

ECOLOGÍA DEL PICOPLANCTON EN UNA LAGUNA CÁRSTICA ESTRATIFICADA



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

INSTITUT CAVANILLES DE BIODIVERSITAT I BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Antonio Picazo Mozo
Tesis doctoral
Valencia, 2015

INSTITUT CAVANILLES DE BIODIVERSITAT I BIOLOGIA EVOLUTIVA



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

**ECOLOGÍA DEL PICOPLANCTON EN UNA LAGUNA
CÁRSTICA ESTRATIFICADA**

Tesis Doctoral

Antonio Picazo Mozo

Valencia, 2015

Memoria titulada “**Ecología del picoplancton en una laguna cárstica estratificada**”, presentada por el Licenciado **Antonio Picazo Mozo** para optar al grado de Doctor en Biología.

Fdo. Antonio Picazo Mozo

Tesis dirigida por el Dr. **Antonio Camacho González**, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia y el Dr. **Eduardo Vicente Pedrós**, Catedrático y Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

Fdo. Prof. Dr. Antonio Camacho González

Fdo. Prof. Dr. Eduardo Vicente Pedrós

A María

Agradecimientos

A mi mujer, María, ella lleva conmigo tanto tiempo como esta tesis, sin su ayuda y sobretodo su paciencia nada hubiera tenido sentido. A mis hijas, María y Marta, que son el aliciente para avanzar y seguir adelante.

A Toni, él ha sido el principio y el fin de esta tesis, sin su ayuda y su apoyo mi vida sería muy diferente.

A Eduardo, con el comencé esta andadura y del que he aprendido muchas de las cosas que de laboratorio y campo hoy sé.

A Carlos, hay veces que se tiene suerte y además de encontrar un excelente compañero de trabajo encuentras a un mejor amigo. El es una parte muy importante de esta tesis.

A Rosa, porque siempre vale la pena escucharla y aprender.

A todos los amigos y compañeros que durante todos estos años han pasado se han cruzado por el camino de esta tesis. Sonia, David, Esther (las dos), Dani, Rafa, Carmen, Mari Loli, Lidia, Loles, Yolanda, Nieves, Sara, Charo, Olivier, Juan Antonio, Marta, Maru, Nayeli, Katherina, Erik, María, Juan Miguel, Javi. Creo que es imposible que no me deje a nadie, si es así lo siento, de todas formas gracias a todos.

A todas aquellas organizaciones e instituciones que de alguna manera han permitido que durante todo este tiempo mi trabajo de laboratorio y campo sea posible. A la Universidad de Valencia. A la Caja de Ahorros del Mediterráneo, gracias a su beca predoctoral ente abril de 2004 y abril de 2008.

Y a mi familia, mis padres y hermanos porque siempre han estado a mi lado, siempre me han apoyado y me han comprendido.

RESUMEN

La importancia de las picocianobacterias en ecosistemas acuáticos es, hoy en día, un hecho contrastado y muy bien documentado, tanto por lo que se refiere a su abundancia absoluta como a la biomasa relativa respecto al resto de organismos presentes en estos ecosistemas. Las picocianobacterias son, además, los principales productores primarios en la mayoría de ecosistemas acuáticos, siendo la base de la red trófica en algunos de estos ecosistemas, con un impacto muy importante en sus ciclos biogeoquímicos. En el presente trabajo se ha estudiado la abundancia y dinámica, tanto en el perfil vertical como en su evolución a lo largo del ciclo limnológico, de las poblaciones de picoplancton, y en especial de picocianobacterias (Pcy) en la Laguna de La Cruz, así como los factores que las determinan. Son muchos los factores que pueden influir en la abundancia y dinámica de las picocianobacterias: factores físicos y químicos como, por ejemplo, la localización y morfología de la cubeta, su régimen térmico y patrones de estratificación, la distribución de la luz en el perfil vertical, la disponibilidad de nutrientes inorgánicos esenciales; y factores bióticos como la interacción con el resto de productores primarios o la depredación.

La Laguna de La Cruz, localizada en la serranía de Cuenca (1032 m.s.n.m.), es un sistema meromítico situado en el fondo de una dolina de hundimiento, de forma circular (116 m. de diámetro y unos 10.000 m² de área superficial). La laguna presenta una fuerte estratificación térmica estival junto con gradientes verticales de luz, oxígeno, y nutrientes, entre otros. Estos patrones de estratificación permiten una gran diversidad de

microambientes donde se pueden desarrollar diferentes poblaciones de microorganismos con una gran variedad de metabolismos, tanto fotosintéticos, quimiolitotrofos, como heterótrofos. La marcada termoclina estacional y su carácter meromíctico hace posible que se formen dos máximos de estabilidad (medidos como frecuencia de Brunt Väissälä), uno permanente en la picnoclina a 16 metros de profundidad y otro en la termoclina de profundidad variable a medida que avanza la estratificación. Esto aísla, durante todo el periodo de estratificación, al metalimnion e hipolimnion, permitiendo una microestratificación muy estable de las poblaciones microbianas planctónicas, pero que también limita la difusión de materia y energía en el perfil vertical como, por ejemplo, la difusión de nutrientes desde el monimolimnion.

En la Laguna de La Cruz se han identificado diferentes morfotipos de picocianobacterias, con un tipo bacilar de pequeño tamaño como dominante a lo largo de todo el ciclo limnológico. Los valores de abundancia promedio en el perfil vertical son del orden de magnitud de 10^6 , con valores máximos de abundancia en el máximo profundo de clorofila (DCM), en torno a 14×10^6 células ml^{-1} . Estos valores son muy altos incluso para este tipo de sistemas que, en general, presentan rangos de abundancia entre 10^3 y 10^5 células ml^{-1} . En cuanto a su dinámica a lo largo del ciclo limnológico, los valores máximos de abundancia de Pcy integrados en la columna de agua se observan en primavera, concretamente en mayo. En este período las Pcy se distribuyen homogéneamente por el epilimnion y el metalimnion, sin embargo, a medida que avanza la estratificación, y como consecuencia del

agotamiento de nutrientes, de la presión por depredación y de los cambios en la disponibilidad de luz, las poblaciones de Pcy se concentran formando un DCM en torno a la oxiclina. Con los máximos profundos bien establecidos, a mediados del verano se produce en la Laguna de La Cruz la precipitación cálcica tumultuosa (“*whiting*”), lo que causa una pérdida muy importante de biomasa en el perfil vertical, principalmente de picocianobacterias, las cuales actúan potencialmente en la nucleación de los cristales de calcita. A partir de septiembre se observa un incremento muy importante de su biomasa en el máximo profundo de clorofila, entre 10 y 12 metros de profundidad, que sin embargo no afecta significativamente a los valores integrados de Pcy en la laguna.

Las características antes descritas permiten que la laguna sea un buen sistema modelo para estudiar aspectos metodológicos relacionados con la distribución espacial en el perfil vertical de las diferentes poblaciones de organismos fotosintéticos presentes en la laguna. En relación al análisis de los diferentes pigmentos fotosintéticos presentes, se ha comprobado la adecuación de algunas de las ecuaciones espectrofotométricas más usadas en la bibliografía en sistemas estratificados con mezclas complejas de pigmentos como la Laguna de La Cruz. Respecto a la cuantificación de las poblaciones de organismos fotosintéticos se ha estudiado la viabilidad del uso de la citometría de flujo para la identificación y recuento de los organismos fotosintéticos más importantes de la laguna, mostrando que, con la calibración adecuada, es posible realizar estas determinaciones por citometría de flujo incluso con diferencias de tamaño de varios órdenes de magnitud.

En la Laguna de La Cruz coexisten diferentes poblaciones microbianas con diferentes metabolismos asociados a la fijación del carbono, tanto por fotosíntesis (oxigénica y anoxigénica) como por quimiolitotrofia. En términos de biomasa, las Pcy dominan la columna de agua de la laguna en primavera y verano, mientras, que el nanofitoplancton eucariota domina al final del periodo de estratificación. Durante el periodo de mezcla ambos grupos presentan una biomasa muy similar. La biomasa de picoeucariotas y bacterias fotosintéticas es, relativamente, mucho menor que la de las Pcy y nanofitoplancton. La biomasa integrada de todos los productores primarios aumenta a medida que se desarrolla la estratificación, al igual que ocurre con la biomasa de NPB (“*non photosynthetic bacteria*”) la cual, se encuentra acoplada a la producción primaria. La mezcla vertical produce un desfase muy significativo en este acoplamiento, principalmente debido a la mineralización de los restos del máximo otoñal de nanofitoplancton, que produce, junto con el proceso de mezcla, una mayor disponibilidad de nutrientes debido al proceso de mineralización que se prolonga durante el periodo invernal, lo que permite el rápido desarrollo primaveral de las Pcy.

La producción anual integrada en la columna de agua de la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico 2006, fue de $183,6 \text{ g C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ dentro del rango observado en lagos mesotróficos. La mayor parte de esta producción es debida a procesos dependientes de la luz (92,4%), particularmente a la fotosíntesis oxigénica (89,7%), mientras que la fotosíntesis anoxigénica es responsable de un 2,7% y la quimiolitotrofia de un 7,6% del total de la asimilación de carbono inorgánica. Los

principales responsables de la fotosíntesis oxigénica son las Pcy y el nanofitoplancton en las aguas bien oxigenadas y la oxiclina. La fotosíntesis anoxigénica es llevada a cabo por bacterias del azufre, principalmente la bacteria púrpura del azufre, *Lamprocystis purpurea*, y la bacteria verde del azufre, *Chlorobium chlatratiforme*, que se desarrollan en el monimolimnion, y durante el periodo de estratificación, en el hipolimnion, donde la población de *Lamprocystis* se sitúa debajo del DCM y la de *Chlorobium* debajo de *Lamprocystis*. Los quimiolitotrofos son una fracción del “NPB”, el cual incluye también al picoplancton heterótrofo. La biomasa y producción bacteriana de estos últimos se encuentra acoplada a la producción primaria, excepto durante la mezcla invernal.

La tasa de fotosíntesis oxigénica en el epilimnion y el mixolimnion permanece relativamente estable en torno a $5 \text{ mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Los valores máximos de fotosíntesis oxigénica ($40 \text{ mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) se localizaron, durante el período de estratificación en otoño, en torno al 0,1% PAR, correlacionándose con el desarrollo del máximo profundo de clorofila-*a* (DCM) y formado principalmente por Pcy. Los valores máximos de fotosíntesis anoxigénica se localizaron en la interfase óxico-anóxica y en el hipolimnion superior, coincidiendo con una mayor disponibilidad de luz. La asimilación de carbono inorgánico por quimiolitotrofia fue relativamente importante en la laguna, principalmente al final del período de estratificación y durante el período de mezcla, donde en el hipolimnion y monimolimnion se encuentran tasas de fijación oscura comparables a las tasas fotosintéticas observadas en el epilimnion y

metalimnion. Se observa un claro dominio de la fracción procariota en los procesos de asimilación de carbono inorgánico, principalmente por fotosíntesis oxigénica por medio de las picocianobacterias, responsables de más de un 80% de esta asimilación a nivel global. Al final del período de estratificación, la asimilación de carbono inorgánico por quimiolitotrofia se convierte en una significativa fuente de carbono orgánico para la laguna. En contraste la fotosíntesis anoxigénica contribuye muy poco a la fijación de carbono inorgánico en el lago, debido principalmente a la limitación del hábitat donde desarrollarse y a las bajas concentraciones de sulfhídrico que presenta la Laguna de La Cruz.

Durante el período de máxima estratificación y estabilidad a nivel global, y en el momento en el que la biomasa de Pcy es más importante, el control de las poblaciones de Pcy tiene lugar por depredación, principalmente en la DCM, por parte de protozoos, nanoflagelados y metazooplancton. En la Laguna de La Cruz, la abundancia de Pcy está influenciada por la depredación, principalmente en profundidades donde la luz y los nutrientes ya son muy escasos, pero mantiene valores de abundancia un orden de magnitud por encima de lo esperado para sistemas acuáticos similares. El fósforo soluble, y su dinámica, son también un factor clave para comprender el dominio de Pcy sobre el resto de organismos fotosintéticos. Estas poblaciones presentan una tasa de captación y acumulación de este nutriente, en forma de pirofosfato, tan alta que las concentraciones en la laguna siempre son limitantes para el resto de microorganismos. Esta estrategia permite que las Pcy tengan

fósforo disponible, proporcionando una importante ventaja respecto al resto de grupos fotosintéticos, lo que permite mantener abundancias de Pcy muy elevadas respecto a sistemas acuáticos similares.

Índice general

Capítulo 1	Introducción General_____	1
Capítulo 2	Metodología general_____	17
Capítulo 3	Caracterización de las principales variables físicas y químicas en la Laguna de La Cruz_____	37
Capítulo 4	Dinámica espacio-temporal del picoplancton autótrofo en Laguna de La Cruz_____	87
Capítulo 5	Estudio comparado del uso de métodos espectrofotométricos frente a métodos cromatográficos para la determinación de pigmentos fotosintéticos. La Laguna de La Cruz como lago modelo_____	113
Capítulo 6	Estudio de la estructura vertical de algas eucarióticas, picocianobacterias y bacterias fotosintéticas anoxigénicas en la Laguna de La Cruz mediante citometría de flujo_____	145
Capítulo 7	Asimilación inorgánica de CO ₂ en la Laguna de La Cruz. Importancia de la fracción picoplanctónica en la producción primaria_____	169
Capítulo 8	Estudio experimental de la interacción de factores bióticos y abióticos en la abundancia, diversidad y dinámica de las poblaciones de picoplancton_____	203
	Conclusiones Generales _____	239

Capítulo 1

Introducción General

1.1. Ecología general de picocianobacterias (Pcy) en sistemas acuáticos

El picofitoplancton, y más en concreto las picocianobacterias (Pcy), se engloban dentro del denominado picoplancton. Este término fue introducido por Sieburth et al., (1978), en una clasificación en función del tamaño del plancton, de uso generalizado a día de hoy. Inicialmente, este término hacía referencia únicamente a bacterioplancton heterótrofo y fueron estudios posteriores los que determinaron la contribución generalizada y significativa de cianobacterias unicelulares al picoplancton (Johnson y Sieburth, 1979; Waterbury et al., 1979; Li et al., 1983). El picofitoplancton comprende microorganismos de pequeño tamaño, en un rango de tamaño entre 0,2 μm y 2 μm , y está compuesto fundamentalmente de picocianobacterias procariotas (Pcy) y picoeucariotas fotótrofos (Johnson y Sieburth, 1982). Se distribuye por todos los sistemas acuáticos del mundo, en todo tipo de lagos y océanos, independientemente del estado trófico (Stockner y Antia, 1986).

En los ecosistemas de agua dulce las Pcy dominan los ambientes pelágicos (Stockner et al., 2002), pudiendo estar presentes como células individuales o como microcolonias (Passoni y Callieri, 2001; Komárková, 2002; Crosbie et al., 2003), y presentando una diversidad de morfotipos y genética mayor que los observados en ambientes marinos. A partir de múltiples estudios ecológicos sabemos que las Pcy, como muchos otros grupos de procariotas, presentan una gran capacidad de adaptación, pudiendo aclimatarse con facilidad a diferentes condiciones ambientales, como por ejemplo, diferentes niveles de luz por adaptación cromática (Hauschild et al., 1991; Callieri, 1996; Vörös et al., 1998). Los estudios genéticos realizados hasta ahora, principalmente del gen 16SRNA, muestran que las Pcy son un grupo polifilético y con una taxonomía compleja (Robertson et al., 2001). Por otro lado, estos microorganismos son responsables

de una fracción significativa de la producción primaria total en los sistemas marinos y de agua dulce, donde contribuye significativamente (hasta el 80%) en la productividad y biomasa fitoplanctónica, llegando incluso a desplazar al fitoplancton de mayor tamaño como base del consumo en la red trófica clásica (Magazzù y Decembrini, 1995; Pittera et al., 2014). Las Pcy, además, juegan un papel muy importante en el funcionamiento del bucle microbiano (Azam et al., 1983), participando activamente en la regulación de los flujos de materia y energía, en su transferencia entre los compartimentos bióticos y abióticos, y en el sustento y desarrollo de niveles tróficos superiores (Di Poi et al., 2013).

En sistemas de agua dulce se ha observado una gran diversidad fenotípica de Pcy, lo que hace que en la actualidad se estén estudiando las relaciones filogenéticas de los componentes de este grupo, para conocer la relación entre diversidad morfológica y filogenia. La clasificación fenotípica todavía es muy importante para clasificar las poblaciones de Pcy, una primera clasificación dicotómica se realiza en dos tipos celulares en función del tipo de pigmentos disponibles: el primero con autofluorescencia amarilla por ficoeritrina, células PE-Rich y el segundo con autofluorescencia de color rojo por la presencia de ficocianina, células PC-Rich (Wood et al., 1985; Ernst, 1991). Las cepas PE-Rich tienen un máximo relativo de absorción en torno 560 nm y, por lo tanto, absorben la luz verde de manera muy efectiva, mientras que las cepas PC-Rich tienen un pico de absorción entorno a 625 nm y absorben la luz de color rojo anaranjado con más eficacia (Callieri et al., 1996; Haverkamp et al., 2008). Por otro lado se conoce, para el bacterioplacton heterótrofo, que la competencia en ambientes fluctuantes aumenta su diversidad fenotípica (Corno y Jürgens, 2006). Sin embargo, en el caso específico de Pcy todavía no se sabe, por ejemplo, si la adaptación a la luz baja (con el fin de sobrevivir en el límite de la zona fótica) puede ser una fuerza de selección de una cepa mejor adaptada o si

la capacidad de adaptación del propio género es suficiente para sobrevivir en condiciones extremas (Callieri et al., 2012).

La morfometría y el estado trófico influyen fuertemente en la composición, diversidad y abundancia de las comunidades de Pcy en sistemas acuáticos. La luz y la estratificación son factores muy importantes en la generación de nichos específicos para su diferenciación. El estado trófico afecta directamente a la presencia y abundancia relativa de Pcy respecto al nanofitoplancton (Camacho, 2003). En general, se acepta que la proporción de biomasa que aporta Pcy al total del fitoplancton aumenta con la disminución del estado trófico, en parte debido a la alta afinidad de las Pcy por ortofosfato soluble y su capacidad de asimilarlo a muy bajas concentraciones, así como su capacidad para asimilar fuentes orgánicas de fosfato.

También es conocido que la depredación por protozoos o metazooplancton puede influir en el desarrollo de las comunidades de Pcy, produciendo cambios en su composición estructural y taxonómica. Tanto los diferentes grupos de ciliados y de nanoflagelados, como rotíferos y crustáceos, pueden ejercer una importante presión de depredación sobre las Pcy, lo que puede significar un importante enlace trófico entre la producción de las Pcy y la de niveles superiores. La relevancia de las Pcy, como presa del zooplancton de menor tamaño, permite establecer nuevos modelos de interacción entre categorías ecológicas del fitoplancton, respecto al resto de los componentes de la red trófica microbiana (Callieri et al., 2012).

Durante las últimas décadas, se han producido avances importantes en la percepción de la relevancia de las Pcy en sistemas acuáticos de agua dulce. Estas conclusiones han llegado, en gran medida, a partir de un mejor conocimiento de sistemas acuáticos concretos, en los que la investigación ha

permitido estudiar diferentes factores que influyen y determinan la abundancia y dinámica de las Pcy, tanto en su distribución en el perfil vertical como en su dinámica durante el ciclo limnológico. En este sentido, un estudio integrado y multifactorial, en una laguna donde la dominancia de las Pcy es tan importante, puede aportar una valiosa información al conocimiento global de este grupo de microorganismos. En estas tres últimas décadas, se ha recopilado mucha información sobre los factores que afectan a la abundancia y distribución de Pcy (Callieri et al., 2012), pero falta información sobre cómo la diferenciación de diversos nichos, en función de estos factores (luz, temperatura, estado trófico, estabilidad de la columna de agua, presión de depredación...), afecta a su abundancia, desarrollo y dinámica en sistemas acuáticos.

1.2. Antecedentes limnológicos en la Laguna de La Cruz

Los estudios en la Laguna de La Cruz, por parte del grupo de limnología de la Universidad de Valencia, comenzaron en los años 80. Aunque no se ha realizado un seguimiento continuo y regular de la laguna, sí que se han realizado estudios muy detallados, tanto a nivel espacial, en la columna de agua, como durante diferentes períodos de tiempo. De estos trabajos han sido publicados, hasta la fecha, más de 30 artículos y se han leído múltiples tesis doctorales sobre diferentes aspectos limnológicos.

En general, el marco físico y químico siempre está presente en los trabajos realizados, pero los primeros y más detallados artículos revelando los detalles de la estructura física y las características químicas de la laguna fueron publicados por Vicente y Miracle (1988), Miracle et al., (1992), Juliá et al., (1998) y Rodrigo et al., (2001). En estos artículos se describe el origen cárstico de la laguna y su carácter meromítico, así como el desarrollo estacional de la termoclina, el perfil de luz (PAR) y la distribución de los principales nutrientes inorgánicos. Por otro lado, en Rodrigo et al., (1993) se detalla el origen y

desarrollo del proceso de precipitación tumultuosa de carbonato cálcico, (“*whiting*”), que tiene lugar anualmente en la Laguna de La Cruz. Se destaca que el fenómeno se produce principalmente en verano, entre julio y agosto, y se resalta que es el más corto registrado en la bibliografía, con sólo una semana de duración. Esto justifica la intensidad del mismo, con una rápida formación de cristales de carbonato cálcico y una alta tasa de sedimentación.

