>	8.8	8.7	8.8	8.8	-	-	-	8.8	8.8	8.8	8.7	8.8	
<i>Trichocerca similis</i>	8.8	8.7	8.6	8.7	8.7	-	8.5	8.8	8.7	8.8	8.6	8.7	
<i>Synchaeta pectinata</i>	8.8	8.6	8.8	8.8	8.7	8.5	8.2	8.9	8.7	8.7	8.5	8.8	
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	8.6	8.5	8.8	8.8	8.7	8.5	8.8	-	-	8.6	8.7	8.7	
<i>Ascomorpha saltans</i>	8.8	-	8.8	8.6	-	-	-	-	8.7	8.9	-	8.8	
<i>Asplanchna girodi</i>	-	-	-	8.9	-	-	-	8.9	8.8	-	-	8.9	

Tabla D.5. Potencial de óxido-reducción(mV).

Especies de rotíferos	1987				1988							<u>Media</u>	
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP	Mezcla	Estrat.	

					Mezcla					Mezcla	Estrat.		
<i>Anuraeopsis fissa</i>	405	288	-	380	-	396	300	333	403	325	348	356	
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	409	280	366	393	380	391	357	341	410	324	376	360	
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	409	283	376	384	383	395	352	340	409	327	377	361	
<i>Keratella quadrata</i>	406	281	347	379	390	393	345	337	409	327	376	355	
<i>Filinia hofmanni</i>	395	284	367	376	382	364	356	340	404	322	367	355	
<i>Hexarthra mira</i>	393	280	380	379	-	-	-	352	379	303	368	352	
<i>Trichocerca similis</i>	393	283	370	375	382	-	346	346	373	302	364	349	
<i>Synchaeta pectinata</i>	394	294	382	374	387	396	356	346	393	309	380	356	
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	402	296	387	377	387	396	335	-	-	319	373	356	
<i>Ascomorpha saltans</i>	394	-	385	367	-	-	-	-	370	297	-	363	
<i>Asplanchna girodi</i>	-	-	-	375	-	-	-	348	381	-	-	368	

Tabla D.6. Profundidad (m).

Especies de rotíferos	1987				1988							Media	
	JN	JL	AG	SP	NV	FB	AB	JN	JL	SP	Mezcla	Estrat.	
<i>Anuraeopsis fissa</i>	12.38	12.42	-	10.73	-	12.61	7.36	12.17	11.16	13.11	9.99	11.99	
<i>Anuraeopsis miraclei</i>	14.65	14.48	14.48	14.23	16.38	17.97	15.66	13.53	12.40	13.10	16.67	13.84	
<i>Polyarthra dolichoptera</i>	14.39	13.67	12.53	13.45	13.91	7.43	12.57	13.02	11.90	13.00	11.30	13.14	
<i>Keratella quadrata</i>	12.89	14.16	11.77	11.23	10.50	8.76	1.01	12.19	12.19	12.99	6.76	12.49	
<i>Filinia hofmanni</i>	7.00	13.08	14.50	4.18	16.58	18.19	15.66	13.38	11.63	12.98	16.81	10.96	
<i>Hexarthra mira</i>	6.94	3.14	9.05	9.55	-	-	-	1.96	6.24	5.04	10.26	5.99	
<i>Trichocerca similis</i>	6.07	4.23	11.48	5.50	11.67	-	1.06	3.42	3.39	4.26	6.37	5.48	
<i>Synchaeta pectinata</i>	7.17	9.66	10.28	9.02	11.67	6.00	8.83	5.18	9.36	8.06	8.83	8.39	
<i>Ascomorpha ecaudis</i>	11.49	11.45	7.50	11.81	11.07	7.00	5.59	-	-	11.00	7.89	10.65	
<i>Ascomorpha saltans</i>	7.20	-	7.53	8.99	-	-	-	-	4.70	4.67	-	6.62	
<i>Asplanchna girodi</i>	-	-	-	5.00	-	-	-	4.58	5.25	-	-	4.94	

**E. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ANÁLISIS DE COMPONENTES
PRINCIPALES**

Apéndice E. Resultados correspondientes a los dos análisis de componentes principales realizados con 16 y 11 variables respectivamente. En el primer análisis se han considerado a las 11 especies de rotíferos y los 5 parámetros físico-químicos, previamente transformados logarítmicamente, mientras que el segundo contiene solamente a las especies de rotíferos

FACTORES

		1	2	3	4
KERA	1	0.049	0.830	-0.253	0.272
POLY	2	-0.030	0.852	0.181	0.153
AFISSA	3	0.073	0.807	-0.277	-0.281
AMIRA	4	-0.412	0.160	0.489	-0.353
HEX	5	0.826	-0.103	-0.141	-0.214
AECA	6	0.354	0.190	0.068	0.817
ASAL	7	0.589	-0.047	-0.068	0.269
TRICO	8	0.853	-0.035	-0.208	-0.141
SYN	9	0.672	-0.031	0.028	-0.040
FIL	10	-0.152	0.718	-0.156	-0.367
ASPL	11	0.348	-0.086	-0.167	-0.425
OXI	12	0.820	0.177	0.263	-0.083
TEM	13	0.882	-0.049	-0.243	-0.138
PH	14	0.886	0.021	0.304	0.065
REDOX	15	0.324	0.357	0.677	-0.055
COND	16	-0.120	0.071	-0.634	0.129

FACTORES

		1	2	3
KERA	1	-0.267	0.830	0.229
POLY	2	-0.438	0.704	0.167
AFISSA	3	-0.295	0.779	-0.310
AMIRA	4	-0.541	-0.171	-0.276
HEX	5	0.761	0.261	-0.257
AECA	6	0.282	0.350	0.774
ASAL	7	0.608	0.256	0.222
TRICO	8	0.781	0.361	-0.198
SYN	9	0.637	0.257	-0.126
FIL	10	-0.441	0.605	-0.366
ASPL	11	0.370	0.095	0.520