En cuanto a los estudios relacionados con las comunidades de organismos que habitan en la Laguna de La Cruz, los estudios de la comunidad fitoplanctónica han sido de los más abundantes y detallados (Rojo y Miracle, 1987; Dasí, 1990, Dasí y Miracle, 1991; Miracle et al., 1998; Kiss et al., 2007; Sendra, 2009). En general, desde los primeros estudios se ha observado un ligero aumento en la abundancia de fitoplancton eucariota. Asimismo, se ha observado un aumento en la importancia relativa de grupos como las Crisofíceas o Xantofíceas y, principalmente, de las Conjugadas. En los últimos 30 años se mantiene estable la composición de especies, de nanofitoplancton, en la laguna con algunos cambios en las especies dominantes, principalmente en Clorofíceas, Conjugadas y Cryptomonas, generalmente hacia especies de menor tamaño. El estudio de las comunidades bacterianas ha sido más limitado; principalmente se han estudiado en profundidad las bacterias fotosintéticas presentes en la laguna, bacterias verdes y púrpuras del azufre (Vicente y Miracle, 1988; Rodrigo et al., 1993; Romero, 2007; Romero-Viana, 2006) mostrando que, pese a la limitada concentración de sulfhídrico disponible, se pueden llegar a formar densas poblaciones de bacterias fotosintéticas, estratificadas, con bacterias púrpura del azufre dominando la oxiclina y el hipolimnion superior, y bacterias verdes del azufre dominando el resto del hipolimnion.

Otro de los grupos bien estudiados, a lo largo de estos años en la Laguna de La Cruz, ha sido su comunidad de zooplancton, tanto las comunidades de rotíferos

(Miracle y Vicente, 1983; Koste, 1991; Esparcia et al., 1991; Esparcia, 1993; Armengol et al., 1993; Armengol et al., 1998; Armengol y Miracle, 2000; Esparcia et al., 2001) como de crustáceos (Boronat, 2003) y cladóceros (Boronat et al., 2001), así como su estructura en el perfil y los patrones de migración vertical en esta laguna (Armengol y Miracle, 2000; Boronat, 2003). Se puede generalizar que el zooplancton de la Laguna de La Cruz muestra cambios estacionales en la abundancia relativa de los distintos grupos. Se observa una alternancia de cladóceros y copépodos desde la primavera hasta mediados de verano, teniendo los rotíferos abundancias relativas mayores desde el final del verano y durante el período de mezcla otoño-inverno. Los copépodos presentan poblaciones permanentes, mientras que la presencia de las especies de cladóceros está más restringida a determinadas épocas. Las cinco especies de crustáceos planctónicos, descritos en la Laguna de La Cruz, presentan una estructurada distribución vertical, situándose los cladóceros, los copepoditos y adultos de copépodos en la parte más baja del metalimnion durante la época estival. Mientras que, los nauplios de los copépodos se sitúan, principalmente, en el epilimnion. Durante los períodos de mezcla, las especies de zooplancton presentes se distribuyen por toda la columna. Los ostrácodos (Mezquita, 2002) también han sido estudiados, pese a la escasa zona de bentos litoral que posee la laguna. El perfil vertical y la migración diaria de otros organismos, como *Chaoborus flavicans* (díptero), también han sido estudiados (Starkweather et al., 2005).

A excepción de los estudios realizados sobre bacterias fotosintéticas, la fracción picoplanctónica en la Laguna de La Cruz ha sido, con diferencia, la menos estudiada hasta ahora de la laguna. La presente tesis pretende rellenar este hueco, sobre todo en lo que respecta a un grupo de microorganismos como las Pcy que ha demostrado ser una pieza clave en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, estableciendo su desarrollo, abundancia y dinámica, en

relación al marco físico y químico de la laguna y en relación al resto de microorganismos presentes en ella.

1.3. Objetivos de la tesis

El objetivo principal de esta tesis es el estudio integral de la fracción picoplanctónica pelágica de la Laguna de La Cruz, principalmente de las picocianobacterias, determinando los factores, tanto físicos y químicos como bióticos más importantes, que influyen en sus patrones de distribución, abundancia, actividad y dinámica estacional.

Como objetivos específicos están los siguientes:

Delimitar el marco físico y químico de la Laguna de la Cruz, a lo largo del ciclo hidrológico en el que se desarrolla el presente estudio, profundizando principalmente en el desarrollo y dinámica de los gradientes de densidad (estratificación), luz y nutrientes.

Establecer los patrones de distribución, las abundancias y la dinámica espacial y temporal de las poblaciones de Pcy, en relación a las del resto de microorganismos presentes en la laguna.

Obtener un método cromatográfico (HPLC) que permita determinar y cuantificar los pigmentos fotosintéticos más importantes en mezclas complejas de microorganismos fotosintéticos en lagos estratificados; y establecer así, metodológicamente, la adecuación de las diferentes ecuaciones espectrofotométricas más usadas en la bibliografía a este tipo de ecosistemas estratificados.

Determinar la viabilidad de la citometría de flujo, para la identificación y cuantificación de los microorganismos fotosintéticos presentes en la Laguna de

la Cruz, en comparación con los recuentos realizados por microscopía. Establecer las ventajas e inconvenientes de ambas metodologías.

Cuantificar estacionalmente, en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, las tasas de asimilación inorgánica de carbono, tanto fotosintética (oxigénica y anoxigénica) como por quimiolitotrofia. Determinar la relevancia relativa de cada tipo de metabolismo de asimilación inorgánica de carbono en relación a la biomasa productores primarios en la laguna.

Determinar experimentalmente, con ensayos “*in situ*” y de laboratorio, los factores más relevantes, principalmente disponibilidad de nutrientes, depredación y cantidad y calidad de la luz, que influyen en la abundancia y distribución de las Pcy en la Laguna de la Cruz y en su relación con el resto de microorganismos presentes en la laguna durante el período de estratificación.

1.4. Organización y estructura de esta tesis

La presente tesis se encuentra estructurada en 8 capítulos más las conclusiones generales. El primer capítulo es una introducción general sobre la fracción picoplanctónica, con especial énfasis a la ecología de las picocianobacterias, que son el motivo central de esta tesis; además de resumir la actividad científica que hasta la fecha ha sido publicada de la Laguna de la Cruz, en total más de 30 publicaciones y 6 tesis doctorales sobre diferentes aspectos limnológicos.

El segundo capítulo, de metodología general, integra todas aquellas metodologías que, de alguna manera, son necesarias en el conjunto de la tesis; bien por aparecer en diferentes capítulos o por ser demasiado generales. Cada capítulo puede contar, además, con metodología específica. El capítulo 3 establece el marco físico y químico de la Laguna de La Cruz, mientras que capítulo 4 detalla la distribución, abundancia y dinámica de las Pcy en la

Laguna de La Cruz, en relación con el resto de microorganismos presentes en la laguna.

Los capítulos 5 y 6 son principalmente metodológicos; la Laguna de la Cruz presenta características particulares que hacen que se puedan delimitar muy bien los factores de estudio, lo que la hace un buen sistema modelo para estudios metodológicos. En el capítulo 5 se presentan las modificaciones metodológicas para identificar y cuantificar por HPLC los principales pigmentos de los microorganismos fotosintéticos que alberga la Laguna de la Cruz, así como la viabilidad del uso de determinadas ecuaciones espectrofotométricas para estimar los pigmentos fotosintéticos en este tipo de ecosistemas. En el capítulo 6 se detalla la viabilidad del uso de la citometría de flujo para la identificación y recuento de microorganismos fotosintéticos en mezclas heterogéneas, como los lagos estratificados y, en concreto, en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz.

En el capítulo 7 se describe la actividad de fijación de carbono inorgánico en el perfil vertical de la laguna, así como su dinámica estacional, relacionándolo con la biomasa de los principales microorganismos fijadores de carbono presentes en la laguna. En el capítulo 8 se establecen los factores más relevantes, principalmente nutrientes, depredación y luz, que influyen en la abundancia y distribución de las Pcy. Se integran resultados experimentales “*in situ*” y de laboratorio para establecer además la interacción de Pcy con el resto de microorganismos presentes en la laguna y con los factores físicos y químicos más relevantes durante el período de estratificación. Por último, en las conclusiones finales, se reúnen las conclusiones más relevantes de todos los capítulos anteriores.

1.5. Referencias

- Armengol-Díaz, J., Esparcia, A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (1993). Vertical distribution of planktonic rotifers in a karstic meromictic lake. In *Rotifer Symposium VI* (pp. 381-388). Springer Netherlands.
- Armengol, X., Esparcia, A., & Miracle, M. R. (1998). Rotifer vertical distribution in a strongly stratified lake: a multivariate analysis. *Hydrobiologia*, 387, 161-170.
- Armengol, X., & Miracle, M. R. (2000). Diel vertical movements of zooplankton in lake La Cruz (Cuenca, Spain). *Journal of Plankton Research*, 22(9), 1683-1703.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Estuaries*, 50(2).
- Boronat, L., Miracle, M. R., & Armengol, X. (2001). Cladoceran assemblages in a mineralization gradient. *Hydrobiologia*, 442(1-3), 75-88.
- Boronat, L. (2003). Distribución de los microcrustáceos en Lagunas de Castilla - La Mancha. Ciclos estacionales y migración vertical en lagunas cársticas estratificadas. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia.
- Callieri, C., Amicucci, E., Bertoni, R., & Vörös, L. (1996). Fluorometric characterization of two picocyanobacteria strains from lakes of different underwater light quality. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 81(1), 13-23.
- Callieri, C., Cronberg, G., & Stockner, J. G. (2012). Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 229-269). Springer Netherlands.
- Camacho, A., Picazo, A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2003). Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. *Algalogical Studies*, 109(1), 171-184.

Corno, G., & Jürgens, K. (2006). Direct and indirect effects of protist predation on population size structure of a bacterial strain with high phenotypic plasticity. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 78-86.

Crosbie, N. D., Pöckl, M., & Weisse, T. (2003). Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *Journal of microbiological methods*, 55(2), 361-370.

Dasí Vivó, M. J. (1990). Distribución vertical y variación anual del fitoplancton de una laguna cárstica meromítica de Cuenca, La Laguna De La Cruz. Tesis de Licenciatura. Universitat de València.

Dasí, M.J. & Miracle, M.R. (1991). Distribución vertical y variación estacional del fitoplancton de una laguna cárstica meromítica, la Laguna de la Cruz (Cuenca, España). *Limnetica*, 7, 37-59.

Di Poi, E., Blason, C., Corinaldesi, C., Danovaro, R., Malisana, E., & Fonda-Umani, S. (2013). Structure and interactions within the pelagic microbial food web (from viruses to microplankton) across environmental gradients in the Mediterranean Sea. *Global Biogeochemical Cycles*, 27(4), 1034-1045.

Ernst, A. (1991). Cyanobacterial picoplankton from Lake Constance. I. Isolation by fluorescence characteristics. *Journal of plankton research*, 13(6), 1307-1312.

Esparcia Collado, A. (1993). Distribuciones de las poblaciones de rotíferos en la oxiclina de La Laguna de La Cruz. Adaptaciones metabólicas a la microaerofilia en *Brachionus plicatilis*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Esparcia, A. (2001). Relacion de la distribucion de los rotiferos con la de los principales factores físicos y químicos en la Laguna de La Cruz. *Limnetica*, 20(2), 305-320.

Esparcia, A., Armengol, J., Vicente, E., & Miracle, M. R. (1991). Vertical distribution of Anuraeopsis species as related to oxygen depletion in two stratified lakes.

Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie
Verhandlungen, 24, 2745-2749.

Hauschild, C. A., McMurter, H. J., & Pick, F. R. (1991). Effect of spectral quality on growth and pigmentation of picocyanobacteria. *Journal of phycology*, 27(6), 698-702.

Haverkamp, T. H., Schouten, D., Doeleman, M., Wollenzien, U., Huisman, J., & Stal, L. J. (2009). Colorful microdiversity of *Synechococcus* strains (picocyanobacteria) isolated from the Baltic Sea. *The ISME journal*, 3(4), 397-408.

Johnson, P. W., & Sieburth, J. M. (1979). Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and oceanography*, 24(5), 928-935.

Johnson, P. W., & Sieburth, J. M. (1982). In situ morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *Journal of Phycology*, 18(3), 318-327.

Julià, R., Burjachs, F., Dasí, M. J., Mezquita, F., Miracle, M. R., Roca, J. R. & Vicente, E. (1998). Meromixis origin and recent trophic evolution in the Spanish mountain lake La Cruz. *Aquatic Sciences*, 60(4), 279-299. *aleolimnology*, 40(2), 703-714.

Kiss, K. T., Ács, É., Szabó, K. É., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2007). Morphological observations on *Cyclotella distinguenda* Hustedt and *C. delicatula* Hustedt from the core sample of a meromictic karstic lake of Spain (Lake La Cruz) with aspects of their ecology. *Diatom Research*, 22(2), 287-308.

Komarkova, J. (2002). Cyanobacterial picoplankton and its colonial formations in two eutrophic canyon reservoirs (Czech Republic). *Archiv für Hydrobiologie*, 154(4), 605-623.

Koste, W. (1991). *Anuraeopsis miraclei*, a new planktonic rotifer species in karstic lakes of Spain. *Hydrobiologia*, 209(2), 169-173.

- Li, W. K. W., Rao, S., Harrison, W. G., Smith, J. C., Cullen, J. J., Irwin, B., & Platt, T. (1983). Autotrophic picoplankton in the tropical ocean. *Science (Washington)*, 219(4582), 292-295.
- Magazzu, G., & Decembrini, F. (1995). Primary production, biomass and abundance of phototrophic picoplankton in the Mediterranean Sea: a review. *Aquatic Microbial Ecology*, 9(1), 97-104.
- Mezquita, F., boronat, M. D., & miracle, M. R. (2002). The life history of *Cycloocypris ovum* (Ostracoda) in a permanent karstic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 155(4), 687-704.
- Miracle, M.R. & Vicente, E. (1983). Vertical distribution and rotifer concentrations in th chemocline of meromictic lakes. *Hydrobiologia*, 104, 259-267.
- Miracle, M. R., Vicente, E., & Pedrós-Alió, C. (1992). Biological studies of Spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica*, 8, 59-77.
- Miracle, M. R., Dasi, M. J., & Vicente, E. (1998). Forced phytoplankton vertical migrations due to lake water Whiting. *Verhandlungen-Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 26, 1749-1754.
- Passoni, S., & Callieri, C. (2001). Picocyanobacteria single forms, aggregates and microcolonies: survival strategy or species succession?. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 27(4), 1879-1883.
- Pittera, J., Humily, F., Thorel, M., Grulois, D., Garczarek, L., & Six, C. (2014). Connecting thermal physiology and latitudinal niche partitioning in marine *Synechococcus*. *The ISME journal*, 8(6), 1221-1236.
- Robertson, B. R., Tezuka, N., & Watanabe, M. M. (2001). Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the

phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 861-871.

Rodrigo, M. A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (1993). Short-term calcite precipitation in the karstic meromictic Lake La Cruz (Cuenca, Spain). *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 25(2), 711-719.

Rodrigo, M. A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2001). The meromictic Lake La Cruz (Central Spain). Patterns of stratification. *Aquatic sciences*, 63(4), 406-416.

Rojo, C. and M. R. Miracle. (1987). Poblaciones fitoplanctónicas de La Laguna de La Cruz (Cuenca), una laguna cársica meromíctica. *Act. VI Simp. Nac. Bot. Crip.* 119-135.

Romero, L., Camacho, A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (2006). Sedimentation patterns of photosynthetic bacteria based on pigment markers in meromictic Lake La Cruz (Spain): paleolimnological implications. *Journal of Paleolimnology*, 35(1), 167-177.

Romero, L., (2007). Paleolimnological study in two karstic lakes: climate signal in varved sediment and phototrophic organisms variability, *Universitat de València, València (España)*, 174 pp.

Sendra, M. D. (2009). Distribución del fitoplancton en la Laguna de La Cruz y su relación con los nutrientes. Tesis doctoral. *Universitat de València, València (España)*, 174 pp.

Sieburth, J. M., Smetacek, V., & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and oceanography*, 23(6), 1256-1263.

Starkweather, P. L., Miracle, M. R., Vicente, E., Picazo, A., & Vidal, J. (2005). Diel distribution and migration of *Chaoborus flavicans*: A field analysis using broadband

Acoustic Doppler Current Profiler (ADCP) techniques. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen, 29(2), 672-677.

Stockner, J. G., & Antia, N. J. (1986). Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. Canadian journal of fisheries and aquatic sciences, 43(12), 2472-2503.

Stockner, J., Callieri, C., & Cronberg, G. (2002). Picoplankton and other non-bloom-forming cyanobacteria in lakes. In The ecology of cyanobacteria (pp. 195-231). Springer Netherlands.

Vicente, E., & Miracle, M. R. (1988). Physicochemical and microbial stratification in a meromictic karstic lake of Spain. Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol, 23, 522-529.

Vörös, L., Callieri, C., Katalin, V., & Bertoni, R. (1998). Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. In Phytoplankton and Trophic Gradients (pp. 117-125). Springer Netherlands.

Waterbury, J. B., Watson, S. W., Valois, F. W., & Franks, D. G. (1986). Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. Can Bull Fish Aquat Sci, 214(71), 120.

Wood, A. M., Horan, P. K., Muirhead, K., Phinney, D. A., Yentsch, C. M., & Waterbury, J. B. (1985). Discrimination between types of pigments in marine *Synechococcus* spp. by scanning spectroscopy, epifluorescence microscopy, and flow cytometry. Limnology and Oceanography, 30(6), 1303-1315.

Capítulo 2

Metodología General

En el presente capítulo se describe la metodología general empleada para la realización de esta tesis. La información de este capítulo, tanto de los equipos como de los métodos empleados, se establece en función de la necesidad que de esa información en capítulos posteriores. La metodología específica se encuentra en su capítulo.

Lugar de estudio y periodicidad de los muestreos

El cuerpo principal de esta tesis lo constituyen los trabajos realizados en la Laguna de La Cruz, de esta laguna se ha realizado un seguimiento mensual durante los años 2005, 2006 y 2007. El ciclo limnológico estudiado con más detalle ha sido el del 2006, en el que además se realizaron los muestreos estacionales para la determinación de la asimilación de carbono inorgánico en el perfil vertical, así como los bioensayos y experimentos más importantes. El conjunto de torcas del que forma parte la laguna, base del presente trabajo, se localiza en el municipio “Cañada del Hoyo”, en la provincia de Cuenca (Comunidad de Castilla-La Mancha), distribuyéndose a ambas márgenes del río Guadazaón. Se trata de una zona cárstica, en la parte sur de la Serranía Conquense y a una altitud de 1.032 m.s.n.m. (UTM30SWK9627, coordenadas 39 59 16.0008903 N - 1 52 25.1449818 W). El conjunto consta de 34 torcas, 12 quedan en la margen izquierda y 22 en la margen derecha, entre las que se encuentra la Laguna de La Cruz que junto con 6 lagunas más, forman el conjunto de lagunas de la margen derecha que presentan agua permanentemente (Rodrigo, 1997).



Figura 2.1 Vista aérea del sistema lagunar de Cañada del Hoyo y fotografía, en detalle, de La Laguna de La Cruz.

Batimetría

Los diferentes perfiles batimétricos, para la caracterización de la cubeta, se realizaron con una ecosonda Lowrance LCX-15 CT Color Recording Sonar (Dual-frequency 50-200 kHz selectivity).

Perfiles verticales. Caracterización física y química

Sonda multiparamétrica CTD “Seabird”

La sonda multiparamétrica CTD (acrónimo de Conductivity, Temperature y Depth) “Seabird SBE 19” es una herramienta muy precisa para la determinación de propiedades físicas y químicas en sistemas acuáticos. Proporciona importante información de la distribución, en el perfil vertical, de las variables medidas en los sensores instalados. Para la realización de esta tesis doctoral, la sonda tenía equipados los sensores básicos (CTD) de temperatura, conductividad y profundidad más dos conjuntos de sondas.