F. SINOPSIS DE LAS VÍAS BIOQUÍMICAS DE ALGUNOS ORGANISMOS EUCARIOTAS EN CONDICIONES LIMITANTES DE OXÍGENO.

En este apéndice se muestran los principales enzimas y productos implicados en la tolerancia a la anoxia en diversos organismos. En las observaciones se describen los resultados más significativos encontrados por los diferentes autores. El asterisco delante de algunos productos significa que en el estudio correspondiente el compuesto se marcó radioactivamente. Las abreviaturas usadas son las siguientes: **ADH**, alcohol-deshidrogenasa; **ALA**, alanina; **ASP**, aspartato; **CTE**, cadena de transporte electrónico; **DCIP**, diclorofenol-indofenol (aceptor); **DH**, deshidrogenasa; **EM**, enzima málico; **FDP**, fructosa-difosfato; **FR**, fumarato-reductasa **FUM**, fumarato; **GIDH**, glutamato-deshidrogenasa; **GOT**, glutamato-oxalacetato-transaminasa; **GPT**, alanina-deshidrogenasa; **aKG**, a-cetoglutarato; **LAC**, lactato; **LDH**, lactato-deshidrogenasa; **MAL**, malato; **MDH**, malato-deshidrogenasa; **OAA**, oxalacetato; **ODH**, octopina deshidrogenasa; **PEP**, fosfoenolpiruvato; **PEPCK**, fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa; **PK**, piruvato-quinasa; **PRO**, propionato; **PYR**, piruvato; **SDH**, succinato-deshidrogenasa; **SUC**, succinato; **TREO**, treonina.

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Saz y Vidrine (1959)	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Incorpora el carbono radiactivo proveniente de glucosa y lactato en succinato. El succinato proviene de la carboxilación del piruvato. Incorporación de CO ₂ en piruvato catalizada por el EM. El succinato parece ser un precursor de propionato y metilbutirato, así como de otros ácidos grasos volátiles.	<pre> graph TD Glucosa --> Lactato Glucosa --> Succinato Succinato --> Propionato Succinato --> Metilbutirato </pre>
Simpson y Awapara (1964)	Moluscos	Evalúan propionil-CoA-carboxilasa, PYR-carboxilasa, EM y PEPCK. Encuentran que el CO ₂ es incorporado en aspartato, glutamato y alanina. En aguas salobres hay mayor actividad de PEPCK y EM. El enzima málito no presenta actividad cuando existe gluconeogénesis.	
Simpson y Awapara (1966)	Moluscos	Evalúan LDH, PK, PEPCK y MDH. Introducen glucosa. Encuentran un aumento de succinato y poco lactato. Detectan PEPCK y PK pero mayor acción del primero. También encuentran MDH y Fumarasa.	<p>Piruvato → → → → → Succinato</p>
Chen y Awapara (1969)	<i>Rangia cuneata</i>	La glucosa degradada por vía anaeróbica rinde succinato, alanina y en menor cantidad lactato. En glucólisis aeróbica se detecta mayor concentración de alanina. Si se asumía el Ciclo de Krebs no se explicaba la acumulación de alanina. Midieron sustratos del Ciclo de Krebs y el ciclo no funcionaba.	<p>PEP → OAA → MAL → FUM → SUC</p>
Hochachka y Mustafa (1972)	Moluscos	Revisión de mecanismos enzimáticos de tolerancia a la anoxia. La ruta propuesta se ha simplificado ya que además proponen rutas de degradación de aminoácidos más complejas.	<pre> graph TD PEP --> PYR PEP --> OAA PYR --> Alanina OAA --> MAL MAL --> FUM FUM --> SUC </pre>
Mustafa y Hochachka (1973)	Moluscos	Estudian la función de la PEPCK en la transición del metabolismo aeróbico/anaeróbico. Encuentran una competencia entre PK y PEPCK; a pH superior a 6.5 activación de PK; a pH inferior a 6.5 activación de la PEPCK. Sugieren que existe una eliminación evolutiva de LDH.	<p>PEP → OAA</p> <p style="text-align: center;">PEPCK</p> <p>OAA → Malato</p> <p style="text-align: center;">MDH</p>

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Zwaan y Marrewijk (1973)	<i>Mytilus edulis</i>	En anaerobiosis se produce un aumento de glutamato y succinato, una disminución de lactato, mientras que la alanina permanece constante. El succinato es oxidado en mayor grado que el lactato en anaerobiosis. La PK es inhibida por alanina y por el descenso de pH.	Piruvato —————> Alanina Fumarato —————> Succinato Cetoglutarato —————> Glutamato
Betterton y Dowda (1976)	<i>Trichomonas gallinae</i>	En anaerobiosis no encuentran PYR-descarboxilasa; SDH, ni Fumarasa. Sólo encuentran MDH y LDH.	OAA ——— MDH ———> MALATO
Ening <i>et al.</i> (1976)	Anuros	Estudian el efecto de la temperatura en el metabolismo del piruvato. EL exceso de piruvato inhibe a la LDH.	
Sylvester y Krassner (1976)	<i>Trypanosoma cruzi</i>	La incorporación de O ₂ es estimulada por L-prolina, L-glutamato y en menor grado por L-aspartato.	
Wickes y Morgan (1976)	<i>Crassostrea virginica</i>	Estudian el efecto de la salinidad en GIDH, PK y GOT. PK no varía con la salinidad. GIDH y GOT aumentan con la salinidad.	
Zwaan y Wijsman (1976)	Moluscos bivalvos	Revisión del metabolismo anaeróbico. La tasa metabólica decae en anaerobiosis. Los carbohidratos son la principal fuente de energía.	
Cataldi <i>et al.</i> (1977)	<i>Trypanosoma cruzi</i>	PEPCK muestra una gran actividad. Fermenta glucosa para rendir succinato.	Glucosa —>----->-----> Succinato