1. Temperatura (°C)
2. Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
3. Presión (profundidad, m)

Set 1:

4. Oxígeno disuelto (ppm, %)
5. Clorofila *a* ($\mu\text{g l}^{-1}$). Fluorimetría
6. Ficocianina (U.A.F.). Fluorimetría
7. Ficoeritrina (U.A.F.). Fluorimetría

Set 2:

8. cDOM (materia orgánica disuelta) (ppm SQ). Fluorimetría
9. pH
10. Eh (O.R.P.)
11. Turbidez (NTU)

Sonda independiente acoplada a SBE 19:

12. Phytoflash (rendimiento fotosintético)

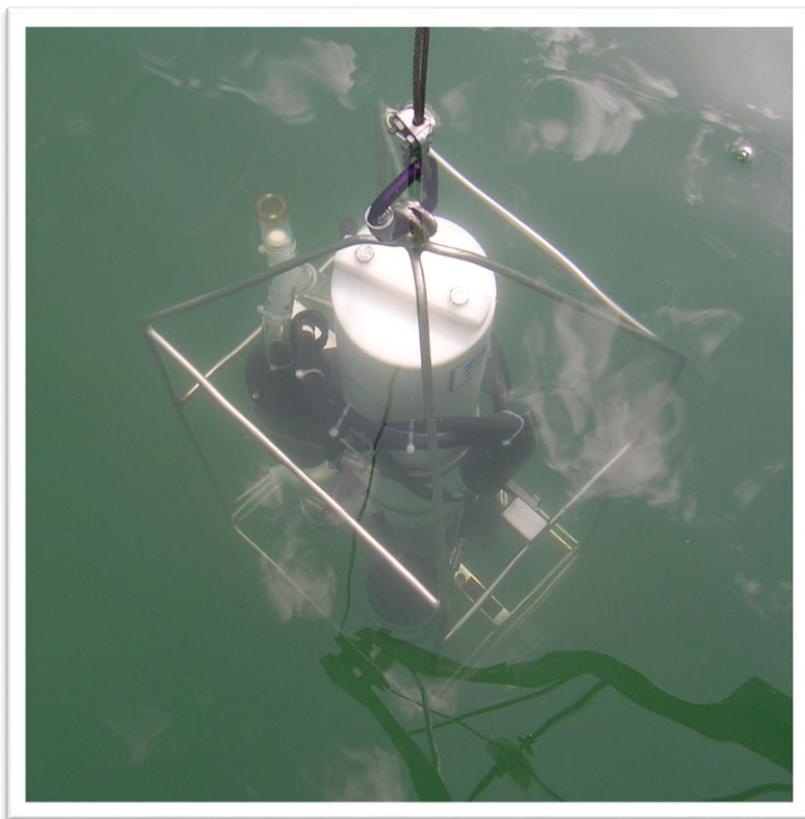


Figura 2.2 Sonda multiparamétrica CTD (Seabird 19), durante un perfil vertical, en la Laguna de La Cruz.

1. Temperatura (°C)

El sensor de temperatura, incorporado en la CTD, tiene un rango de medición que se sitúa entre -5 °C y 35 °C , con una exactitud de $0,01\text{ °C}$ / 6 meses y una resolución de $0,001\text{ °C}$.

El valor de temperatura obtenido se representa como T90 (The International Temperature Scale of 1990 (ITS-90)), que sustituye a la anterior IPTS68. Para todos los equipos anteriores a 1990 la temperatura es T68, todos los estudios

anteriores en las diferentes lagunas, no realizados con el Seabird, siguen ese estándar, por lo que para comparar los resultados la transformación sería:

$$T_{68} = 1.00024 * T_{90}$$

2. Conductividad específica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)

El perfilador vertical, SBE 19 SEACAT, realiza las medidas de conductividad en dos escalas diferentes, una normal y otra en rango bajo; esta última es la más adecuada para agua dulce, con un rango de medición entre 0-0,6 S/m, una exactitud de 0,001 S m/1 / 6 meses y una resolución de 0,0001 S m/1.

Para el estudio de la conductividad, en sistemas acuáticos naturales, se recomienda que la medida de conductividad se corrija por la temperatura; aunque existen alternativas, la más usada es la que usa como referencia la temperatura de 25°C y viene definida por la fórmula (Standard Methods, 2005):

$$\text{Conductividad específica } [\mu\text{mhos/cm}] = (C * 10,000) / (1 + A * (T-25))$$

donde:

C = conductividad [S/m]

T = temperatura [°C]

A = “thermal coefficient” o conductividad para soluciones salinas iónicas naturales

(S/m = Siemens/metro, 1 S/m = 10 milimhos/cm)

La conversión de las medidas de conductividad en medidas de concentración iónica (salinidad) se define por la “Practical Salinity Scale (PSS-78)(UNESCO, 1981). Sin embargo, esta conversión viene definida por los ratios iónicos en agua de mar estándar, por lo que en agua dulce, el cálculo de la concentración iónica (salinidad), a partir de la conductividad, no se encuentra bien definida de manera global, siendo necesario el desarrollo de una ecuación específica para cada sistema. En nuestro caso usamos los ratios estándar, por lo que los

resultados de salinidad se usarán para estudios comparativos del perfil vertical y la dinámica temporal en una misma masa de agua, pero no en la comparación de sistemas acuáticos.

3. Presión (profundidad (m))

Sensor de presión “Paroscientific Digiquartz” modificado por temperatura, configurado con un rango de 0-100 psia, una exactitud de 0,25 psia y una resolución 0,15 psia.

El cálculo de la profundidad para agua dulce (a nivel del mar) se realiza así:

$$\text{Profundidad (m)} = p * 1.019716$$

p = presión en decibares

Para sistemas acuáticos a diferente altura, respecto al nivel del mar, se toman las primeras medidas del equipo con el sensor de presión a 25 cm bajo la superficie del agua, y con esta medida de referencia se corrige todo el perfil vertical.

4. Oxígeno disuelto (sensor SBE-43).

El sensor de oxígeno disuelto SBE-43, instalado en el perfilador vertical SBE 19 SEACAT, es de tipo membrana polarográfica; el sensor recoge los datos de voltaje para su posterior procesado y conversión a concentración de oxígeno disuelto (ml/l), siguiendo una versión modificada de los algoritmos de Owens and Millard (1985).

$$\text{Oxygen (ml/l)} = [\text{Soc} * (\text{V} + \text{Voffset}) * \exp(\text{Tcor} * \text{T}) * \text{Oxsat}(\text{T},\text{S}) * \exp(\text{Pcor} * \text{P})$$

donde:

V = SBE 43 output voltaje (volts)

T = CTD temperatura (°C)

S = CTD salinidad (psu)

P = CTD presión (dbars)

Oxsat(T,S) = saturación de oxígeno (ml/l)

Coefficientes (Calibración 29 de diciembre de 2005)

$$\text{SOC} = 0,4292$$

$$\text{Voffset} = -0,5100$$

$$\text{Tcor} = 0,0009$$

$$\text{Pcor} = 1,35 * 10^{-4}$$

5. Clorofila-*a* (WETStar de Wetlabs)

En el perfilador vertical SBE 19 SEACAT se encuentra instalado el sensor de concentración de clorofila “WETStar fluorometer (WS1S-373)” de wetlabs; el sensor tiene unas longitudes de onda de excitación/emisión (Ex/Em) de 470/695 nm y una sensibilidad de 0.025 µg/l, con un rango (“high range”) entre 0,01 y 150 µg/l.

El cálculo de la concentración de clorofila se calcula a partir de la ecuación:

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/l}) = (\text{Output} - \text{Blank Output}) * \text{Scale Factor}$$

donde:

Output (volts) = salida en voltaje del sensor

Blank Output (volts) = medida del blanco en voltaje de agua filtrada

Scale Factor (µg/l–volt) = multiplicador

El blanco se determinó periódicamente con agua destilada (MilliQ). El factor de calibración que proporciona Wetlabs se puede usar para obtener valores aproximados de concentración de clorofila, sin embargo, es aconsejable, en estos casos, obtener factores de calibrados de campo. La relación entre la fluorescencia de la clorofila *a* y su concentración es muy variable; para una buena calibración de este tipo de sensores, el factor de escala se debe corregir cuando el tipo de plancton cambia, bien por cambios estacionales o por tratarse

de sistemas acuáticos distintos. Las correlaciones se realizaron con medidas de clorofila *a* obtenidas por espectrofotometría y HPLC.

6. Ficocianina (Cyclops-7 de Turner)

Con el fluorímetro Cyclops-7 obtenemos información de la concentración de ficocianina en la columna de agua; este pigmento lo poseen principalmente cianobacterias, lo que nos permite conocer la abundancia de este grupo y si presenta máximos profundos. Las longitudes de onda de excitación/emisión son Ex: 630 y Em: 660, con un rango (X1 Gain) de entre 1.400 y 2 millones de células/ml.

7. Ficoeritrina (Fluorímetro Seapoint)

Con este fluorímetro se puede determinar la concentración de ficoeritrina en la columna de agua que, al igual que la ficocianina, es un pigmento característico de cianobacterias (aunque sólo de algunas especies características), lo que nos permite definir, con más precisión, el tipo de cianobacterias que encontramos en el perfil vertical. Las longitudes de onda de excitación/emisión son Ex: 540 y Em: 610, con un rango entre 0,03 y 150 µg/l.

8. CDOM (Wetlabs)

El fluorímetro de CDOM (“Colored dissolved organic matter”) Wetstar permite la medida de concentraciones relativas de materia orgánica disuelta; los valores se obtienen midiendo, directamente, la emisión de fluorescencia del agua tras la excitación con ultravioleta. El agua se bombea al interior del equipo, en una cubeta de cuarzo donde la muestra es excitada con 2 leds de 370 nm (10 nm FWHM) y un sensor situado a 90° recoge la emisión a 460 nm (120 nm FWHM). El equipo presenta una sensibilidad de 0.025 ppb QS con un range de hasta 100 ppb.

La concentración de CDOM “QSDE” (Quinine Sulfate Dihydrate Equivalent) viene expresada en ppb y se obtiene a partir de la ecuación:

$$CDOM \text{ “QSDE” (ppb)} = \text{Factor de escala X (Voutput-Voffset)}$$

donde:

Output (volts) = salida en voltaje del sensor

Blank Output (volts) = medida del blanco en voltaje de agua filtrada

Scale Factor ($\mu\text{g/l-volt}$) = multiplicador

Coefficientes (Calibración 4 de mayo de 2005)

Voffset (voltios) = -0,052

Factor de escala = 68 pb/V

El valor de blanco (Voffset) se comprueba periódicamente con agua destilada (MilliQ).

Turbidez (Seapoint)

El turbidímetro Seapoint, instalado en la CTD, detecta la luz dispersada por las partículas en suspensión en el agua; el sensor emite luz de 880 nm y mide la dispersión de esa luz emitida.

$$Turbidez (FTU) = \text{Factor de escala X (Voutput-Voffset)}$$

Factor de escala:

G100X	(200 mV/FTU)	rango de 0-25 FTU
G20X	(40 mV/FTU)	rango de 0-125 FTU
G1x	(2 mV/FTU)	rango de 0-759 FTU

Phytoflash (Turner)

Esta metodología de fluorescencia activa (pulsante) permite estimar el rendimiento fotosintético en el perfil de la columna de agua, gracias a este dato sabemos la eficacia con la que se está realizando la fotosíntesis en el sistema

acuático, pudiendo así sacar conclusiones de su productividad. Se pueden encontrar más detalles en el capítulo 7.

Toma de muestras, separación y fijación “*in situ*”.

Toma de muestras

La toma de muestras se realizó desde abril de 2005 a septiembre de 2007. La frecuencia de muestreo fue, aproximadamente, mensual.

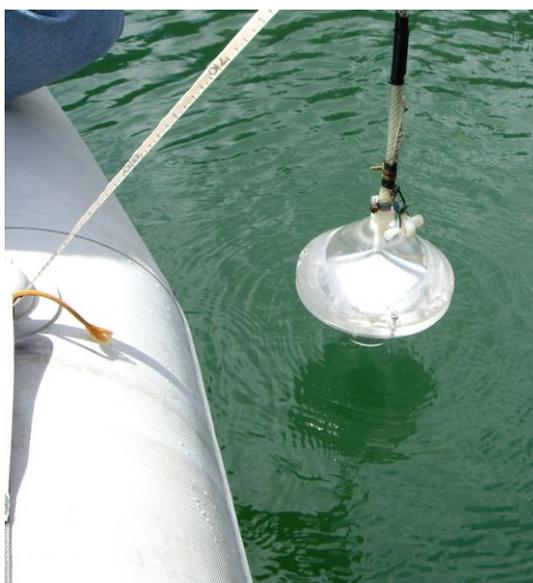


Figura 2.2 Doble cono, para el muestreo de sistemas estratificados, durante una toma de muestras en la Laguna de La Cruz.

Tras determinar los perfiles físicos y químicos, con la sonda multiparamétrica CTD de temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, turbidez, pH, O.R.P., CDOM, clorofila-*a*, ficoeritrina y ficocianina, se realizaba la selección de los puntos de muestreo y se pasaba a la toma de muestras. En total se tomaban entre 15 y 20 muestras, centrando la atención en la zona de la interfase óxico-anóxica

y sus alrededores, así como en las zonas de máximos de oxígeno por coincidir, habitualmente, con máximos poblacionales de organismos fotosintéticos.

El método de muestreo elegido para la toma de muestras de agua debe ser adecuado para el objetivo que se pretende estudiar. Así, se usó un sistema de doble cono con entrada laminar (Miracle et al., 1992) (figura 2.2), con una resolución vertical entre 2,5 y 5 cm (Gasol et al., 1990).

La recogida de las muestras se realizaba en recipientes adecuados, con tratamiento previo si era preciso (conservantes o reactivos), guardándose las muestras a 4° C en oscuridad hasta su procesado (Sendra, 2009).

Métodos analíticos

Métodos químicos instrumentales

Variables determinadas en laboratorio

Los métodos utilizados, para determinar las variables que se señalan en este apartado, son los descritos por la bibliografía general de análisis de agua (Strickland y Parsons, 1972; Golterman et al., 1978; Wetzel y Likens, 1979; Rodier, 1984; APHA-AWWA-WPCF, 1992). En este apartado se realiza una breve descripción del fundamento de cada determinación, pudiéndose encontrar una descripción más detallada, en cuanto al procedimiento y reactivos utilizados en cada caso, en Camacho (1997). Cuando se precisaba la utilización de técnicas de espectrofotometría se empleó un espectrofotómetro UV-Visible Beckman, modelo DU-7, complementado con un sistema de salida de datos, para permitir su almacenaje en soporte informático y su posterior tratamiento en caso de necesitarse.

Nitrito

Su determinación se basa en la reacción de Griess. En medio ácido, el nitrito se transforma en ácido nitroso, el cual reacciona con la sulfanilamida formando

una sal diazónica, que reacciona de forma cuantitativa con la naftil-etilendiamida para dar un compuesto que toma una coloración rosada detectable, cuantitativamente, por espectrofotometría (Golterman et al., 1978).

Nitrato

El nitrato se puede determinar reduciéndolo de forma cuantitativa a nitrito, el cual se estima por el método de Griess; para ello se pasa la muestra tamponada (pH=8) por una columna reductora de cadmio cuperizado (Golterman et al., 1978).

Amonio

La concentración de amonio en las muestras se determinó por el método del azul de indofenol modificado (Golterman, 2004). El método es sensible entre 0-70 μ M. Tras una incubación previa (30 minutos) con salicilato de sodio se añade isocianurato en medio alcalino durante una hora. Tras la que se mide la absorbancia a 630 nm.

Fósforo reactivo soluble

El fósforo reactivo soluble puede estimarse mediante espectrofotometría ya que, en medio ácido, los iones fosfato reaccionan con el molibdato dando un compuesto de color amarillo, el fosfomolibdato, el cual tras una reducción con ácido ascórbico da lugar a un compuesto de color azul (azul de molibdeno), cuya intensidad es proporcional a la concentración de fosfato.

Fósforo total

Se puede determinar mediante el método del azul de molibdeno (Golterman et al., 1978), tras realizar una digestión ácida de la muestra; se provoca así la hidrólisis de los polifosfatos y los compuestos orgánicos que contienen fósforo, llegando a ortofosfato, el cual ya puede determinarse mediante el método antes expuesto.

Nitrógeno total

El nitrógeno total se determinó espectrofotométricamente tras doble digestión (Golterman, 2004) basada en el método de Koroleff (1983) modificado por Qualls (1989) por el método de la segunda derivada de la curva de absorbancia en el UV medida a 224 nm.

Silicato reactivo soluble

El silicato, en medio ácido, reacciona con el molibdato amónico dando un compuesto de color amarillo (ácido molibdosilícico), el cual puede reducirse dando un compuesto de color azul; dicha coloración es proporcional al silicato contenido en la muestra (Rodier, 1984) y puede estimarse mediante espectrofotometría.

Métodos separativos**Procedimiento de extracción de pigmentos**

Para la extracción de pigmentos, el seston se recuperó, por filtración de agua de cada profundidad, en filtros GF/F (Whatman 47mm). Después de eso, los filtros se colocaron en tubos Corning que contenían 5 ml de acetona 90% (modificado de Strickland y Parsons, 1972). Con el fin de facilitar la extracción, las muestras se sometieron a ultrasonidos, durante 5 minutos, varias veces. Las muestras se colocaron después a -20 °C en la oscuridad, durante al menos 8 horas. Posteriormente, los tubos se centrifugaron (3000x g durante 10 min) y el pellet fue descartado. El sobrenadante se filtró a través de PTFE filtros de 0,2 µm (VWR) y se procesó en las siguientes 3 horas. Las determinaciones espectrofotométricas y HPLC se llevaron a cabo en paralelo, con dos alícuotas del mismo extracto.

Determinación de pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría visible

Se realizaron medidas espectrofotométricas, con 2 ml de extracto filtrado en cubetas de cuarzo de 1 cm, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-7 UV-Visible. Los espectros de escaneo desde 350 a 900nm, con una resolución de 0,5nm, se registraron y procesaron digitalmente. La concentración de diferentes pigmentos fotosintéticos se obtuvo mediante el uso de los algoritmos compilados en la tabla 5.1 del capítulo 5.

Pigmentos, determinación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para analizar la composición de pigmentos por HPLC, una alícuota de 150 µl de cada extracto se inyectó en un sistema de HPLC con un detector PDA 996. Para mejorar la separación los diferentes pigmentos fotosintéticos, y antes de la inyección, las alícuotas se mezclaron con un volumen de acetato de amonio (agente de apareamiento iónico), a una concentración final de 0,1mM. El sistema estaba equipado con dos columnas (Spherisorb S5 ODS2), que trabajan en serie, cada carrera tiene una duración de 95 min a 35°C, en un gradiente de metanol/amonio/acetato/acetona modificado de Pinckney et al., (1996), para mejorar la separación (ver gradiente en la tabla 2.1). Los pigmentos eluidos se detectaron mediante PDA, en un rango de absorbancia de 380 a 800nm. Las identidades de cada pico se determinaron, mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros con los estándares puros comprados a DHI®, o con cromatogramas obtenidos de cultivos de algas o bacterias del azufre puros. En todos los casos, las correlaciones lineales se realizaron con intercepción forzada a cero. Para algunos carotenoides algales, y todos los pigmentos bacterianos, las concentraciones se calcularon usando coeficientes de extinción específicos (Foppen, 1971; Jeffrey et al., 1999).

Tabla 2.1. Resumen de la carrera cromatográfica (HPLC) para la separación de pigmentos fotosintéticos en la Laguna de La Cruz.

Tiempo (min)	Flujo (ml min ⁻¹)	Metanol %	Acetato amónico 0.1 M %	Acetona %
0	0.8	80	20	0
5	0.8	80	10	10
45	1.25	80	5	15
50	1.5	80	0	20
65	0.8	80	0	20
67	0.8	80	20	0
95	0.8	80	20	0

Enumeración y cálculo de biomasa de microorganismos

Para proceder al recuento de picoplancton fotosintético y no fotosintético, las muestras de agua se fijaron con una solución de paraformaldehído: glutaraldehído tamponado con PBS (solución a una concentración final de 1%: 0,05% respectivamente, Marie et al., 1997). Una vez en el laboratorio diferentes submuestras de entre 0,1 y 5 ml, dependiendo de la cantidad aproximada de biomasa microbiana, se filtraron a través de filtros negros con tamaño de poro de 0,2 µm (Nuclepore™) a baja presión. Una cuarta parte de filtro se contó directamente bajo un microscopio de epifluorescencia Zeiss RS III (1250x), y las células se clasificaron, como picocianobacteria (Pcy) o picoeukariotas (Ape), en base a su autofluorescencia, forma, tamaño celular y la presencia de cloroplastos.

El recuento de NPB, bacterias no fotosintéticas, (heterótrofas y quimiolitotrofas), otro cuarto del filtro se tiñó con DAPI (Porter y Feig, 1980) y se contó con un microscopio de epifluorescencia invertida (1250x) Zeiss III RS.

Tanto el DAPI como las células con auto-fluorescencia inducida se observaron mediante el uso de filtros estándar para la excitación en el ultravioleta y en el azul (MacIsaac y Stockner, 1993).

Por otro lado, las bacterias fotosintéticas del azufre, después de ser retenidas en un filtro de acetato de celulosa (0,2 μm de diámetro de poro), se contaron por contraste de fase con un microscopio Zeiss RS III en 1250x. Estos filtros se secaron y se tiñeron con eritrosina fenicada para permitir la identificación células (Jones, 1979).

Para el recuento de nanofitoplancton eucariota, de ciliados y nanoflagelados, las muestras de agua se fijaron con solución de Lugol y 50 ml se dejaron en las cámaras de sedimentación Utermöhl durante 48h (Utermöhl, 1958). En este caso, la identificación y el recuento se realizaron con un microscopio Nikon Eclipse TE2000-S invertido en 600x y 1000x.

En todos los casos, al menos 500 individuos fueron contados y 10 individuos de cada especie fueron medidos con el fin de calcular el biovolumen y poder realizar los cálculos de biomasa.

Los factores de conversión de biomasa, para convertir biovolumen a contenido de carbono, se tomaron de diversas fuentes. Para picoprocariotas y piceoeucariotas se tomó de Worden (2004), mientras que el factor de conversión de la biomasa de nanofitoplancton se obtuvo de Wetzel (2001). El contenido en carbono de las células bacterianas y su biomasa total de se calculó de acuerdo a Loferer-Kröbächer et al., (1998).

Bibliografía

- APHA - AWWA - WPCF, (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th edition. American Public Health Association. Washington D. C.
- Camacho, A., (1997). Ecología de los microorganismos fotosintéticos en las aguas microaerobias y anóxicas de la laguna de Arcas. Tesis Doctoral. Departamento de Ecología y Microbiología. Universidad de Valencia.
- Foppen, F. H. (1971). Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatographic reviews*, 14(3), 133-298.
- Gasol, J. M., Mas, J., Pedrós-Alió, C., & Guerrero, R. (1990). Ecología microbiana y limnología en la laguna Cisó: 1976–1989. *Scientia gerundensis*, 16(2), 155-178.
- Golterman, H. L., Clymo R. S. & Ohnstad M. A. M. (1978). Methods for physical and chemical analysis of freshwaters. IBP Handbook no 8. Blackwell Sci. Pub., Oxford, U. K.
- Golterman, H. L. (2004). The chemistry of phosphate and nitrogen compounds in sediments—Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, Boston, London.
- Jeffrey, S. W., Wright, S. W., & Zapata, M. (1999). Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*, 50(8), 879-896.
- Jones, J. G. (1979). Direct counts on membrane filters. In. *A Guide to Methods for Estimating Microbial Numbers and Biomass in Freshwaters*. FBA Scientific Publications 39, 19-39.
- Koroleff, F. (1983). Simultaneous oxidation of nitrogen and phosphorus compounds by persulfate. *Methods of seawater analysis*, 2, 205-206.

- Loferer-Kröbächer, M., Klima, J., & Psenner, R. (1998). Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 688-694.
- MacIsaac, E. A., & Stockner, J. G. (1993). Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla, 187-197.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., & Vaulot, D. (1997). Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 186-193.
- Miracle, M. R., Vicente, E., & Pedrós-Alió, C. (1992). Biological studies of Spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica*, 8, 59-77.
- Pinckney, J. L., Millie, D. F., Howe, K. E., Paerl, H. W., & Hurley, J. P. (1996). Flow scintillation counting of ¹⁴C-labeled microalgal photosynthetic pigments. *Journal of Plankton Research*, 18(10), 1867-1880.
- Porter, K. G., & Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25(5), 943-948.
- Qualls, R. G. (1989). Determination of total nitrogen and phosphorus in water using persulfate oxidation: a modification for small sample volumes using the method of Koroleff (1983). The biogeochemical properties of the retention of nitrogen, phosphorus, and carbon. Ph. D. dissertation, University of Georgia Institute of Ecology, Athens, GA. University Microfilms, Inc. no DEX9003448.
- Rodier, J. (1984). *L'analyse de l'eau*. 7eme édition. Dunot, Paris.

Rodrigo, M. A., (1997). Limnología comparada de las lagunas de dos sistemas cársticos de Cuenca. Bacterias fotosintéticas de la Laguna de La Cruz y la laguna Arcas-2. Tesis Doctoral. Departamento de Ecología y Microbiología. Universidad de Valencia.

Sendra, M. D. (2009). Distribución del fitoplancton en la Laguna de La Cruz y su relación con los nutrientes. Tesis doctoral. Universitat de València, València (España), 174 pp.

Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). Determination of reactive silicate. A Practical Handbook of Seawater Analysis, 65-70.

Utermöhl, H. (1958). Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitt. int. Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, 9, 1-38.

Wetzel, R. G. (2001). Limnology: lake and river ecosystems. Gulf Professional Publishing.

Wetzel, R. G., & Likens, G. E. (1979). Limnological Analysis WB Saunders. Co. Philadelphia, 357.

Worden, A. Z., Nolan, J. K., & Palenik, B. (2004). Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: the importance of the eukaryotic component. Limnology and Oceanography, 49(1), 168-179.

Capítulo 3

Caracterización de las principales variables físicas y químicas en la Laguna de La Cruz

3.1. Introducción

La caracterización física y química de los ecosistemas acuáticos ha sido, históricamente (Hutchinson, 1958; Lerman et al., 1995), un aspecto esencial a la hora de comprender e interpretar el desarrollo y la dinámica de las poblaciones de organismos presentes en estos ecosistemas y, de forma global, entender su funcionamiento (Margalef, 1983; Wetzel, 2001). Aspectos como la climatología, la meteorología y conceptos como el balance térmico, la intensidad y la dinámica del proceso de estratificación térmica estival dependiente de factores climáticos, la intensidad y calidad de la luz en la columna de agua y la limitación por nutrientes, han mostrado ser factores claves en la distribución y la dinámica de los organismos acuáticos y particularmente relevante para el desarrollo y dinámica del picoplancton autótrofo en sistemas acuáticos de agua dulce (Camacho et al., 2003), así como para comprender la dominancia de las cianobacterias en sistemas acuáticos (Postius y Ernst, 1999; Dokulil y Teubner, 2000).

De manera general, en la caracterización física y química, los aspectos más relevantes que influyen en los ecosistemas acuáticos son, por un lado, las características propias del propio lago y, por otro lado, los factores climáticos a los que está expuesto. Las principales características internas que marcan la respuesta climática en estos sistemas son, la profundidad máxima, el tamaño y morfología de la cubeta y su exposición al viento. Por otro lado, los principales factores externos a los que estos ecosistemas responden son, la radiación solar, la temperatura del aire, la humedad y precipitación, la estabilidad del aire sobre la superficie del agua y el viento. Asimismo, en algunos sistemas acuáticos, la formación anual de una capa de hielo, su espesor y su albedo también pueden ser de gran relevancia (Ragotzkie, 1978).

Capítulo 3

En ecosistemas acuáticos profundos se dan períodos de estratificación, con importantes diferencias de densidad entre el agua de superficie y el agua de mayor profundidad. La estratificación y su evolución es consecuencia de la interacción de la superficie del lago con factores físicos, como variables climáticas y meteorológicas, radiación solar incidente, intercambio de calor con la atmósfera, y en menor medida, el efecto de las precipitaciones, el viento y la posible congelación invernal de la superficie. Las diferencias de densidad en el perfil vertical son consecuencia, tanto de gradientes de temperatura como de gradientes químicos debido a las diferentes sustancias disueltas en el agua (Boherer y Schultze, 2008). El gradiente térmico de densidad es el que permite que se establezca la estratificación térmica estival en lagos como La Laguna de La Cruz, donde, además, por su carácter meromítico, existe una quimioclina permanente, en torno a los 16 m de profundidad, que delimita el monimolimnion anóxico (Vicente y Miracle, 1988; Rodrigo, 2001). Este monimolimnion resulta especialmente importante por acumular diferentes compuestos químicos, principalmente nutrientes inorgánicos, además de actuar como reservorio de diferentes microorganismos anaerobios, que pueden colonizar el hipolimnion durante el período de estratificación.

En el caso concreto de un sistema como la Laguna de La Cruz, el tamaño y morfología de la cubeta resulta de gran relevancia, tanto en el proceso de formación, como en la intensidad del gradiente térmico estacional, así como en el marcado gradiente químico (quimioclina) permanente que aísla el monimolimnion de la laguna. Se delimita un perfil de densidad con un patrón bien definido que permite estudiar con detalle la relación entre el desarrollo y dinámica de los organismos de la columna de agua con respecto a la estabilidad térmica de la laguna, bien respecto a sus valores integrados (índice de estabilidad, estabilidad de Schmidt) en toda la laguna como a la distribución en

el perfil vertical de la estabilidad física, medida como frecuencia de Brunt-Väisälä, que estima la intensidad del gradiente de densidad (Boehrer y Schultze, 2009). La descripción e interpretación precisa de estos conceptos físicos permitirá, estudiar la relevancia de la estructura física de laguna en relación a las interacciones con otros organismos.

En este capítulo se describe el marco físico y químico en el que se desarrollan los microorganismos acuáticos y, más concretamente, el picoplancton autótrofo de la Laguna de La Cruz, el cual es el objeto central de estudio en esta tesis. Se presentan las características físicas y químicas más relevantes que pueden afectar al desarrollo y dinámica de las poblaciones de picoplancton autótrofo, para poder evaluar su relevancia respecto a las interacciones bióticas con el resto de microorganismos presentes en la laguna.

3.2. Resultados

Principales factores meteorológicos

Irradiancia total incidente

La energía incidente del sol es la principal fuente de energía de los ecosistemas acuáticos; depende, principalmente, de la localización geográfica (longitud y latitud) del sistema estudiado; aunque presenta ciclos anuales, más o menos estables, el promedio anual se mantiene relativamente constante, independientemente de factores climáticos y meteorológicos locales. Por otro lado, las horas de insolación tampoco tienen variaciones interanuales muy importantes.

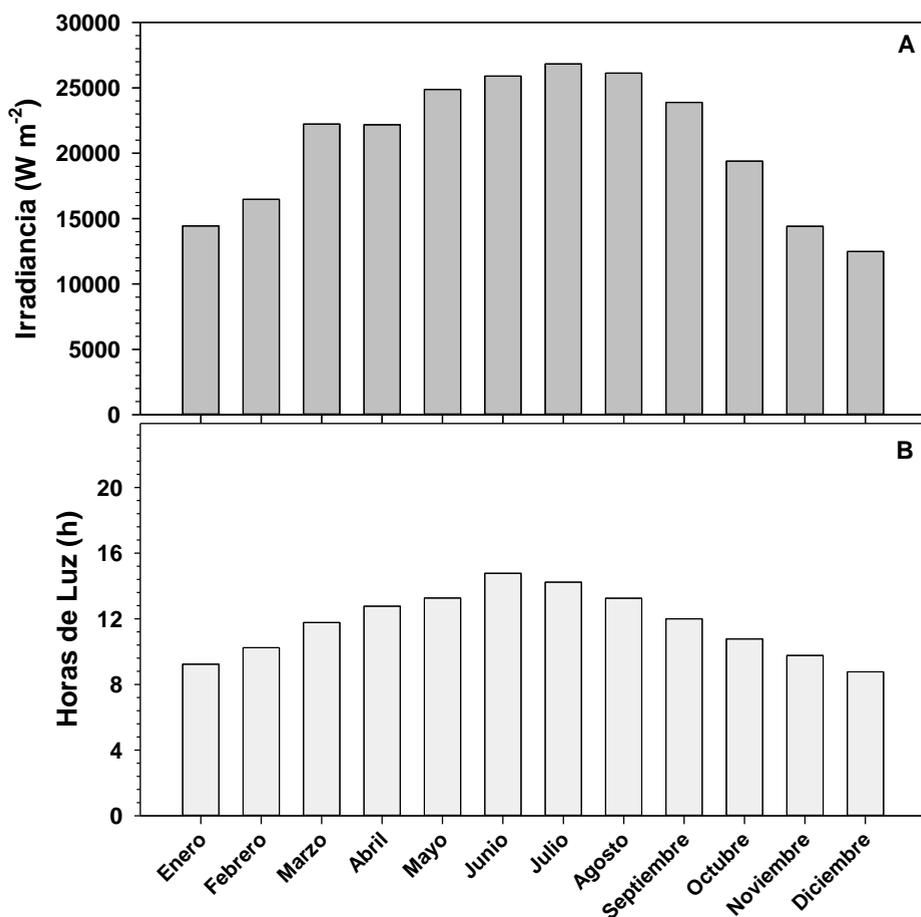


Figura 3.1. (A) Irradiancia total mensual promedio que incide en la superficie de la laguna y (B) Horas de luz diarias promedio para cada mes en las coordenadas donde se sitúa la Laguna de La Cruz. Fuente: (PVGIS, <http://re.jrc.ec.europa.eu/pvgis/>).

Los valores de irradiancia mensual total acumulada, en las coordenadas donde se sitúa la Laguna de La Cruz (figura 3.1A), muestran durante el período invernal, un valor promedio de 15.000 W m^{-2} , con un incremento paulatino de la irradiancia, que coincide con el aumento de las horas de insolación (figura 3.1B), hasta llegar a un valor máximo de irradiancia de 26.830 W m^{-2} en el mes de julio, momento a partir del cual comienza a descender la irradiancia mensual

promedio, mucho más acusadamente entre octubre y noviembre. Los valores mínimos de irradiancia en la Laguna de La Cruz se dan en diciembre, coincidiendo con el mínimo de horas de luz.

Temperatura atmosférica

La temperatura atmosférica, con respecto a la temperatura del agua, determina la transferencia de calor en un sentido u otro. A diferencia de la irradiancia, la temperatura atmosférica depende de factores climáticos y meteorológicos locales, pudiendo presentar variaciones interanuales que influyen en el régimen térmico de estos ecosistemas.

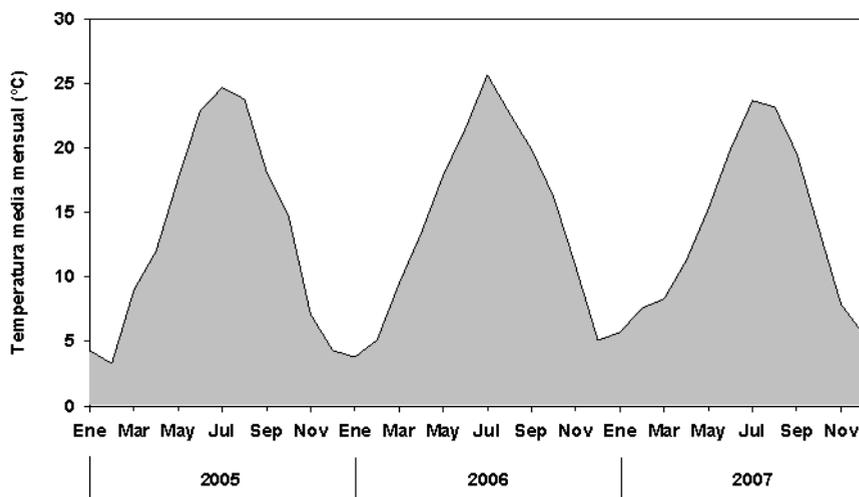


Figura 3.2. Evolución de la temperatura media mensual (°C), medida en la estación meteorológica de la AEMET 8096 de Cuenca, durante el período 2005-2007.

La variación mensual de temperatura atmosférica media, para el período 2005-2007 (figura 3.2), muestra patrones interanuales muy similares, aunque es destacable que el ciclo limnológico de 2006 muestra una primavera y un invierno más cálidos que el resto de años estudiados.

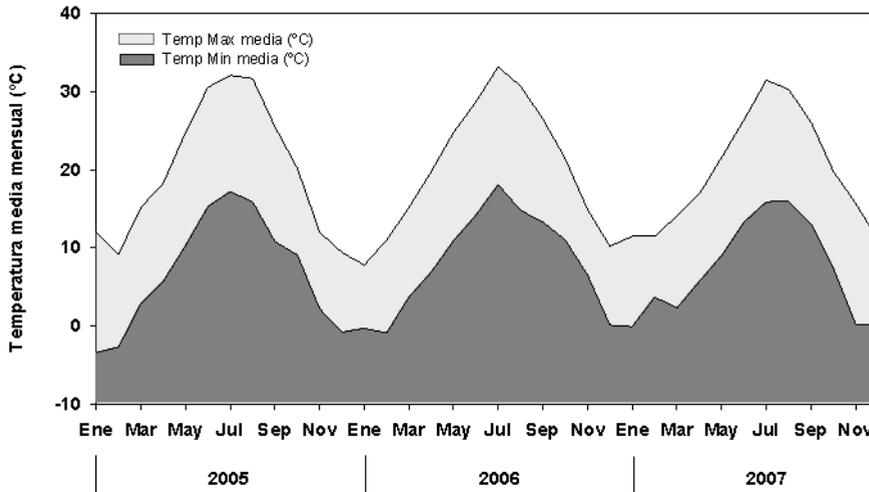


Figura 3.3. Evolución de la temperatura máxima y mínima media mensual (°C), medida en la estación meteorológica de la AEMET 8096 de Cuenca, durante el período 2005-2007.

La temperatura media mensual máxima y mínima (figura 3.3) no muestra variaciones interanuales muy importantes, aunque cabe señalar que la temperatura media más elevada en primavera e invierno de 2006 se produce, principalmente, por la subida de las temperaturas mínimas.

Precipitación

La intensidad y distribución de las precipitaciones tiene efectos muy importantes en los ecosistemas acuáticos, afectando tanto a la formación de la termoclina como a su desestabilización otoñal, y en períodos de tiempo más largos puede afectar al nivel de agua en la laguna.

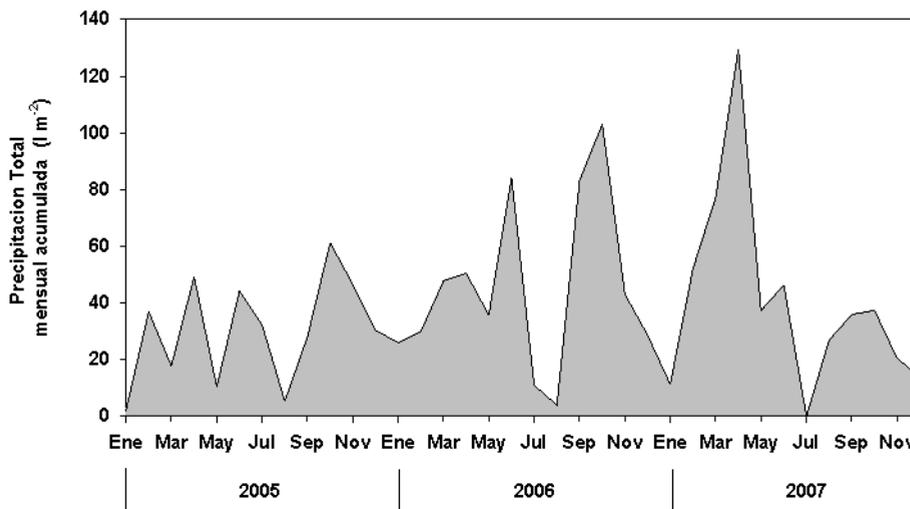


Figura 3.4. Evolución de la precipitación mensual acumulada ($l\ m^{-2}$), medida en la estación meteorológica de la AEMET 8096 de Cuenca, durante el período 2005-2007.

En general, la precipitación mensual acumulada (figura 3.4) muestra un patrón con valores mínimos de precipitación estival entre los meses de julio y agosto, y valores máximos, que pueden ser puntualmente altos, en primavera y otoño. En los períodos invernales observamos que 2005 y 2007 son más secos que el período invernal de 2006, más lluvioso y con precipitaciones superiores a 20 l

Viento

La velocidad del viento es uno de los factores climáticos más relevantes en la dinámica limnológica de un lago, principalmente en los procesos de estratificación y mezcla, siendo una importante entrada de energía en el sistema. El viento es, principalmente, responsable de mantener la mezcla epilimnética y la profundidad máxima del epilimnion en la laguna. Junto con las

Capítulo 3

precipitaciones, el viento, es responsable de la mezcla vertical parcial o completa a finales de otoño.

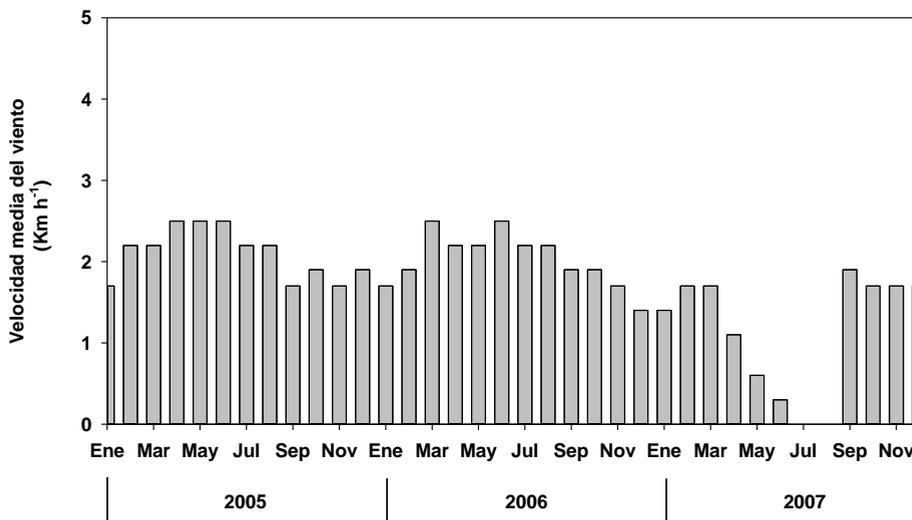


Figura 3.5. Evolución temporal de la velocidad media del viento, medidas en la estación meteorológica de la AEMET 8096 de Cuenca, durante el período 2005-2007. Sin datos para julio y agosto de 2007.