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Collicutt y Hochachka (1977)	<i>Crassostrea gigas</i>	En anoxia se acumulan alanina y succinato. De forma que la glucosa es metabolizada en alanina mientras que el succinato proviene del aspartato. El glutamato apenas se utiliza. Detectan un tercer producto no identificado. No se produce acumulación de lactato. No encuentran PEPCK.	<pre> graph LR Glucosa -.-> PEP PEP --> Alanina PEP --> a-KG Aspartato --> OAA OAA --> MAL MAL --> FUM FUM --> SUC Glutamato </pre>
Kluytmants <i>et al.</i> (1977)	<i>Mytilus edulis</i>	Estudian la producción de carbohidratos en anaerobiosis. Tanto propionato como succinato aumentan en anaerobiosis. El acetato no tiene una tendencia clara.	
Sorkowski <i>et al.</i> (1977)	<i>Orconetes limosus</i>	Se produce la inhibición de E. Málico-NADF dependiente por oxalacetato y piruvato.	
Schöttler (1977)	<i>Tubifex sp.</i>	Describe la oxidación de NADH por fumarato y formación de succinato.	
Surholt (1977)	<i>Arenicola marina</i>	Estudian la formación de ácidos grasos volátiles en anaerobiosis, los principales son propionato, acetato y formiato, también se produce un poco de succinato.	<pre> graph LR Glucosa -.-> Propionato Glucosa --> Acetato Glucosa --> Formiato </pre>
Umezurike y Anya (1978)	<i>Strongyluris brevicaudata</i>	Encuentran altos niveles de MDH, EM, PEPCK lactato, succinato y bajos niveles de PK. La fumarasa-reductasa aumenta en presencia de ADP y P _i .	<pre> graph LR PEP --> OAA PEP --> Piruvato OAA --> Malato Malato --> Succinato Piruvato --> Lactato Piruvato --> Ethanol </pre>
Ahmad y Chaplin (1979)	<i>Mytilus edulis</i>	Encuentran que las variaciones estacionales de succinato en el metabolismo anaeróbico no dependen de la temperatura. La incorporación de CO ₂ es mayor en verano que en invierno.	<pre> graph LR Glucosa -.-> Pyr Pyr --> Alanina Alanina --> AcCoA[Ac CoA] AcCoA --> Citrato Citrato --> Succinato Fumarato --> Succinato Glutamato --> Glutarato </pre>

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Sinon <i>et al.</i> (1979)	<i>Pseudemys scripta elegans</i>	El descenso de O ₂ incrementa la síntesis de PK en el músculo esquelético de tortuga. Aunque existen otros factores que regulan la actividad de PK además del oxígeno.	
Holverda y Zwaan (1980)	<i>Mytilus edulis</i>	Estudian el papel de la fumarato-reductasa en anaerobiosis. La fumarato-reductasa es inhibida por amital, antimicina, etanol, malonato, fosfato, rotenona y succinato; y estimulada por Mg ⁺² , succinato y propionato. La CTE está implicada en la reducción de fumarato a succinato. En las primeras etapas de anaerobiosis se acumulan alanina y succinato; en las finales succinato y propionato.	<p>Aspartato → OAA → Malato</p> <p>Fumarato → Succinato FR-SDH</p>
Kluytmants <i>et al.</i> (1980)	<i>Mytilus edulis</i>	Estudian los cambios estacionales en la acumulación de productos finales. El succinato es transformado a propionato en verano. Encuentran alta concentración de alanina en verano. La anaerobiosis afecta a glutamato y aspartato; el glutamato aumenta y el aspartato disminuye. Glutamato, aspartato y taurina altas en cualquier estación.	
Koormann y Grieshaber (1980)	<i>Bucinum undatum</i>	Describe la ruta para la formación de octopina.	PYR+L-Aginina → Octopina + H ₂ O
Vooy (1980)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Estudian el metabolismo anaeróbico. Alanina y ATP inhiben a la PK. Encuentran pHs óptimos iguales para PK y PEPCK tanto en <i>M. galloprovincialis</i> como en <i>M. edulis</i> .	
Warren y Dales (1980)	<i>Owenia fusiformis</i>	En anaerobiosis introducen glucosa marcada radiativamente y aparecen marcados alanina, aspartato, glutamato y glutamina. El aspartato es el sustrato para la producción anaeróbica de succinato.	

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Wilps y Schöttler (1980)	<i>Chironomus thummi thummi</i>	En anaerobiosis, metaboliza la fructosa 1-6DP a etanol y acetato. Además encuentran pequeñas cantidades de alanina, lactato y succinato que cesan cuando se inhibe la PYR-DH.	Pyr \longrightarrow Acetaldehído \longrightarrow Etanol
Zurburg y Kluytmans (1980)	<i>Mytilus edulis</i>	En anaerobiosis en músculo encuentran elevadas cantidades de alanina y glutamato y bajas de alanina en la hemolinfa. La concentración de succinato es elevada en todos los órganos salvo en la hemolinfa. Escasa acumulación de acetato y propionato. Además encuentran asparaguina, serina, treonina y prolina. También encuentran ácidos grasos volátiles que son excretados al agua.	
Hoffmann (1981)	<i>Tubifex sp.</i>	Se produce la inhibición de la PK por concentraciones altas de fosfágenos. En periodos cortos de anoxia se encuentra lactato y en largos succinato, propionato y acetato.	
Meinardus y Gäde (1981)	<i>Cardium edule</i>	En anaerobiosis en el pie existe una pequeña acumulación de octopina, predomina el lactato y también encuentran alanina y succinato. Aspartato como precursor de succinato. En el manto predomina el succinato.	
Schöttler y Wienhausen (1981)	<i>Nereis virens</i> y <i>Areicola marina</i>	Cuando inhiben la PEPCK aumenta degradación de glucógeno en <i>N. virens</i> . En anaerobiosis se produce succinato, acetato y propionato. En <i>A. marina</i> se acumula succinato. La producción lactato es muy limitada e incapaz de compensar pérdida de energía resultante de la inhibición de la PEPCK.	