En la situación geográfica donde se encuentra la Laguna de La Cruz, los valores medios de velocidad del viento (figura 3.5) son relativamente bajos. El valor promedio entre 2005 y 2007 fue de $1,8 \text{ km h}^{-1}$, con valores medios máximos de $2,5 \text{ km h}^{-1}$. Se observa además, un patrón anual, con velocidades medias del viento más bajas en invierno que aumentan en primavera, momento en que se alcanzan los valores máximos, y descendiendo, de nuevo, a partir de agosto hasta los mínimos invernales.

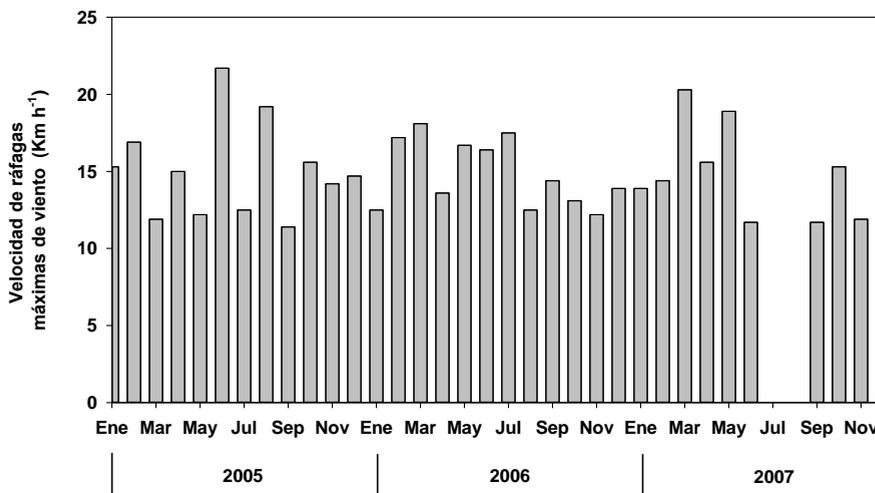


Figura 3.6. Evolución temporal de la velocidad de las ráfagas máximas de viento, medidas en la estación meteorológica de la AEMET 8096 de Cuenca, durante el período 2005-2007. Sin datos para julio y agosto de 2007.

Los valores de velocidad de ráfagas máximas de viento (figura 3.6) son más aleatorios que los valores promedio de velocidad del viento, aunque se observa una pauta con los valores máximos en primavera, entre febrero y mayo, coincidiendo con el establecimiento de la termoclina.

Caracterización geofísica de la Laguna de La Cruz

En este apartado se describe la batimetría y los perfiles hipsográficos de la Laguna de La Cruz; ésta, por su origen como una dolina de hundimiento, es una laguna relativamente pequeña en relación a su profundidad media.

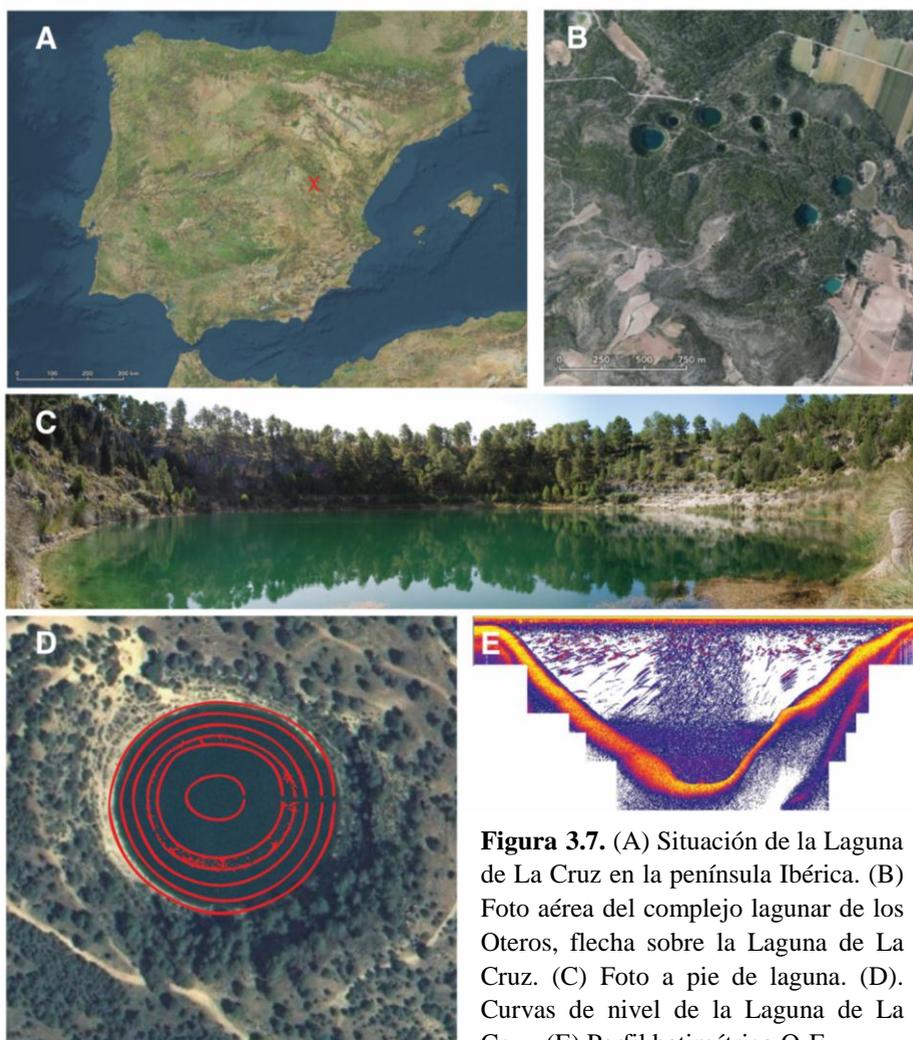


Figura 3.7. (A) Situación de la Laguna de La Cruz en la península Ibérica. (B) Foto aérea del complejo lagunar de los Oteros, flecha sobre la Laguna de La Cruz. (C) Foto a pie de laguna. (D). Curvas de nivel de la Laguna de La Cruz. (E) Perfil batimétrico O-E.

Teniendo en cuenta los datos batimétricos obtenidos (figura 3.7), podemos analizar la evolución histórica del volumen de agua en la Laguna de La Cruz, en

los diferentes períodos en los que ésta fue más detalladamente estudiada, en función de las profundidades máximas de esos períodos (figura 3.8).

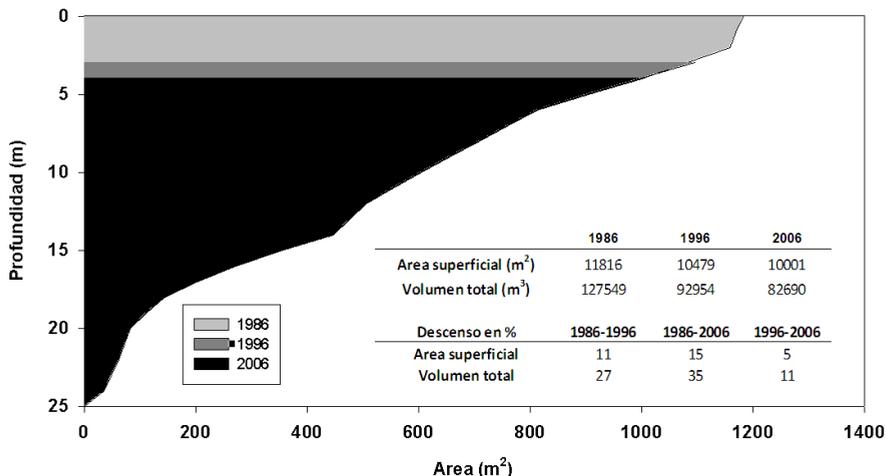


Figura 3.8. Curvas hipsográficas, profundidad-área, en la Laguna de La Cruz, durante diferentes períodos de estudio. En la tabla se detalla el área superficial y volumen total en cada período y el descenso en el porcentaje de área y volumen, para los diferentes intervalos entre períodos diferentes.

La Laguna de La Cruz muestra una marcada pendiente debido a su forma cónica (figura 3.8). Esta característica hace que la caracterización de la cubeta sea de gran relevancia, y así poder determinar, con la mayor precisión posible, el área y volumen de cada sección de la laguna que se pretenda estudiar. Se ha observado un descenso paulatino del nivel de la laguna desde los años 80. Debido al tamaño y morfología de la cubeta, este descenso no afecta igual al área superficial y al volumen del lago; por ejemplo, el descenso del nivel del agua entre 1986 y 2006 produjo un descenso del área superficial del 15 % y un descenso del volumen acumulado del 35%.

Capítulo 3

Balance térmico

Entendemos el balance térmico como la diferencia que existe entre la energía calorífica acumulada en la laguna, en su máximo del ciclo limnológico, con respecto al valor mínimo de esa energía. El balance térmico del lago depende, principalmente, de la radiación solar que incide en la laguna a lo largo del año, aunque su dinámica depende de diversas condiciones externas, como la fluctuación anual de temperatura atmosférica anual, el viento o las temperaturas, y es menor este balance si, como pasa en la Laguna de La Cruz, tiende a conservarse el gradiente térmico con variaciones mínimas en la temperatura del fondo de la laguna (Margalef, 1983).

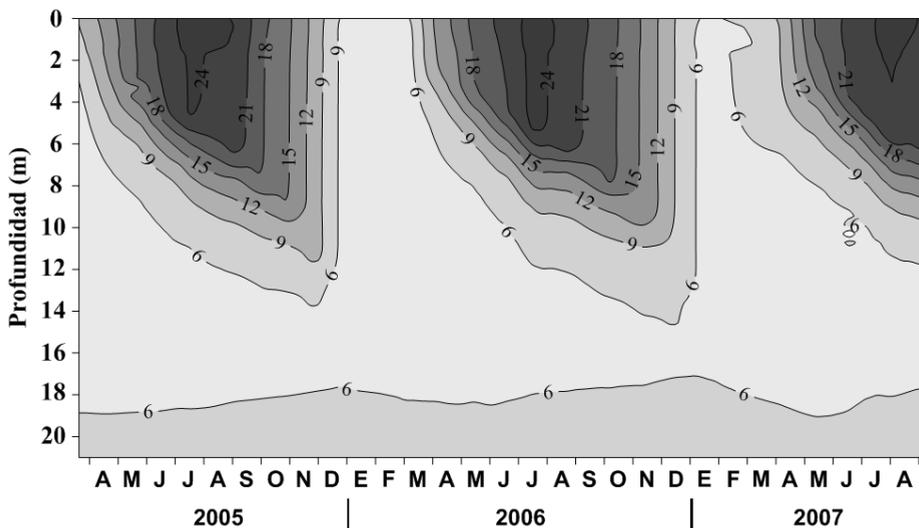


Figura 3.9. Evolución temporal de la temperatura del agua (°C) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2007.

La evolución del perfil vertical de temperatura, en la Laguna de La Cruz, muestra un lógico patrón anual de la termoclina estival, con máximos de temperatura superficial de la laguna entre julio y agosto (figura 3.9). El mixolimnion en el período de mezcla y el hipolimnion durante todo el proceso de estratificación se presentan una temperatura estable en torno a los 4-5 °C,

mientras que el monimolimnion presenta un gradiente invertido de temperatura, hasta un máximo, en el fondo de la laguna, en torno a los 6,5 °C.

Estratificación y mezcla en la Laguna de La Cruz

La Laguna de La Cruz, por su carácter meromóctico, presenta una estratificación permanente con la picnoclina, en torno a los 16m de profundidad. Junto a este gradiente se desarrolla estacionalmente un gradiente de densidad, principalmente térmico, que marca la dinámica de estratificación de la laguna. El propósito de esta sección es establecer la intensidad de estos gradientes en cada fecha de muestreo, para poder determinar su dinámica y el balance global de la estratificación.

Formación y evolución del gradiente de densidad y estabilidad

El gradiente de densidad y, por lo tanto, de estabilidad en la Laguna de La Cruz es función, principalmente, de la temperatura y de la salinidad (conductividad) de la laguna.

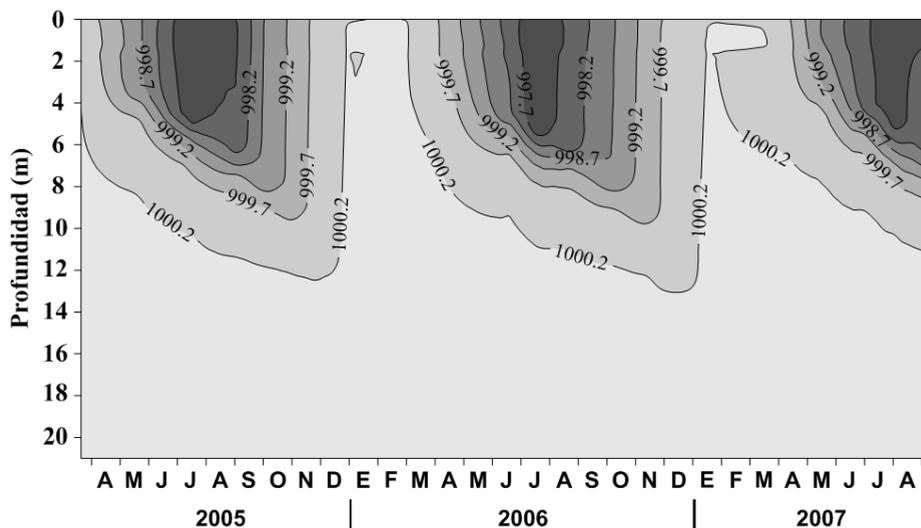


Figura 3.10. Evolución temporal de la densidad del agua (Kg m^{-3}) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, a lo largo del período 2005-2007.

Capítulo 3

La evolución temporal del perfil de densidad (figura 3.10) viene marcado, principalmente, por la evolución de la temperatura y, en menor medida, por el gradiente de conductividad de la quimioclina.

Estabilidad de la columna de agua

Se ha estimado la estabilidad integrada de la columna de agua en base a dos índices, el índice de estabilidad y la estabilidad de Schmidt.

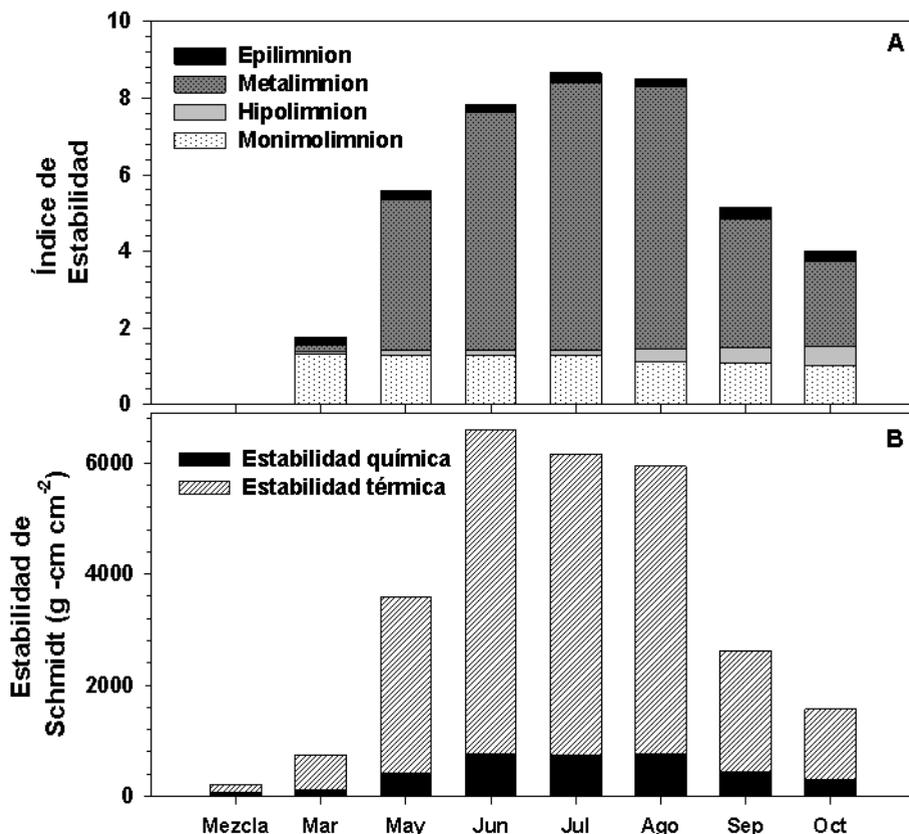


Figura 3.11. (A) Evolución mensual del índice de estabilidad y (B) la estabilidad de Schmidt para el año 2006 en la Laguna de La Cruz.

Capítulo 3

El índice de estabilidad se define como la desviación estándar del perfil de densidad, y proporciona una buena primera aproximación al estudio de la estabilidad global de la columna de agua. La estabilidad de Schmidt se define como la energía necesaria para la completa mezcla de la columna de agua. El índice de estabilidad (figura 3.11A) se mantiene constante a lo largo del ciclo limnológico, en el monimolimnion y en el epilimnion, al no presentar cambios importantes en el gradiente de densidad a lo largo del tiempo; el hipolimnion sufre un pequeño aumento paulatino a medida que avanza la estratificación y los mayores cambios se producen en el metalimnion, con valores máximos entre julio y agosto. La estabilidad de Schmidt (figura 3.11B) muestra un aumento, tanto de la estabilidad térmica como de la estabilidad química, a medida que avanza la estratificación, con valores máximos en junio.

Frecuencia de Brun Väissälä

La frecuencia de Brunt Väissälä se define como la frecuencia máxima (s^{-1}) con la que se puede propagar, en el perfil vertical de un sistema acuático, una onda interna con respecto a la estratificación, por lo tanto, es una estimación de la energía que se requiere para el intercambio de agua entre diferentes capas del perfil vertical de la laguna (Boehrer y Schultze, 2009). Respecto a la distribución vertical de la frecuencia de Brunt Väissälä (figura 3.12) en la Laguna de La Cruz, se observa un máximo estable de frecuencia, en torno a los 18 metros de profundidad, que se corresponde con el gradiente químico que delimita el monimolimnion y con el gradiente térmico inverso que se observa desde la quimioclina hasta el fondo de la laguna (figura 3.9).

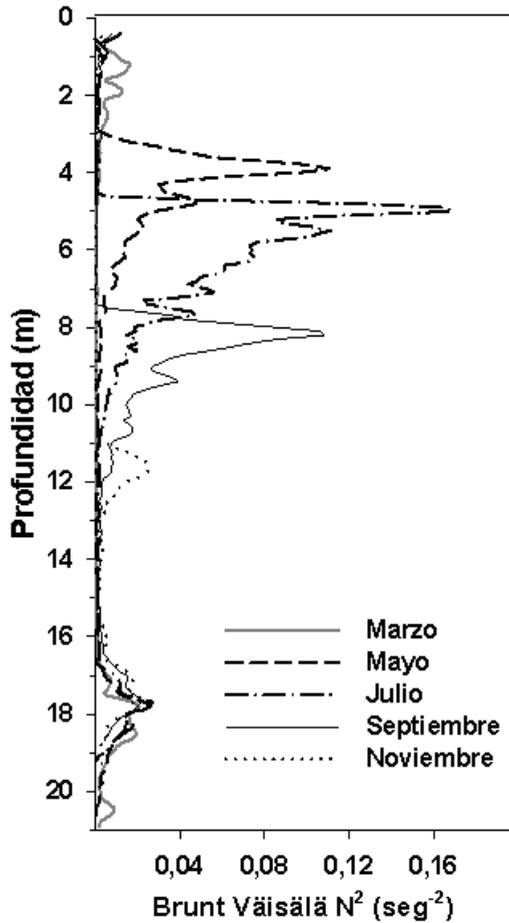


Figura 3.12. Perfil vertical de las variaciones en los números de Brunt Väisälä en diferentes momentos del ciclo limnológico 2006 en la Laguna de La Cruz.

Los máximos de frecuencia más importantes se forman como consecuencia del gradiente de densidad de la termoclina, aumentando a medida que avanza la estratificación y con el valor máximo en julio, a partir de este momento los máximos de frecuencia descienden hasta que se produce la mezcla invernal.

Extinción de la luz en la columna de agua

A lo largo del período de estudio, tanto la extinción de la luz incidente como la distribución de las diferentes longitudes de onda, a diferentes profundidades en la columna de agua de la Laguna de La Cruz, se han medido con el uso de espectroradiómetro.