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Ho y Zubkoff (1982)	<i>Geukensia demissa</i>	En anaerobiosis se acumula succinato, propionato y alanina. Proponen que la alanina regula las actividades de PK y PEPCK.	<pre> graph LR PEP --> OAA OAA --> MAL MAL --> FUM FUM --> SUC SUC --> PRO MAL --> PYR PYR --> ALA PYR --> AcCoA </pre>
Prestwich e Ing (1982)	Aracnidos	En anaerobiosis el piruvato es convertido a lactato y alanina y el malato a aspartato.	<pre> graph LR Piruvato --> Alanina Piruvato --> Lactato Malato --> Oxalacetato Aspartato --> Oxalacetato </pre>
Umezurike y Chilaka (1982)	<i>Achatina achatina</i>	El succinato-DCPIP dependiente es estimulado por Br^- , NO_3^- , Cl^- , I^- , inhibido por malonato e insensible a rotenona. La fumarasa-NADH dependiente es inhibida por rotenona y malonato.	
Waarde y Wilde (1982)	<i>Carasius auratus</i>	En anaerobiosis en hígado el amonio es producido vía glutamato-dh. En músculo, tanto en anaerobiosis como en aerobiosis, el amonio es producido vía ciclo nucleótidos de purina. En anaerobiosis se bloquea el paso de glutamato a aspartato.	
Zebe (1982)	<i>Upogebia pugettensis</i> <i>Callianasa californiensis</i>	En anaerobiosis se produce lactato y en menor proporción alanina y succinato.	
Foreman y Ellington (1983)	<i>Crasostrea virginica</i>	En anaerobiosis añaden aspartato y aumenta la concentración de alanina, además se acumulan alanina, succinato, alanopina y estrombina. Si inhiben la formación de aspartato no se acumula alanina y succinato. Si inhiben la glucólisis no se acumula alanopina ni estrombina y si aspartato, alanina y succinato.	

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Frank (1983)	<i>Chironomus plumosus</i>	Durante cortos periodos de anoxia se produce lactato y alanina, en largos ethanol. Encuentran alta actividad de ADH y baja de PEPCK. Como productos finales detectan ethanol, lactato, acetato y alanina. Se trata de especies indicadoras de aguas contaminadas y residuales.	
Gäde (1983a)	<i>Lima hians</i>	En periodo inicial de anoxia se produce alanina y muy poco aspartato. Detectan producción de succinato durante todo el periodo de anoxia; y no encuentran ni lactato ni octopina.	
Gilbert <i>et al.</i> (1983)	<i>Trypanosoma brucei</i> <i>brucei</i>	La treonina puede modificar producción de CO ₂ a partir de glucosa vía PYR-DH. La treonina no es un sustrato respiratorio importante.	Treo → Acetato → Ac grasos
Goncalves y Araujo (1983)	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Los enzimas GIDH/GPT son importantes en la movilización de NH ₃ . Conducen a una acumulación de alanina. Estos autores realizan la purificación de GPT.	
Kluytmants <i>et al.</i> (1983)	<i>Tellina planata</i> <i>Glycimeris pilosa</i> <i>Arca noae</i> <i>Venus sp.</i>	En <i>T. planata</i> en anaerobiosis encuentran octopina-dh, lactato, alanina, glicina y taurina. En <i>G. pilosa</i> octopina-dh. En <i>A. noae</i> no encuentran octopina-dh. En <i>Venus sp.</i> encuentran que es incapaz de producir propionato a partir de succinato.	

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Livingstone (1983)	Varios	Revisión del metabolismo anaeróbico en vertebrados e invertebrados. Distinción de cuatro vías metabólicas: lactato, opinas, glucosa-succinato, y aspartato-succinato. La distribución de las vías metabólicas es consistente con su filogenia. Da un esquema hipotético de la evolución de las vías metabólicas.	
Mourik (1983)	<i>Carasius auratus</i>	La anoxia y el ADP estimulan la producción de CO ₂ a partir de piruvato y glutamato. La regulación de la PYR-DH está modificada por la anoxia.	
Shulz y Kluytmans (1983)	<i>Mytilus edulis</i>	Describen la ruta para la síntesis de propionato.	<pre> graph TD Succinato --> SuccinilCoA[Succinil CoA] SuccinilCoA --> Propionato SuccinilCoA --> Cetoglutarato Propionato --> PropionilCoA[Propionil CoA] PropionilCoA --> MalonilCoA </pre>
Waarde (1983)	Peces	Estudian la producción de amonio en peces. En condiciones aeróbicas NH ₃ producido por transaminación e hidrólisis de proteínas. En condiciones anaeróbicas existen 4 vías distintas de producción de NH ₃ . (a partir de adenilatos, aspartato, alanina y glutamato). Utilizan las proteínas como fuente de energía. Glutamato y alanina son sustratos para gluconeogénesis	
Bowen (1984)	<i>Haliotis sp.</i>	Estudian los enzimas PK y PEPCK. PK es activado por FDP e inhibido por alanina. Encuentran correlaciones de PK y PEPCK con la profundidad para 4 especies de <i>Haliotis</i> .	
Fry y Brazely (1984)	<i>Ascarichia galli</i>	Encuentran que la SDH es inhibida competitivamente por fumarato.	
Gäde (1984)	<i>Orconetes limosus</i>	La principal respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno es un descenso de la tasa metabólica.	

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	ruta PROPUESTA
Holwerda y Veenhof (1984)	<i>Anodonta cygnea</i>	En anoxia se produce propionato, acetato y succinato. Acetato y propionato son excretados al agua. También encuentran baja actividad de la PK.	$\begin{array}{ccccccc} & & \nearrow \text{PYR} & \longrightarrow & \text{ACETATO} & & \\ \text{PYR} & \longrightarrow & \text{MAL} & \longrightarrow & \text{FUM} & \longrightarrow & \text{SUC} \longrightarrow \text{PRO} \end{array}$
Navarro y Ortega (1984)	<i>Actinia equina</i>	En anoxia se acumulan alanina, lactato y serina.	
Schöttler <i>et al.</i> (1984)	<i>Arenicola marina</i>	Durante primeras horas de anaerobiosis, se produce una acumulación de alanina; mientras que el aspartato es convertido en succinato y ácidos grasos volátiles. A largo plazo se produce una reducción de la tasa metabólica y no se produce alanina. El paso regulatorio se encuentra en la transición de PK a PEPCK.	<p>Corto Plazo:</p> $\begin{array}{ccccccc} \text{PYR} & \longrightarrow & \text{ALA} & & & & \\ & \nearrow & \text{ASP} & \longrightarrow & \text{OAA} & \longrightarrow & \text{MAL} \longrightarrow \text{SUC} \longrightarrow \text{PRO} \end{array}$ <p>Largo Plazo:</p> $\text{PEP} \longrightarrow \text{OAA} \longrightarrow \text{MAL} \longrightarrow \text{SUC} \longrightarrow \text{PRO}$
Albert y Ellington (1985)	<i>Menippe mercenaria</i>	En hipoxia se acumula lactato, sube el nivel de alanina y se produce muy poco succinato y aspartato. La tasa de ATP producido por fermentación de glucógeno a lactato en el músculo es insuficiente para mantener la demanda de energía.	
Hakim <i>et al.</i> (1985)	<i>Venus gallica</i> <i>Scapharca inequalvis</i>	La fosforilación es el mecanismo de regulación de la PK, en anaerobiosis o bajo condiciones de gluconeogénesis. La PK está afectada por alanina.	
Siegmund <i>et al.</i> (1985)	<i>Arenicola marina</i>	En anaerobiosis encuentran alanopina-DH, estrombina-DH, lactato-DH, alanopina y estrombina. Se produce la degradación de fosforyltaurocyamina, glucógeno y aspartato en la fase inicial de anaerobiosis.	$\begin{array}{l} \text{PYR} \longrightarrow \text{Estrombina} \\ \text{PYR} \longrightarrow \text{Lactato} \\ \text{PYR} \longrightarrow \text{Alanopina} \end{array}$

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	ruta PROPUESTA
Hochachka (1986)	Moluscos	Revisión en moluscos del metabolismo anaeróbico. Descenso de tasa metabólica con el descenso de oxígeno. Mayor consumo de glucosa en hipoxia. Desacoplamiento del metabolismo de membrana.	
Storey (1986)	gasterópodos, bivalvos, y poliquetos	Aspartato activador de PK en gasterópodos y moluscos bivalvos a excepción de un poliqueto.	
Vooy's y Holwerda (1986)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Estudian las adaptaciones a las salinidades. Baja salinidad baja PK. La PK en <i>M. galloprovincialis</i> es menos sensible al pH que en <i>M. edulis</i> . En especies eurihalinas PK es más sensible a alanina y H ⁺ . En anoxia se produce un descenso de PK.	
Bowen (1987)	<i>Halotis sp.</i>	La PK es inhibida por ATP. Encuentran poco lactato si inhiben PK y LDH. El piruvato inhibe a LDH. LDH y PK enzimas claves en ciclos de inversión de mareas. Menor inhibición de LDH por piruvato a pH bajo.	
Cazon <i>et al.</i> (1987)	<i>Patella caerulea</i>	Purificación y estudio de MDH del pie. MDH inhibido por acetoglutarato, citrato y fosfatos. MDH enzima clave en la ruta anaeróbica que ocurre hacia la formación de malato.	
Meinardus y Gäde (1987)	<i>Cardium tuberatum</i>	En anaerobiosis acumula lactato, alanina y octopina.	



REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Wiseman y Ellinton (1987)	<i>Busycon contrarium</i>	En anoxia funcional acumula estrombina, octopina, alanopina y lactato. Hay una mayor acumulación de lactato que de los otros productos aún cuando la actividad LDH es baja. El lactato se exporta y ello tiene dos ventajas: (1) favorece la formación de más producto; (2) ayuda a regular el pH intracelular	
Carvajal y Kessi (1988)	<i>Concholepas concholepas</i>	La octopina- <i>dh</i> reemplaza a LDH. En algunos casos según el estado fisiológico existen ambas. Revisan propiedades de ODH.	$\text{PYR} + \text{Arginina} \xrightarrow{\text{ODH}} \text{Octopina}$
Gäde (1988)	<i>Haliotis lamellosa</i>	En anoxia, en el músculo abductor acumula taupina y en el pie lactato. Descripción de la formación de taupina. Opinas excluyentes con LDH.	
Skorkowski (1988)	Crustáceos moluscos y peces	Revisan las propiedades del EM el cual realiza la conversión de malato a piruvato. Encuentran una alta actividad cuando hay oxígeno.	$\text{Malato} \xrightarrow{\text{EM}} \text{Piruvato}$
Waarde (1988)	Peces	Revisión de compuestos nitrogenados. Durante anoxia, los ciprínidos usan carbohidratos y aa como sustratos para la producción anaeróbica de energía. Discuten los posibles mecanismos bioquímicos. Muestran que el esqueleto carbonado de ciertos aa puede aparecer como etanol, mientras que otros pueden incorporarse en lípidos.	