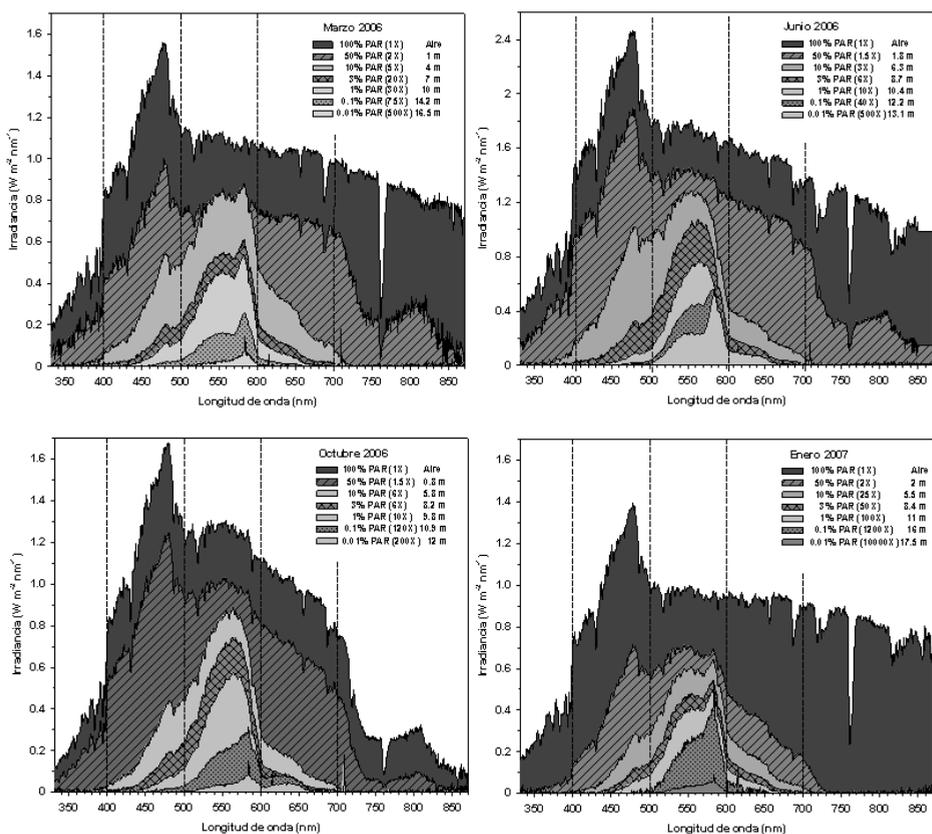


Figura 3.13. Perfiles estacionales de irradiancia en relación a la longitud de onda, para diferentes momentos del ciclo limnológico, medidos con espectroradiómetro a diferentes profundidades (m), que coinciden con valores de extinción de la luz del 100, 50, 10, 3, 1, 0,1 y 0,01 % de extinción del PAR ("Photosynthetically Active Radiation" entre 400-700 nm). Entre paréntesis se detalla el factor de escala aplicado a cada curva respecto al valor de superficie del 100% de PAR.

Capítulo 3

Los perfiles espectrales de irradiancia (figura 3.13) muestran la atenuación selectiva de diferentes longitudes de onda, a medida que penetran en el lago, con una predominancia, en profundidad, de longitudes de onda de color verde entre 500 y 600 nm. La atenuación de la cantidad de luz a lo largo del perfil vertical de una laguna es un factor muy importante, sin embargo, para comprender el desarrollo, dinámica y ensamblado de las poblaciones de organismos fotosintéticos es muy útil conocer la calidad espectral en cada profundidad. Las medidas espectralradiométricas nos permiten obtener esa información, en un rango de 320 a 840 nm, con una resolución en el perfil vertical de centímetros.

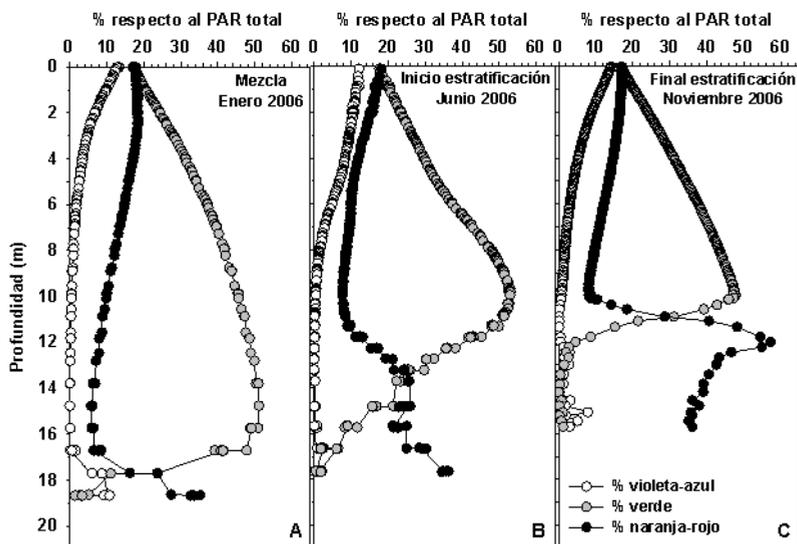


Figura 3.14. Atenuación de la luz en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz en diferentes rangos del espectro visible. (A) Durante el período de mezcla, en enero de 2006. (B) En la estratificación temprana, en junio de 2006. (C) En la fase final de la estratificación, en noviembre de 2006.

La atenuación de la irradiancia respecto al PAR (400-700nm) total de diferentes rangos del espectro, en diferentes momentos del ciclo limnológico (figura 3.14),

muestra que en el rango del violeta-azul no hay importantes diferencias en el patrón de atenuación. La radiación incidente es absorbida en los primeros 6-8 metros de profundidad, observándose en el rango del verde un importante incremento relativo respecto al PAR total; este incremento disminuye rápidamente a partir de la oxiclina. A medida que desciende la importancia relativa de la luz de longitud de onda verde aumenta la del rango naranja-rojo, principalmente en el hipolimnion superior.

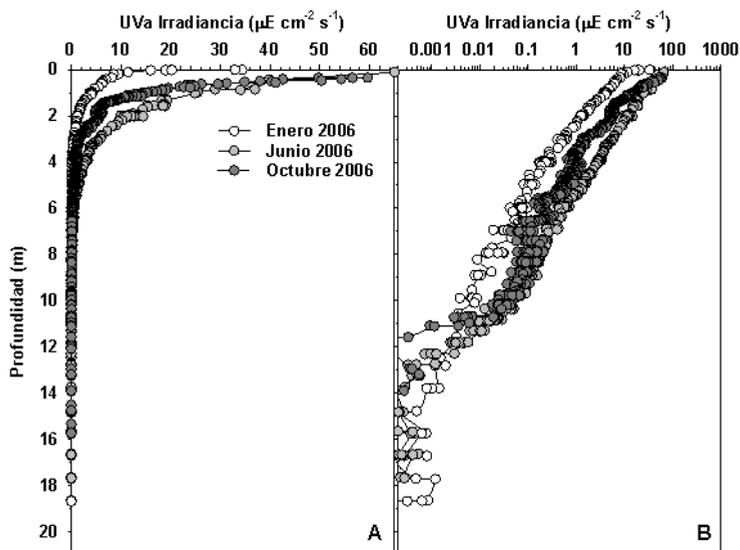


Figura 3.15. Atenuación de la radiación UVa (320-400nm) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, en diferentes momentos del ciclo limnológico. (A) En escala lineal. (B) En escala logarítmica.

La penetración de luz ultravioleta, en sistemas acuáticos, es un importante factor para comprender aspectos como la fotoinhibición en el epilimnion. En la Laguna de La Cruz se observa (figura 3.15) cómo la mayor parte de la radiación UVa que incide en la superficie de la laguna es absorbida en los primeros 4-5 metros de profundidad. Sin embargo, es interesante señalar que la penetración de la luz ultravioleta (Uva) se observa incluso a profundidades de 12-13 metros, aunque en intensidades muy bajas.

Caracterización química de la columna de agua

Conductividad

En limnología se entiende como conductividad eléctrica del agua específica (mS cm^{-1}) para estimar la salinidad del agua, entendiendo la conductividad como la inversa de la resistencia de una solución al flujo eléctrico, medida entre dos electrodos de 1cm^2 de área, una separación de 1cm y normalizado a una temperatura de referencia de 25°C .

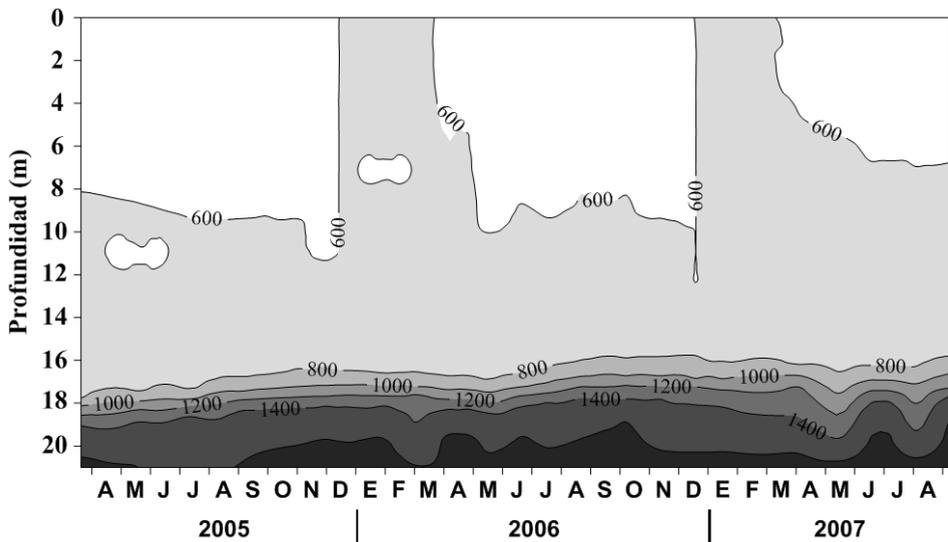


Figura 3.16. Evolución temporal de la conductividad eléctrica del agua ($\mu\text{S cm}^{-1}$) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2007.

La evolución de la conductividad en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz (figura 3.16) muestra el gradiente de la picnoclina a partir de los 16 metros de profundidad. Se observa, además, un marcado patrón de descenso de conductividad, a medida que avanza el proceso de estratificación en el epilimnion y metalimnion superior, a partir del mixolimnion invernal homogéneo.

Nutrientes inorgánicos

Se consideran nutrientes principales aquellos compuestos con elementos que son esenciales en los componentes celulares de los organismos que viven en sistemas acuáticos. Estos compuestos son, principalmente, de nitrógeno y de fósforo y, en menor medida, dependiendo del sistema que se estudie, compuestos de azufre, silicato o hierro, aunque su requerimiento sea inferior a los anteriores. En comparación con otros componentes iónicos, las concentraciones de los nutrientes pueden ser muy dinámicas, debido a que son fácilmente captadas, acumuladas y transformadas por los organismos acuáticos.

Nitrógeno

El nitrógeno se puede encontrar, bien en forma oxidada (nitrato y nitrito), o bien en forma reducida (amonio y compuestos orgánicos).

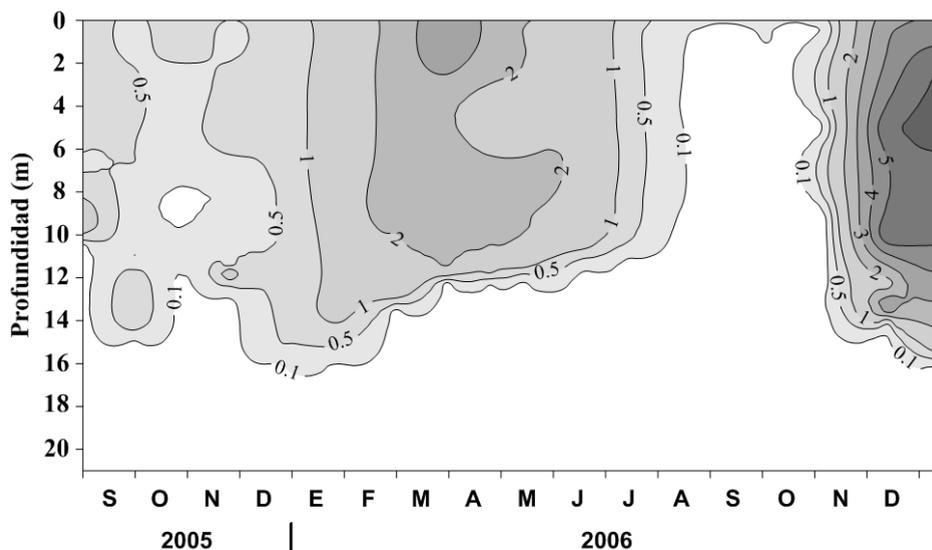


Figura 3.17. Evolución temporal de la concentración (μM) de las formas oxidadas del nitrógeno (nitrito y nitrato, NO_x) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2006.

Capítulo 3

La evolución temporal de las formas oxidadas de nitrógeno inorgánico (nitrato y nitrito, NO_x) en la Laguna de La Cruz (figura 3.17) muestra máximos invernales y primaverales, con un agotamiento en toda la columna de agua en la fase final del período de estratificación.

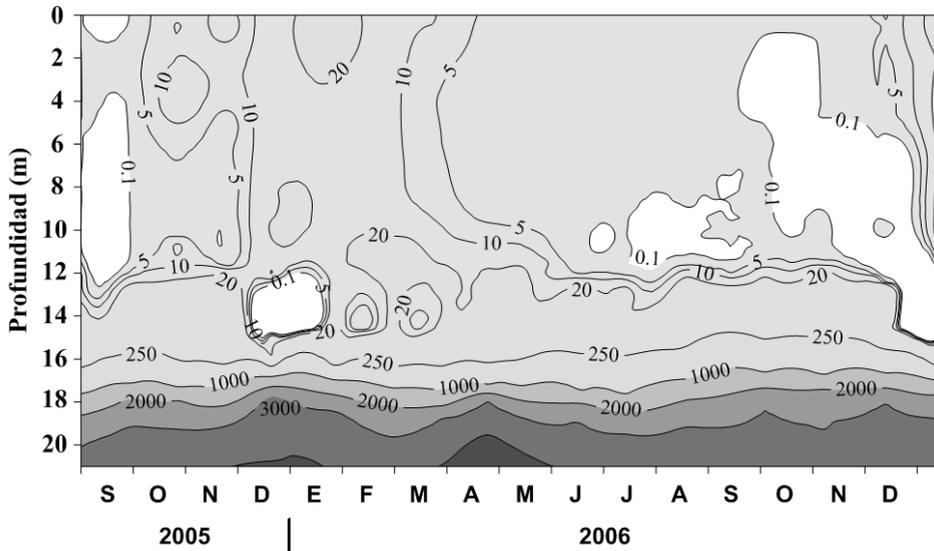


Figura 3.18. Evolución temporal de la concentración de amonio (μM) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2006.

La evolución temporal de la concentración de amonio en la Laguna de La Cruz (figura 3.18) muestra máximos invernales, con un agotamiento en toda la columna de agua desde el inicio de la estratificación. Por otro lado, se observa un aumento de la concentración de amonio importante en el hipolimnion a medida que avanza la estratificación.

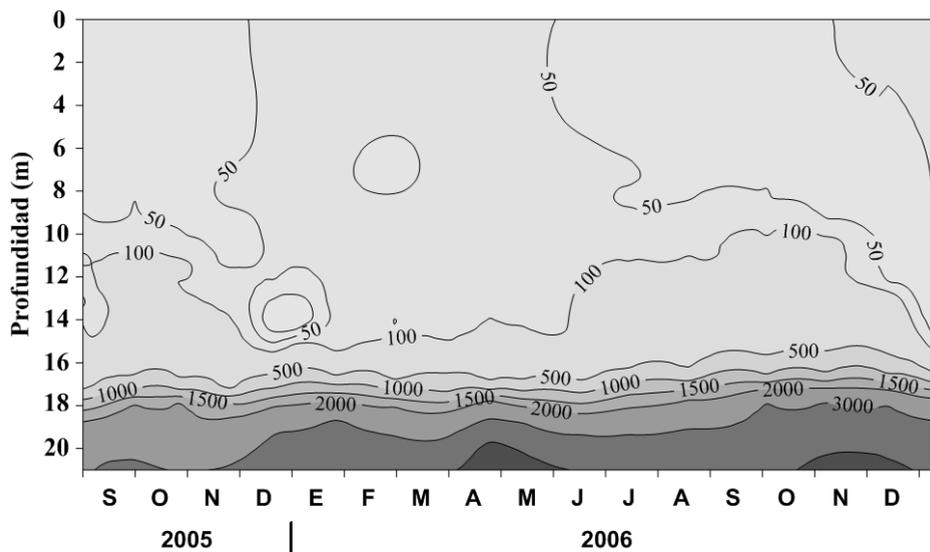


Figura 3.19. Evolución temporal de la concentración de nitrógeno total (μM) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2006.

El nitrógeno total representa la suma de las fracciones solubles (nitrato, nitrito y amonio) y de la fracción particulada, bien en forma de biomasa de los organismos o como compuestos de almacenamiento. La evolución de la concentración de nitrógeno total en la Laguna de La Cruz muestra que éste se localiza, principalmente, en el momimolimnion (figura 3.19) debido a los altos valores de concentración de amonio. Se observa (figura 3.19) un aumento hipolimnético y metalimnético relacionado con la evolución del proceso de estratificación térmica.

Fósforo

El fósforo soluble (SRP) presenta concentraciones relativamente altas en el monimolimnion (figura 3.20), con un gradiente, desde el límite de detección hasta los valores máximos en el fondo de la laguna, de en torno a $10 \mu\text{M}$.

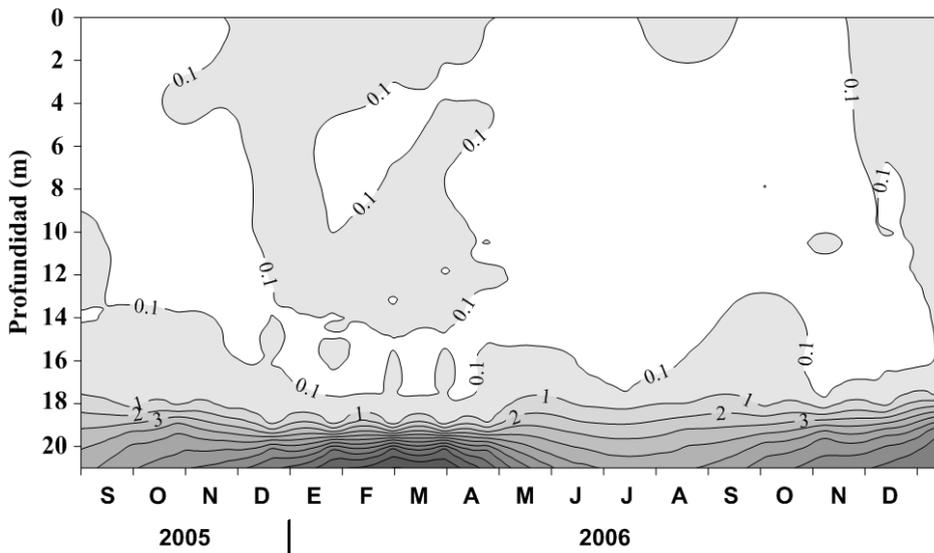


Figura 3.20. Evolución temporal de la concentración de fósforo reactivo soluble (μM) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2006.

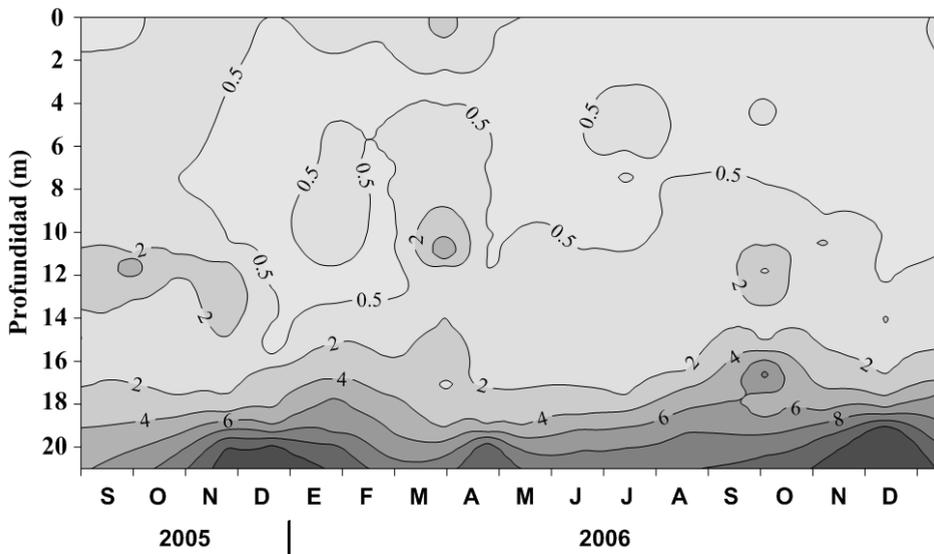


Figura 3.21. Evolución temporal de la concentración de fósforo total (μM) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2006.

Capítulo 3

El resto del perfil vertical de la laguna presenta concentraciones relativamente bajas, respecto al monimolimnion, de este nutriente. El proceso de mezcla invernal produce un incremento de la concentración de SRP en toda la columna de agua entre diciembre y marzo, observando además, en este período, un máximo de concentración de fósforo superficial entre superficie y 2 metros de profundidad. A medida que avanza la estratificación térmica estival se produce un agotamiento muy marcado de SRP en toda la columna de agua, excepto en el monimolimnion, quedando su concentración en el límite de detección del método del molibdeno ($0,03 \mu\text{M}$).