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Wijsman <i>et al.</i> (1988)	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Detectan un aumento de la concentración de glucosa y lactato en anoxia y una fuerte reducción de la utilización de glucosa en la producción de huevos. Así como una disminución de la tasa metabólica.	
Wissing y Zebe (1988)	<i>Rhodeus amarus</i>	En anaerobiosis aumenta el ethanol excretado al agua. La concentración de lactato cuando existe gran esfuerzo muscular es similar a la concentración de lactato en hipoxia. No aparece casi ethanol en el músculo.	
Bock <i>et al.</i> (1989)	<i>Tubifex tubifex</i>	Es capaz de absorber cadenas cortas de ácidos carboxílicos marcadas radiactivamente tales como acetato, propionato y lactato del ambiente. En ausencia de O ₂ el ¹⁴ C se encuentra en alanina y succinato. El lactato no se acumula.	
Halarnkar y Blomquist (1989)	Invertebrados	Estudian el catabolismo de propionato en invertebrados. Encuentran que el propionato se metaboliza a succinil-CoA (vía, Vit B ₁₂). Los insectos no poseen vit B ₁₂ . En anoxia en invertebrados el succinato es metabolizado a propionato. En insectos el propionato es precursor de hormonas juveniles. En artrópodos el succinato es metabolizado a propionato. En bacterias el propionato es metabolizado a lactato.	
Isani <i>et al.</i> (1989)	<i>Scapharca inaequalvis</i>	En anaerobiosis acumula alanina, succinato, pocas opinas y nada de lactato. Sugieren que el aspartato el glucógeno son los sustratos del metabolismo anaeróbico.	OAA → Succinato → Propionato

REFERENCIA	ORGANISMO	OBSERVACIONES	RUTA PROPUESTA
Loomis <i>et al.</i> (1989)		La tolerancia a la congelación se incrementa en anaerobiosis. La anaerobiosis induce cambios en el ion Ca^{++} (crioprotector y estabilizador de membrana). Mide la capacidad crioprotectiva de alanina, alanopina, estrombina, octopina, propionato, acetato y lactato, productos finales del metabolismo anaeróbico.	
Widdows (1989)	<i>Crassostrea virginica</i>	La tolerancia a la anoxia se incrementa con el estado de desarrollo y el tamaño del cuerpo. La larva puede tolerar bajas concentraciones de oxígeno reduciendo su actividad, su alimentación y su tasa de crecimiento e incrementando los tiempos de desarrollo.	
Storey y Storey (1990)	Varios	Revisión del metabolismo anaeróbico. La depresión de la tasa metabólica es una estrategia adaptativa común para resistir condiciones de anaerobiosis, hibernación estival, etc. Adaptaciones bioquímicas que contribuyen a anaerobiosis: 1) mantenimiento de altas reservas de combustibles fermentables. 2) mecanismos que minimizan la acidosis: medios que aumentan la capacidad tamponadora o alteraciones del tipo de productos finales formados 3) aumentar el rendimiento anaeróbico de ATP y 4) depresión de la tasa metabólica.	

G. DATOS CORRESPONDIENTES AL ANÁLISIS DEL METABOLISMO

Concentraciones de oxígeno (mg/l) y densidad de poblacional (hembras/ml) del rotífero *Brachionus plicatilis* en los cultivos destinados a las determinaciones enzimáticas y de metabolitos. Los datos no contenidos entre paréntesis corresponden a las concentraciones de oxígeno. El primer dato corresponde a la concentración medida, mientras que el segundo (tras una barra o bajo el primero), cuando lo hay, corresponde a la concentración ajustada por el investigador. Las concentraciones de rotíferos para cada día se denotan entre paréntesis. La fecha hace referencia al día en que se inició la experiencia. En todos los casos, los valores del último día corresponden al del momento de realización de la extracción para la determinación enzimática.

ENZIMAS

ALANINA-AMINOTRANSFERASA

FECHA	DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO			
	1	2	3	4
20-10-88	6.13/2.32 (26)	0.24 (31)	0.16 (32)	0.04 (27)
12-11-88	6.60/1.75 (15)	0.22 (17)	0.22 (16)	0.14 (10)
12-11-88	6.51/1.86 (30)	0.50 (27)	0.41 (48)	0.34 (38)
13-10-88	5.44/2.48 (8)	0.08 (9)	-	0.99 (5)
12-11-88	6.51/2.10 (29)	1.01 (35)	1.22 (33)	1.00 (17)
20-10-88	5.73/2.63 (25)	1.02 (19)	1.04/0.53 (21)	1.20 (19)
13-10-88	5.37/2.82 (15)	0.05 (19)	-	1.55 (35)
13-10-88	5.28/2.30 (29)	1.12 (34)	-	1.90 (35)
20-10-88	5.48/2.65 (34)	1.66 (37)	1.78 (37)	2.13 (33)
13-10-88	5.21 (16)	2.24 (31)	-	2.31 (31)
12-11-88	6.48 (19)	5.47 (29)	3.30 (36)	3.85 (37)

ALANINA-DESHIDROGENASA

FECHA	DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO				
	1	2	3	4	5
02-02-90	6.64 (14)	6.31/2.62 (22)	0.94/0.78 (37)	0.59 (35)	0.20 (29)
02-02-90	6.57 (20)	6.68/2.42 (22)	0.58 (13)	0.52 (21)	0.30 (4)
02-02-90	6.65 (28)	6.00 (28)	5.88 (38)	5.83 (38)	5.20 (26)

FOSFOENOLPIRUVATO-CARBOXIQUINASA

FECHA	DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO				
	1	2	3	4	5
14-07-88	5.61/2.35 (22)	0.29 (24)	0.08 (17)	0.06 (13)	
28-07-88	5.38/2.58 (13)	0.86 (11)	0.09 (14)	0.07 (11)	
28-04-88	6.47/3.27 (10)	0.33 (4)	0.15 (14)	0.07 (9)	
24-03-88	7.31/2.82 (8)	1.02 (15)	0.22 (9)	0.09 (9)	
28-04-88	6.08/2.78 (22)	1.07 (21)	0.53 (15)	0.10 (10)	
26-05-88	5.99/2.54 (9)	1.44 (11)	0.21 (12)	0.11 (13)	
14-07-88	5.73/1.83 (12)	0.31 (12)	0.16 (5)	0.12 (7)	
14-07-88	5.80/1.57 (20)	0.20 (12)	0.03 (25)	0.14 (24)	
28-07-88	5.50/1.98 (7)	0.50 (6)	0.09 (11)	0.14 (7)	
05-05-88	5.35/2.67 (27)	0.94 (18)	0.51 (26)	0.15 (22)	
05-05-88	5.36/2.06 (27)	0.52 (24)	0.15 (17)	0.16 (17)	
28-04-88	6.17/2.82 (11)	1.68 (13)	0.57 (11)	0.23 (18)	
05-05-88	5.39/2.21 (12)	1.24 (11)	2.28/1.10 (16)	0.48 (27)	
14-07-88	5.86/3.40 (20)	0.77 (16)	0.57 (23)	0.53 (24)	
12-02-88	6.40/2.42 (27)	1.75 (17)	1.01 (22)	0.14 (19)	0.55 (32)
26-05-88	5.83/2.60 (5)	1.62 (16)	0.96 (14)	0.58 (8)	
26-05-88	5.96 (7)	2.19 (16)	3.38 (6)	0.65 (17)	
28-07-88	5.62/2.62 (21)	1.47 (19)	0.97 (25)	0.97 (18)	
28-07-88	5.64/2.76 (18)	1.64 (20)	3.31 (10)	1.01 (19)	
19-02-88	6.51 (18)	5.53 (9)	5.52 (7)	1.62 (10)	
28-04-88	6.15 (17)	6.62 (27)	6.28 (29)	4.42 (27)	
26-05-88	5.83/3.34 (14)	3.18 (10)	5.96 (10)	6.04 (10)	
05-05-88	5.27 (27)	6.36 (30)	6.78 (26)	7.02 (28)	

FUMARASA

FECHA **DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO**

		1	2	3	4
05-06-90	5.60/3.94 (6)	0.30 (6)	0.04 (5)		
05-06-90	5.58/3.77 (8)	0.26 (4)	0.06 (10)		
19-07-90	5.62 (13)	4.66 (17)	0.42 (11)	0.06 (27)	
19-07-90	5.85 (14)	5.02/2.85 (11)	0.39 (11)	0.07 (12)	
19-07-90	5.71 (9)	5.42/2.88 (19)	0.79 (16)	0.17 (6)	
19-07-90	5.69 (9)	5.45/2.59 (9)	1.12 (7)	0.40 (8)	
05-06-90	5.65/3.95 (11)	2.26/1.92 (13)	1.84 (22)		
19-07-90	5.88 (14)	5.36/2.90 (9)	3.27/1.92 (8)	2.15 (12)	
19-07-90	5.66 (16)	5.02 (16)	4.87 (15)	4.08 (15)	
05-06-90	5.64 (7)	5.08 (8)	5.20 (13)		

MALATO-DESHIDROGENASA

FECHA **DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO**

		1	2	3	4
09-06-88	5.85/1.93 (8)	0.83 (17)	0.10 (15)	0.01 (9)	
30-06-88	6.09/2.14 (8)	1.45 (9)	0.30 (5)	0.18 (9)	
30-06-88	6.05/2.26 (4)	0.63 (7)	0.16 (9)	0.20 (3)	
09-06-88	5.64/1.94 (8)	3.43 (13)	1.93 (13)	0.21 (20)	
30-06-88	5.96/3.54 (4)	2.30 (1)	3.78/1.66 (8)	0.41 (7)	
30-06-88	6.02/2.14 (4)	2.51 (9)	1.02/0.78 (11)	0.42 (8)	
30-06-88	5.85/3.49 (3)	5.27 (10)	5.63 (7)	1.53 (8)	
09-06-88	6.01 (11)	6.27 (14)	5.72 (14)	4.34 (17)	
09-06-88	5.63 (6)	6.23 (6)	5.97 (9)	4.79 (11)	

LACTATO-DESHIDROGENASA

FECHA DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO

	1	2	3	4	5	6
25-09-86	7.55/1.92 (30)	0.26	(36)	0.02	(6)	
27-02-87	9.31/1.0 (18)	1.55/0.55	(18)	0.69	(21)	0.10 (14)
31-10-86	7.96/1.43 (12)	1.45	(13)	0.18	(19)	0.13 (12)
19-02-87	9.64/1.52 (25)	0.27	(37)	0.42	(34)	0.56 (21)
19-02-87	9.18/1.54 (27)	0.53	(23)	0.73	(17)	0.90 (15)
13-03-87	7.69/0.95 (90)	0.37/0.09	(104)	0.62/0.08(95)	1.26/0.04 (84)	1.33/0.07 (87) 0.38/0.01 (80)
17-03-87	7.64/0.90 (83)	0.25/0.08	(63)	0.41/0.07(64)	1.70/0.02 (67)	1.48/0.01 (63) 0.86/0.05 (52)
17-03-87	7.72/0.86 (49)	2.49/0.11	(85)	2.46/0.05(38)	2.96/0.05 (30)	2.19/0.06 (35) 1.87/0.05 (28)
31-10-86	7.76	(30) 7.20	(38)	7.38	(42)7.09	(33)
27-02-87	8.86	(36) 7.62	(46)	7.49	(46)7.58	(46)
12-02-87	9.05	(27) 7.96	(32)	7.90	(39)7.48	(26)
12-02-87	9.23	(28) 8.35	(20)	7.72	(28)7.85	(21)

FECHA DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO (CONTINUACIÓN)

	7	8	9	10	11	12
25-09-86						
27-02-87						
31-10-86						
19-02-87						
19-02-87						
13-03-87	0.94/0.07(64)	1.06/0.07(65)	1.57/0.25(43)	0.7/0.35/(43)	0.93(32)	2.85(28)
17-03-87	0.98/0.09(39)	0.78/0.06(43)	0.58/0.09(30)	0.41	(28)	3.06(30)
17-03-87	0.62/0.06(21)	1.82/0.21(20)	2.43	(34)1.87	(15)	3.61(24)
31-10-86						
27-02-87						
12-02-87						
12-02-87						