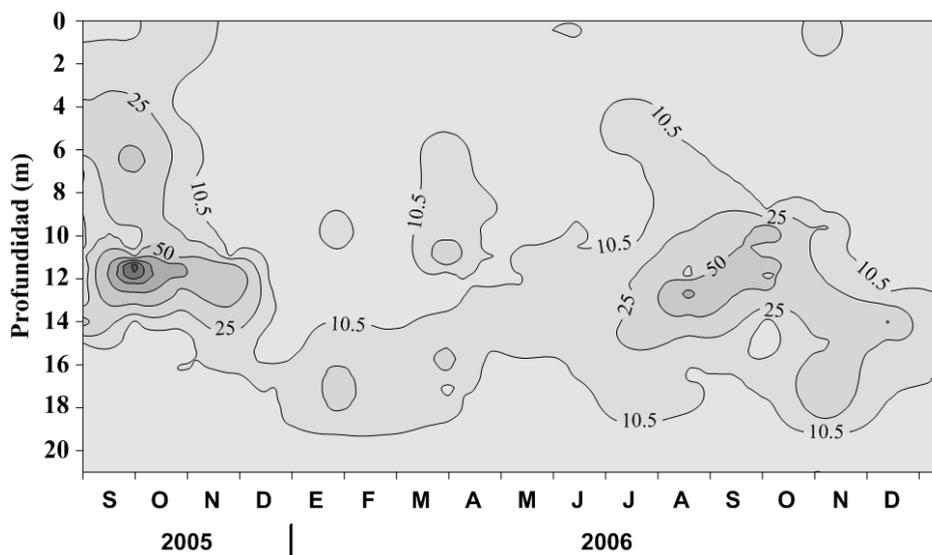


Figura 3.22. Evolución temporal ratio molar PT:SRP en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2006.

La concentración de fósforo total, a lo largo del período estudiado, presenta en el monimolimnion valores relativamente altos (figura 3.21), hasta $20 \mu\text{M}$ (3 veces mayores que los de SRP). En el resto de la columna de agua se observa un marcado descenso de concentración en el epilimnion, a medida que avanza la estratificación. Entre los meses de septiembre y noviembre se observaron

Capítulo 3

máximos profundos de fósforo total entre 10-12 metros de profundidad, coincidiendo con la oxiclina, y en torno al 1-0,1 % de luz incidente.

En la laguna, los valores de concentración de fósforo total son relativamente altos, en relación con los valores de SRP. En la figura 3.22 se observa la relación PT:SRP que muestra los máximos de fósforo total en relación al SRP presente y, por lo tanto, donde más fósforo se encuentra acumulado, principalmente en forma de fósforo particulado, bien orgánico como biomasa o en alguna forma de almacenamiento como pirofosfato. Se observa que los valores máximos de este ratio se localizan, principalmente, en el hipolimnion y el metalimnion de los períodos de estratificación.

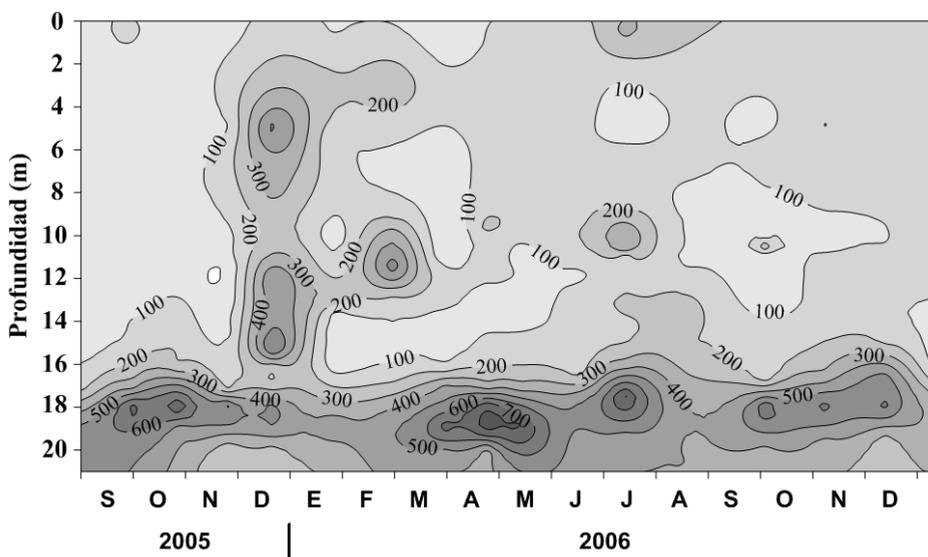


Figura 3.23. Evolución temporal ratio molar (NT:PT) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2006.

Los valores más altos de la relación NT:PT se encuentran en el monimolimnion de la laguna. Respecto al perfil vertical, se observa un incremento importante en el mixolimnion durante el período de mezcla invernal, así como en

Capítulo 3

determinados momentos asociado a los máximos profundos de clorofila de primavera y otoño.

Silicato

El silicato es uno de los nutrientes más importantes en el desarrollo de plancton con caparazón silíceo, principalmente diatomeas, siendo un nutriente limitante para el desarrollo de este grupo fitoplanctónico en muchos ecosistemas acuáticos.

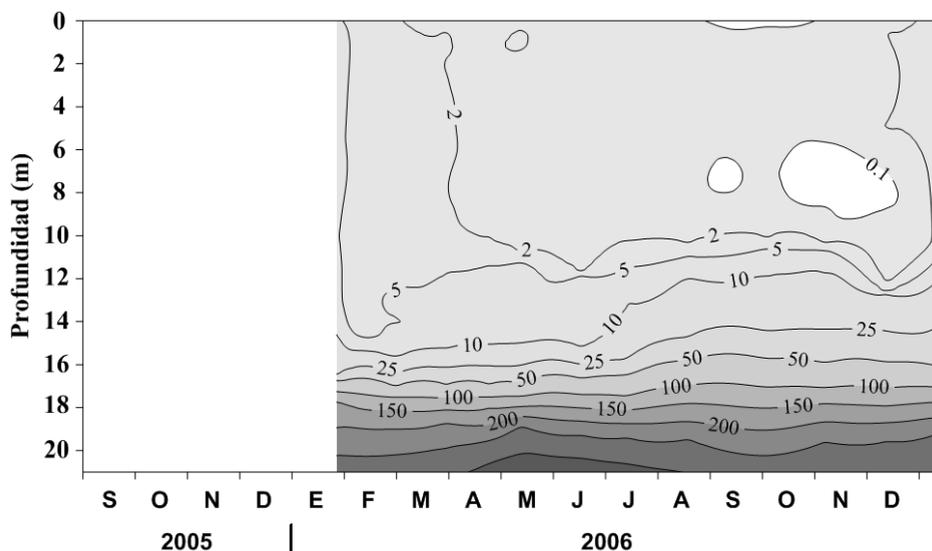


Figura 3.24. Evolución temporal de la concentración de silicato (μM) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2006.

El silicato soluble en la Laguna de La Cruz se localiza, principalmente, en el monimolimnion (figura 3.24), con concentraciones que pueden superar los 300 μM . Se observa el agotamiento de este nutriente a medida que avanza la estratificación, principalmente en el epilimnion, hasta concentraciones inferiores a 1 μM , produciéndose la fertilización de la columna de agua con este nutriente, con la mezcla invernal, hasta valores promedio de 7 μM .

Capítulo 3

Oxígeno disuelto

La medida de oxígeno disuelto en el agua ha sido una de las variables fisicoquímicas más utilizadas en los estudios de sistemas acuáticos. Tanto la concentración puntual en el perfil vertical, como la evolución de este perfil a lo largo del ciclo limnológico, proporcionan valiosa información de los organismos y de las reacciones geoquímicas que se desarrollan en la laguna.

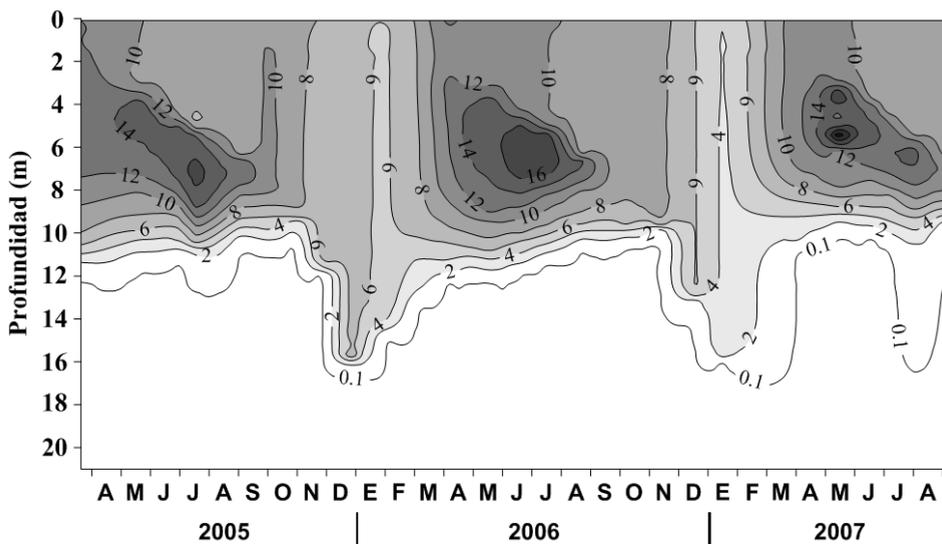


Figura 3.25. Evolución temporal de la concentración de oxígeno disuelto (mg l^{-1}) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, durante el período 2005-2007, medido con la sonda multiparamétrica CTD SBE 19.

La distribución del oxígeno disuelto, en la columna de agua de la Laguna de La Cruz (figura 3.25), muestra que el monimolimnion se mantiene anóxico a lo largo de todo el ciclo estudiado, al igual que el hipolimnion durante el período de estratificación térmica. Se producen máximos metalimnéticos de oxígeno que pueden llegar a los 16 mg l^{-1} , estos máximos aumentan a medida que evoluciona la estratificación, concentrándose en la termoclina. Por otro lado, se observaron

mínimos de oxígeno invernales en todo el mixolimnion, con un valor promedio de 5 mg l⁻¹.

Turbidez

La turbidez en sistemas acuáticos está causada por materia en suspensión, tanto de origen orgánico, principalmente plancton y sus restos, como de origen inorgánico, como limo, arcilla o partículas de carbonato. La complejidad de los elementos que contribuyen a la turbidez hace que no sea fácil asociar esta variable con la concentración de determinadas sustancias o del plancton, aunque puede ser útil para localizar poblaciones microestratificadas en sistemas acuáticos.



Figura 3.26. Evolución temporal de la turbidez (FTU) en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, a lo largo del período 2005-2007.

La evolución de la turbidez, a lo largo del período de estudio (figura 3.26), muestra un aumento de la transparencia en el epilimnion y metalimnion a medida que avanza la estratificación. Se observa la formación de máximos profundos de turbidez en el hipolimnion superior a medida que se desarrolla la

Capítulo 3

estratificación térmica estival, y cómo estos máximos profundos se localizan en el monimolimnion con la mezcla invernal.

CDOM (“Colored dissolved organic matter”)

La distribución de la materia orgánica disuelta (cDOM), en el perfil vertical de sistemas acuáticos, puede dar importante información sobre la distribución de procesos como la producción primaria.

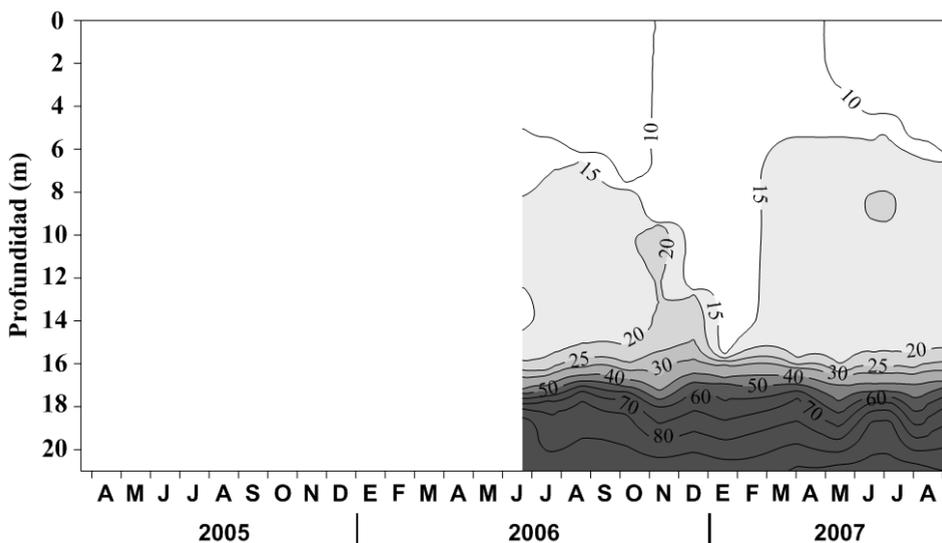


Figura 3.27. Evolución temporal del carbono orgánico disuelto (cDOM) en el perfil vertical de la Laguna de la Cruz, a lo largo del período 2006-2007. Sensor instalado en junio de 2006.

La evolución temporal de la concentración de cDOM, en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz (figura 3.27), muestra que éste se acumula, principalmente en el monimolimnion, aunque se observan máximos profundos que evolucionan, a lo largo de la estratificación, en el metalimnion inferior, justo sobre la oxiclina.

3.3. Discusión

La relevancia de las características fisicoquímicas en el desarrollo, diversidad morfológica y dinámica, espacial y temporal, de las poblaciones de picoplancton autotrófico en sistemas acuáticos, ha sido descrita por diversos autores, tanto en ecosistemas marinos como de agua dulce (p. ej. Camacho et al., 2003; Bouman et al., 2011; Callieri et al., 2012). En general, se resalta la importancia de factores climáticos, la morfología de la cubeta, la atenuación de la luz y la limitación de nutrientes. Un punto especialmente relevante son los patrones de estratificación y estabilidad de la columna de agua como factor importante en el desarrollo, diversidad, dominancia y dinámica del picoplancton, y especialmente de las picocianobacterias (Pcy) presentes en estos ecosistemas. (Reynolds et al., 1987; Cushing, 1989; Camacho et al., 2003; Wagner y Adrian; 2009; Callieri, 2007). Los procesos de estratificación y mezcla en ecosistemas acuáticos son particularmente complejos, y en ellos intervienen prácticamente todos los procesos físicos y variables químicas del ecosistema en estudio, tanto factores climáticos como factores de morfología y tamaño de la cubeta, entradas y salidas de agua, distribución de la luz y organismos en el perfil vertical, composición química del agua, etc... (Imboden y Wuëst, 1995; Imberger, 1998; Ivey et al., 2008; Bohrer and Schultze, 2008, 2009).

La Laguna de La Cruz es un sistema cerrado, meromítico, muy protegido de la acción del viento y con cambios térmicos, entre verano e invierno, muy marcados (Vicente y Miracle, 1988). Todo esto hace que sea un sistema modelo de estudio muy favorable para establecer la relevancia e influencia relativa de factores fisicoquímicos frente a interacciones bióticas, en el desarrollo y dinámica del picoplancton autótrofo. Partimos de la hipótesis inicial que supone que la presencia y diversidad de las Pcy y, de manera más general, de los organismos presentes en sistemas acuáticos, dependen principalmente de

Capítulo 3

factores ambientales, fisicoquímicos y de la morfología de la cubeta, mientras que la abundancia relativa y dinámica espacio-temporal depende en mayor medida de interacciones bióticas, más o menos reguladas por factores ambientales, principalmente, la presencia de luz, de nutrientes y el régimen térmico (Harris, 1980; Houlihan, 2007).

En este capítulo se han detallado aquellos factores físicos y químicos que se han considerado más relevantes para explicar el desarrollo, diversidad morfológica y dinámica, espacial y estacional, del picoplancton autótrofo y, en especial, de las Pcy. Estos factores son principalmente, factores climáticos, el gradiente térmico y de densidad y, por lo tanto, el patrón de estratificación, la cantidad y calidad de luz en el perfil vertical, la concentración de oxígeno y los nutrientes principales. En el capítulo 4, y tras describir las dinámicas poblacionales del picoplancton autótrofo en la laguna, se establecerán las relaciones oportunas, quedando para este capítulo la descripción y discusión de la evolución espacio-temporal de los factores fisicoquímicos estudiados.

Uno de los factores meteorológicos más importantes es la energía del sol, en forma de irradiancia total, que llega a la superficie de la laguna, por ser la responsable del gradiente térmico que dirige el proceso de estratificación estival y por ser el factor clave en los procesos fotosintéticos de los organismos fotoautótrofos (Kirk, 1994; Wetzel, 2001; Falkowsky y Raven, 2013), los cuales son el eje fundamental de la presente tesis. Esta irradiancia presenta ciclos relacionados con la actividad solar pero se puede asumir que, a lo largo de los años estudiados, ésta no varía significativamente. Sin embargo, la temperatura atmosférica tiene una relación más estrecha con la climatología regional y local, y puede ser un factor importante en las variaciones interanuales en el desarrollo e intensidad de la termoclina. Los tres ciclos limnológicos estudiados presentan una temperatura media atmosférica anual muy similar, con una media de

Capítulo 3

13,77°C y una desviación muy baja de 0,11 °C, aunque en la primavera de 2006 es 1°C superior a la temperatura de esa estación en los años 2005 y 2007, lo que puede influir en la formación de la termoclina y el desarrollo de las poblaciones asociadas. El viento, por otro lado, tiene un efecto muy limitado en la Laguna de La Cruz; la estación para la que se disponen datos está a varios kilómetros de distancia de la laguna y los valores de viento, tanto velocidades medias como de ráfagas, son sólo orientativos de la zona. En realidad, sería necesaria una estación a pie de laguna para tener datos fiables de viento y conocer su efecto real, ya que su influencia se encuentra muy amortiguada por la situación de la laguna en el fondo de una dolina de hundimiento y por su pequeña área superficial (1 ha), añadiendo un factor muy importante de estabilidad a la columna de agua.

Un fenómeno físico, muy particular, que puede tener un impacto muy importante en las Pcy que viven en la Laguna de La Cruz es la precipitación masiva de carbonato cálcico que se produce de manera anual. Este fenómeno es común en lagos ricos en carbonato y suele ser un proceso de precipitación puntual (semanas), acelerado por la actividad fotosintética de los microorganismos que viven en la laguna que pueden actuar como núcleos en la creación de cristales de carbonatos, por lo que suele tener lugar a finales de primavera y principios de verano (Thomson, 2000; Hamilton et al., 2009). En la Laguna de La Cruz, la precipitación masiva de carbonatos se suele observar entre los meses de julio y agosto, con una duración aproximada de una semana, pudiendo presentarse, ocasionalmente, un segundo evento de precipitación al final del período de estratificación entre septiembre y octubre. En la Laguna de La Cruz se han realizado varios estudios, tanto de la biogeoquímica del proceso (Rodrigo et al., 1993) como de los efectos en las poblaciones de algas eucariotas (Sendra, 2009), sin embargo, este es un proceso íntimamente ligado a las poblaciones de cianobacterias y, más en concreto, de picocianobacterias

Capítulo 3

(Thompson, 2000; Ditrich et al., 2003, 2004), siendo además el aspecto menos estudiado de este proceso en la Laguna de La Cruz. En el capítulo 4 se describe el efecto de este proceso de precipitación sobre el desarrollo, diversidad morfológica, abundancia y dinámica anual de Pcy.

En la Laguna de La Cruz, y pese a la quimioclina permanente que delimita el monimolimnion, la distribución del perfil de temperatura a lo largo del ciclo limnológico marca mayoritariamente el perfil de densidad y, por lo tanto, la dinámica de estratificación y la estabilidad de la columna de agua. Pese a que, tanto el índice de estabilidad (desviación típica del perfil de densidad) como la estabilidad de Schmidt, son índices que estiman la estabilidad de la columna de agua, el índice de estabilidad muestra los valores máximos entre julio y agosto, mientras que el índice de estabilidad de Schmidt presenta su valor máximo en junio. Esto es debido, principalmente, a que la estabilidad de Schmidt tiene en cuenta la forma de la cubeta, su hipsografía, para el cálculo. Así, aunque el gradiente de densidad es más marcado entre julio y agosto, la laguna, por su forma, presenta su máximo real de estabilidad en junio, lo que resalta la importancia de la batimetría en sistemas de pequeño tamaño. La distribución y abundancia integrada del picoplancton autótrofo, en relación a ambos índices, puede indicar la importancia relativa de la intensidad del gradiente de densidad o la estabilidad a nivel global (capítulo 4) de la laguna. Las frecuencias de Brunt Väisälä indican la frecuencia máxima (s^{-1}) con la que se puede propagar una onda interna en el perfil vertical con respecto a la estratificación, indicando cuánta energía se requiere para la mezcla de agua entre diferentes partes del perfil vertical (Boehrer y Schultze, 2009). Los valores máximos de frecuencia observados en la Laguna de La Cruz son altos en relación a otros sistemas acuáticos (Boehrer y Schultze, 2009), con valores máximos en la termoclina, creando una barrera muy efectiva entre el epilimnion y el metalimnion, tanto

Capítulo 3

para la difusión química como para la migración o difusión pasiva de organismos acuáticos, principalmente de aquellos de menor tamaño.