PIRUVATO-QUINASA

FECHA	DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO				
	1	2	3	4	5
27-02-87	9.47/1.00 (24)	1.22/0.51 (35)	0.47 (29)	0.05 (24)	
27-02-87	9.31/1.00 (18)	1.55/0.55 (18)	0.69 (21)	0.10 (14)	
27-03-87	9.29/1.32 (45)	0.64/0.19 (45)	0.19 (13)	0.12 (38)	
28-05-87	9.45/1.11 (36)	0.58 (7)	0.21 (4)	0.20 (3)	
14-05-87	7.67/1.63 (57)	1.22 (57)	0.22 (32)		
27-03-87	9.20/1.28 (21)	0.45 (22)	0.16 (11)	0.23 (10)	
14-05-87	7.83/1.68 (6)	1.12 (12)	0.25 (8)		
08-05-87	8.71/1.92 (34)	6.08/1.32 (28)	0.50 (35)	0.26 (7)	
14-05-87	7.94/1.36 (62)	0.38 (38)	0.30 (30)		
27-03-87	9.25/1.36 (38)	0.20 (45)	0.17 (33)	0.37 (24)	
12-02-87	9.64/1.52 (25)	0.27 (37)	0.42 (34)	0.56 (21)	
28-05-87	8.53/1.88 (36)	1.54 (29)	1.08 (17)	0.76 (14)	
10-04-87	8.64/2.15 (4)	1.35/0.25 (6)	1.02/0.13 (20)	0.87 (13)	0.80 (16)
28-05-87	8.86/2.03 (9)	1.11 (19)	0.50 (22)	0.80 (12)	
12-02-87	9.18/1.54 (27)	0.53 (23)	0.73 (17)	0.90 (15)	
08-05-87	8.96/1.78 (58)	1.26 (41)	1.04 (40)	1.02 (36)	
28-05-87	7.10/4.80 (50)	1.12 (52)	1.73 (50)	2.66 (57)	
08-05-87	8.05/3.06 (51)	0.66 (55)	1.40 (41)	2.80 (67)	
10-04-87	8.19/2.43 (31)	2.38 (24)	3.71/2.29 (29)	0.48/1.27 (39)	4.37 (26)
08-05-87	8.03/4.10 (36)	1.34 (38)	2.84 (44)	4.53 (53)	
10-04-87	8.64/4.00 (30)	2.94 (26)	4.36 (16)	4.84 (29)	5.34 (20)
28-05-87	7.30/2.08 (34)	4.09 (9)	4.81 (12)	5.45 (16)	
27-03-87	8.82 (31)	7.38 (35)	7.04 (34)	7.17 (32)	
27-03-87	9.26 (20)	7.64 (34)	7.27 (25)	7.26 (23)	
12-02-87	9.05 (27)	7.96 (32)	7.90 (39)	7.84 (26)	
27-02-87	9.23 (28)	8.35 (20)	7.72 (28)	7.85 (21)	

SUCCINATO-DESHIDROGENASA

FECHA DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO

	1	2	3	4
31-01-91	6.08/5.42(29)	1.04 (19)	0.10/0.37(22)	0.7 (22)
31-01-91	6.19/5.45(20)	1.30 (16)	0.14 (14)	0.09(10)
21-12-90	7.09/4.56(11)	1.02 (10)	0.43 (10)	0.09(15)
31-01-91	6.15/5.26(28)	2.55 (26)	1.34 (20)	0.09(10)
08-11-91	5.34/2.74 (6)	0.85 (5)	0.18 (3)	
08-11-91	5.72/2.47 (9)	0.59 (23)	0.22 (14)	
21-12-90	7.16/4.73 (7)	1.03 (4)	0.14/0.30 (2)	0.22 (8)
31-01-91	6.18/5.33(17)	4.61 (26)	2.58 (33)	0.29(13)
31-01-91	6.45 (37)	5.95/4.50(32)	2.75 (39)	0.30(35)
08-11-91	6.41/2.95 (8)	1.86 (12)	0.58 (13)	
21-12-90	6.85 (11)	6.42/3.83(15)	2.46/0.98(18)	0.65(19)
21-12-90	7.11/5.20(21)	2.44 (16)	1.41 (29)	1.10(19)
31-01-91	6.04 (23)	6.40 (19)	5.18 (19)	1.11(32)
08-11-90	5.96/2.01(20)	2.31/1.94(15)	2.02 (15)	2.18(26)
08-11-90	6.49/2.73(15)	4.40/1.88(21)	3.97 (23)	
08-11-90	5.65 (6)	6.67 (9)	6.79 (6)	
12-12-90	7.01 (21)	6.77 (25)	6.81 (16)	6.84(21)

METABOLITOS

ALANINA

FECHA	DIA DE SEGUIMIENTO DEL CULTIVO			
	1	2	3	4
14-06-90	6.45 (25)	5.05/3.95 (14)	0.56/0.68 (18)	0.22 (21)
14-06-90	6.52 (8)	5.58/0.82 (15)	1.92 (9)	0.31 (13)
14-06-90	6.50 (18)	5.04/2.99 (21)	0.66/0.68 (17)	0.36 (18)
14-06-90	6.53 (15)	5.42/3.32 (14)	2.49 (10)	1.19 (13)
14-06-90	6.52 (19)	5.42/3.55 (20)	1.24 (25)	1.29 (15)
14-06-90	6.48 (35)	6.41 (26)	6.03 (26)	6.12 (26)

SUCCINATO

FECHA	DIA DEL SEGUIMIENTO DEL CULTIVO			
	1	2	3	4
02-07-90	5.26	4.84/2.60 (28)	0.44 (30)	0.07 (30)
02-07-90	5.08 (26)	4.55/2.42 (26)	0.53 (33)	0.10 (28)
02-07-90	5.25 (34)	5.05 (38)	5.40 (40)	5.36 (40)

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acorda por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D.^e Angel Espinosa Colado

la calificación de Apto "cum laude" por unanimidad

Valencia, a 6 de Septiembre de 1923

El Secretario,

El Presidente

[Handwritten signature]