La luz, tanto en su intensidad total (estimada como PAR 400-700nm) como en su distribución espectral, es un factor clave para comprender la distribución en la columna vertical y la dinámica estacional de los organismos fotosintéticos en sistemas acuáticos, en general, (Kirk, 1994) y del picoplancton autótrofo, en particular, (Pick, 1991). La extinción de la fracción (PAR) de la luz en la columna de agua es una variable ampliamente usada, tanto para explicar la dinámica de los organismos fotosintéticos como para modelizar procesos tan importantes como la producción primaria (Falkowsky y Raven, 2013). En función de la atenuación de la luz se pueden delimitar: una capa afótica donde se considera que no llega luz suficiente para que se desarrollen los procesos fotosintéticos, y una capa fótica sin limitación por luz para los procesos fotoautotróficos. En general, se establece este límite en el 1% de la luz (PAR) incidente en superficie, por lo que la profundidad de la capa fótica es dinámica y cambia a lo largo del ciclo limnológico. Estos conceptos están en revisión, dado que existen microorganismos adaptados a intensidades muy bajas de luz, cianobacterias y bacterias fotosintéticas principalmente, que pueden representar una importante fracción de la fotosíntesis del sistema desarrollándose a profundidades inferiores al 1% de luz. En la Laguna de La Cruz se observa que los coeficientes de extinción son más elevados en las profundidades donde llega entre el 0,1 y el 0,01 % de luz incidente (Sendra, 2009), principalmente durante los períodos de estratificación, indicando, en estas profundidades, la existencia de densas poblaciones de organismos fotosintéticos absorbiendo la luz. La relevancia en la fijación de carbono en la capa fótica, tanto por fotosíntesis oxigénica como anoxigénica, será descrita en el capítulo 6.

Capítulo 3

La atenuación de la luz ultravioleta es un factor muy importante para comprender diversos aspectos eco-fisiológicos en sistemas acuáticos (Scully y Lean, 1994; Markager y Vincent, 2000). Se observa una marcada extinción exponencial de la radiación UV-A (320-390 nm). La mayor parte de la radiación UV-A incidente es absorbida en los primeros 4 metros de profundidad, delimitando una zona donde, con mayor probabilidad, se darán procesos de fotoinhibición por radiación ultravioleta. La atenuación, medida como coeficiente de extinción de la radiación UV-A, es muy similar en diferentes momentos del ciclo limnológico, como indican las pendientes similares para los muestreos de mezcla, estratificación temprana y final de la estratificación. La intensidad de la radiación incidente es la que delimita la profundidad a la que llega la radiación UV-A, observándose una menor penetración de radiación en invierno (muestreo de enero) y mayor en verano (muestreo de junio), siendo estos coeficientes de extinción y su dinámica estacional coherentes con los de lagos similares (Scully y Lean, 1994). Por otro lado, nuestros datos indican que la luz ultravioleta en la Laguna de La Cruz puede llegar a profundidades de 12-13 metros de profundidad. La propia metodología empleada, con integraciones en cada profundidad de hasta 40 segundos cuando la intensidad de luz no llega a un umbral mínimo, permite observar este tipo de detalles. No existen referencias de que estas intensidades tan bajas en capas tan profundas de un lago tengan algún efecto sobre las comunidades de microorganismos, pero sabemos que el picoplancton es especialmente vulnerable a este tipo de radiaciones, ya que por su pequeño tamaño no suele acumular grandes cantidades de pigmentos de protección y el DNA está relativamente cerca de la membrana celular, con lo que la probabilidad de daños en el material genético es elevada (García-Pichel, 1994). Aunque no tenemos datos de la penetración de radiaciones más energéticas y dañinas como UV-B, es de esperar un patrón similar al observado en el UV-A,

Capítulo 3

aunque con una penetración algo menor. Futuros estudios del efecto de este tipo de radiaciones pueden resultar de gran interés ya que, por ejemplo, en este tipo de sistemas podría ser un factor importante en el ajuste de la profundidad de máximos profundos de clorofila.

La calidad de la luz, es decir, el rango de longitudes de onda dominante que llega a cada profundidad, es un factor decisivo en la distribución y diversidad de los organismos fotosintéticos presentes en sistemas acuáticos (Ganf y Oliver, 1982; Kirk, 1994). En la Laguna de La Cruz se observa, a lo largo del ciclo limnológico, una atenuación relativa en profundidad muy marcada, en todos los rangos de luz respecto al verde (500 y 600 nm). Este patrón es muy común en sistemas acuáticos y, más particularmente, en lagos kársticos profundos (Vila y Abellá, 1994). Esta atenuación es especialmente acusada en el rango más energético del violeta-azul, con unos patrones de extinción de la luz muy similares a lo largo de todo el ciclo limnológico, al absorberse, principalmente por el agua y por pigmentos como la clorofila presentes en toda la columna de agua. En el rango del verde se produce, en profundidad, un enriquecimiento relativo al resto de longitudes de onda. La atenuación de la luz se produce, de manera muy importante, por los microorganismos presentes, siendo más intensa esta atenuación donde se localizan las mayores densidades poblacionales y donde mayor es la concentración de pigmentos específicos, lo que produce un efecto de filtrado selectivo muy importante, podemos, pues, especular una selección de nichos debida a la luz (Stomp et al., 2007) para los organismos fotosintéticos que se distribuyen en el perfil vertical. En el rango de luz naranja-rojo se produce un enriquecimiento relativo hipolimnético muy marcado, a medida que avanza el proceso de estratificación en la laguna, y que puede tener importantes implicaciones en el desarrollo de poblaciones de microorganismos fotosintéticos con pigmentos específicos que aprovechan muy bien este tipo de longitudes de onda, aun en intensidades absolutas muy bajas, como son las

Capítulo 3

bacterias fotosintéticas del azufre (Blankenship et al., 2006). La atenuación selectiva de pequeños rangos espectrales, coincidentes con el espectro de absorción de pigmentos específicos, puede además proporcionar valiosa información sobre la distribución de los microorganismos fotosintéticos en el perfil vertical e implica la existencia de nichos discretos para determinadas especies de organismos muy bien adaptadas a esas características particulares de luz. Esto implica una divergencia de la composición pigmentaria de las especies fotosintéticas que compiten por la luz en estos sistemas (Stomp et al., 2007). Es muy sugestiva la idea de extender esta hipótesis a todos los organismos fotoautótrofos. La diferenciación de nichos, debida a las diferentes cantidades y calidades de la luz en el perfil vertical, puede justificar la diversidad de estos microorganismos que coexisten en sistemas acuáticos (Stomp et al., 2007; Salcher, 2014), en contraste con lo esperado con los modelos actuales, en parte derivados de la formulación original de la paradoja de Hutchinson. (Hutchinson, 1961; Lehman y Tilman, 1997).

La distribución de la concentración de oxígeno disuelto, a lo largo del período estudiado, muestra que el monimolimnion se ha mantenido permanentemente anóxico, al igual que el hipolimnion, a lo largo de todo el período de estratificación térmica. Los patrones observados son similares a lo largo de los tres años de estudio y respecto a otros ciclos limnológicos anteriores en la laguna (Vicente y Miracle, 1988, Dasí y Miracle, 1991; Sendra, 2009). Como patrón general se observa que, a medida que avanza la estratificación, la concentración de oxígeno disuelto aumenta en el epilimnion, y especialmente bajo la termoclina, ya que el fuerte gradiente de densidad disminuye la difusividad del oxígeno hacia la superficie y permite que se acumule el oxígeno, que se produce por fotosíntesis, en las capas profundas del metalimnion, donde se sitúan los máximos profundos de clorofila y producción primaria (Camacho,

Capítulo 3

2006). Las Pcy son microorganismos aerobios, aunque la concentración de oxígeno no es un factor que incida muy directamente sobre su distribución y abundancia. Sin embargo, la posición de la oxiclina influye en otros factores, como la difusión de nutrientes del hipolimnion, permitiendo el desarrollo de bacterias fotosintéticas, con poca o ninguna tolerancia por el oxígeno por debajo de la oxiclina, que compiten directamente con las Pcy por luz y nutrientes.

El patrón de turbidez, en la Laguna de La Cruz, muestra máximos profundos de esta variable en el hipolimnion superior, la cual aumenta a medida que avanza el proceso de estratificación y se localiza en el monimolimnion al producirse la mezcla invernal. Es posible establecer una relación directa entre esta variable y la evolución de las poblaciones de bacterias fotosintéticas (ver capítulo 5), en especial, aquellas con presencia de vacuolas de gas y que son especialmente detectadas por el tipo de sensor de turbidez que tiene instalado la sonda multiparamétrica CTD (Seabird SBE 19) utilizada.

El patrón estacional de la conductividad muestra la quimioclina permanente durante el período de estudio, en torno a los 16 metros de profundidad, lo que es coherente con resultados previos descritos en la laguna (Vicente y Miracle, 1988, Dasí y Miracle, 1991; Sendra, 2009), pero también muestra un patrón muy claro de reducción paulatina de la conductividad en el epilimnion y metalimnion, a medida que avanza la estratificación, con respecto a la conductividad en el período de mezcla invernal. Aniones y cationes mayoritarios como el cloruro, el sulfato, el sodio, el calcio y el magnesio no han mostrado, en períodos de estudio anteriores, este tipo de patrón de agotamiento (Sendra, 2009).

En contraste, tanto en períodos anteriores como en el presente, se ha observado un claro patrón de disminución de concentración, al avanzar la estratificación,

Capítulo 3

en las concentraciones de los nutrientes mayoritarios: fósforo soluble, amonio, nitrato, nitrito y silicato soluble. Tanto las formas oxidadas del nitrógeno, nitrato y nitrito (NO_x) como el amonio, siguen un patrón muy similar de agotamiento, principalmente en el epilimnion, lo que sugiere que el nitrógeno puede ser un factor relevante en la limitación por nutrientes en este tipo de sistemas. Se observa un rápido agotamiento del amonio epilimnético en primavera, entre febrero y mayo, mientras que el agotamiento del nitrato se produce en verano, entre mayo y julio. Esto sugiere que el desarrollo, en cuanto al nitrógeno, de los organismos en la laguna en primavera, se sustenta principalmente de amonio y cuando éste se agota de nitrato, lo que puede implicar importantes repercusiones en el desarrollo y dinámica de los organismos acuáticos, sin olvidar posibles procesos de fijación biológica de nitrógeno en la laguna.

En cuanto a la concentración de fósforo soluble en el agua de la laguna, medido como SRP, la laguna presenta concentraciones relativamente altas de este nutriente en el monimolimnion. El carácter ligeramente ácido y anóxico de este estrato permite la resolubilización y acumulación de este nutriente en forma soluble, con una importante difusión, pese a la quimioclina, de este nutriente en el hipolimnion anóxico a lo largo del período de estratificación. Este enriquecimiento permite un aumento importante de la concentración de fósforo en el mixolimnion tras la mezcla invernal. Sin embargo, las concentraciones en el mixolimnion pronto se reducen a concentraciones en torno al límite de detección, manteniéndose así durante el resto del ciclo limnológico en el epilimnion y metalimnion hasta que se produce la mezcla invernal siguiente. Los valores de concentración de fósforo total (PT) en relación a la concentración de SRP son altos, observándose máximos metalimnéticos relacionados con los máximos profundos de clorofila (DCM). El contraste, entre

Capítulo 3

la concentración de fósforo soluble y total, sugiere un reciclado de este nutriente muy eficiente por parte de las comunidades de microorganismos presentes en la laguna. La relación PT:SRT indica la presencia de máximos de fósforo total en relación al SRP presente. Se observa que la mayor parte del fósforo en el monimolimnion está en forma soluble, con valores máximos de este ratio, principalmente en el metalimnion, durante los períodos de estratificación, donde más fosforo se encuentra acumulado en forma de fósforo particulado, fósforo orgánico formando la biomasa de los organismos o en alguna forma inorgánica de almacenamiento como pirofosfato. Este tipo de acumulación de fósforo particulado, así como diferentes cinéticas de asimilación de fósforo soluble, han sido descritas para otros sistemas. La explicación más lógica, para las bajas concentraciones de fósforo soluble encontradas, es la falta de aportes externos al tratarse de un sistema semicerrado, junto con la co-precipitación del fósforo soluble con calcita (Hamilton et al., 2009). En lagos kársticos saturados de carbonato, como la Laguna de La Cruz, es muy común este tipo de co-precipitación (Kelts y Hsü, 1978), principalmente asociado a procesos fotosintéticos por la retirada de CO₂ del sistema y el aumento de pH. En capítulos posteriores de esta tesis se profundizará, con más detalle, en esta particular dinámica del fósforo en la Laguna de La Cruz.

La relación entre los valores de la proporción entre el nitrógeno total y el fósforo total, respecto a las poblaciones de fitoplancton en sistemas acuáticos, ha sido ampliamente discutido (Takamura et al., 1992; Dolman y Wiedner, 2015). En general se acepta que los valores bajos de este ratio (> 29) favorecen la dominancia de cianobacterias (principalmente fijadoras de nitrógeno) frente a otros grupos de fitoplancton. Sin embargo, los ratios NT:PT observados en la Laguna de La Cruz son bastante elevados, respecto a los valores habituales en otros sistemas acuáticos similares, justificando la dominancia de cianobacterias que, como veremos, en esta laguna son las dominantes y no son fijadoras de

Capítulo 3

nitrógeno. Las picocianobacterias son el grupo dominante del fitoplancton en la Laguna de La Cruz. La particular dinámica del fósforo y la acumulación de nitrógeno, por parte del picoplancton autótrofo, pueden alterar los ratios observados.

El silicato soluble es un nutriente esencial para los grupos de fitoplancton que forman frústulos silíceos, en especial para las diatomeas, y tienen un importante papel en la regulación de la limitación por nutrientes (Egge y Aksnes, 1992). Las diatomeas en la Laguna de La Cruz, han presentado en estudios previos, una distribución y dinámica muy relevante en términos de abundancia y biomasa (Sendra, 2009). A lo largo del período estudiado, el silicato soluble se localiza principalmente en el monimolimnion, observándose una difusión muy importante de este nutriente al hipolimnion a lo largo de todo el período de estratificación térmica y coincidiendo con una importante reducción de la concentración de este elemento en el epilimnion y metalimnion. Esta fertilización del hipolimnion es la que permite la fertilización posterior de todo el mixolimnion cuando se produce la mezcla vertical invernal. Las consecuencias de esta dinámica en las comunidades de fitoplancton serán estudiadas con detalle en capítulos posteriores.

La laguna ha sufrido un paulatino descenso de nivel de agua en los últimos 30 años. En los primeros muestreos realizados en la Laguna de La Cruz, en los años 80 (Vicente y Miracle, 1988), la laguna presentaba una profundidad máxima de 24 metros, en los muestreos realizados en los 90 (Sendra, 2009), 22 metros y en los nuestros, realizados entre los años 2005-2007, la profundidad máxima fue de 21 metros. Este descenso del nivel de agua del lago puede tener importantes repercusiones en los procesos de estratificación y de estabilidad del lago y, por lo tanto, en el desarrollo y dinámica de las comunidades de organismos que la habitan. Debido a la morfometría de la cubeta y a su tamaño,

Capítulo 3

el descenso de nivel en la laguna no supone una pérdida equitativa del área superficial y del volumen del lago. El descenso de 1 m de nivel, entre el período de 1996 a 2006, supone una pérdida del 5% del área superficial, y un descenso de un 11% del volumen acumulado. La energía (calor) que entra en el lago y que permite la estratificación térmica estival es directamente proporcional al área superficial de la laguna, por lo tanto, recibe un 5% menos de energía en un volumen un 11% inferior, lo que implica una mayor intensidad del gradiente térmico global en el sistema y, por lo tanto, una mayor estabilidad física, con implicaciones potencialmente importantes en las comunidades de organismos de la laguna y, en particular, del picoplancton autótrofo, como por ejemplo, un posible aumento de las poblaciones de picoplancton autótrofo u otros organismos de la fracción picoplanctónica, o cambios en los coeficientes de extinción de la luz, que pueden afectar a la distribución, en general, de las poblaciones fotosintéticas de la laguna.

3.4. Referencias

- Blankenship, R. E., Madigan, M. T., & Bauer, C. E. (Eds.). (2006). Anoxygenic photosynthetic bacteria (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Boehrer, B., & Schultze, M. (2008). Stratification of lakes. *Reviews of Geophysics*, 46(2).
- Boehrer, B., & Schultze, M. (2009). Density stratification and stability. *Encyclopedia of Inland Waters*, 1, 583-593.
- Bouman, H. A., Ulloa, O., Barlow, R., Li, W. K., Platt, T., Zwirgmaier, K., & Sathyendranath, S. (2011). Water column stratification governs the community structure of subtropical marine picophytoplankton. *Environmental microbiology reports*, 3(4), 473-482.
- Callieri, C., Modenutti, B., Queimalinos, C., Bertoni, R., & Balseiro, E. (2007). Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology*, 41(4), 511-523.
- Callieri, C., Cronberg, G., & Stockner, J. G. (2012). Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 229-269). Springer Netherlands.
- Camacho, A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2003). Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. *Archiv für Hydrobiologie*, 157(3), 321-338.
- Camacho, A. (2006). On the occurrence and ecological features of deep chlorophyll maxima (DCM) in Spanish stratified lakes. *Limnetica*, 25(1), 453-478.

Capítulo 3

- Cushing, D. H. (1989). A difference in structure between ecosystems in strongly stratified waters and in those that are only weakly stratified. *Journal of Plankton Research*, 11(1), 1-13.
- Dasí, M. J., & Miracle, M. R. (1991). La Laguna de La Cruz (Cuenca, España). *Limnetica*, 7, 37-59.
- Dittrich, M., Müller, B., Mavrocordatos, D., & Wehrli, B. (2003). Induced calcite precipitation by cyanobacterium *Synechococcus*. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 31(2), 162-169.
- Dittrich, M., & Obst, M. (2004). Are picoplankton responsible for calcite precipitation in lakes?. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 33(8), 559-564.
- Dokulil, M. T., & Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438(1-3), 1-12.
- Dolman, A. M., & Wiedner, C. (2015). Predicting phytoplankton biomass and estimating critical N: P ratios with piecewise models that conform to Liebig's law of the minimum. *Freshwater Biology*, 60(4), 686-697.
- Egge, J. K., & Aksnes, D. L. (1992). Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 83(2), 281-289.
- Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2013). *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press.
- Ganf, G. G., & Oliver, R. L. (1982). Vertical separation of light and available nutrients as a factor causing replacement of green algae by blue-green algae in the plankton of a stratified lake. *The Journal of Ecology*, 829-844.

Capítulo 3

- Garcia Pichel, F. (1994). A model for internal self shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnology and Oceanography*, 39(7), 1704-1717.
- Hamilton, S. K., Bruesewitz, D. A., Horst, G. P., Weed, D. B., & Sarnelle, O. (2009). Biogenic calcite-phosphorus precipitation as a negative feedback to lake eutrophication. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66(2), 343-350.
- Harris, G. P. (1980). Temporal and spatial scales in phytoplankton ecology. Mechanisms, methods, models, and management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(5), 877-900.
- Houlahan, J. E., Currie, D. J., Cottenie, K., Cumming, G. S., Ernest, S. K. M., Findlay, C. S., & Wondzell, S. M. (2007). Compensatory dynamics are rare in natural ecological communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3273-3277.
- Hutchinson, G. E. (1958). *A Treatise on Limnology. Vol. 1: Geography, Physics, and Chemistry*.
- Hutchinson, G. E. (1961). The paradox of the plankton. *American Naturalist*, 137-145.
- Imberger, J. (1998). Flux paths in a stratified lake: A review. *Physical processes in lakes and oceans. American Geophysical Union*, 1-18.
- Imboden, D. M., & Wüest, A. (1995). Mixing mechanisms in lakes. In *Physics and chemistry of lakes* (pp. 83-138). Springer Berlin Heidelberg.
- Ivey, G. N., Winters, K. B., & Koseff, J. R. (2008). Density stratification, turbulence, but how much mixing?. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 40(1), 169.
- Kelts, K., & Hsü, K. J. (1978). Freshwater carbonate sedimentation. In *Lakes* (pp. 295-323). Springer New York.

Capítulo 3

- Kirk, J. T. (1994). Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge university press.
- Lehman, C. L., & Tilman, D. (1997). Competition in spatial habitats. *Spatial ecology: the role of space in population dynamics and interspecific interactions*, 185, 191.
- Lerman, A., Imboden, D., & Gat, J. (1995). *Physics and chemistry of lakes*. New York.
- Margalef, R. (1983). *Limnología* (p. 1010). Barcelona: Omega.
- Markager, S., & Vincent, W. F. (2000). Spectral light attenuation and the absorption of UV and blue light in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 642-650.
- Pick, F. R. (1991). The abundance and composition of freshwater picocyanobacteria in relation to light penetration. *Limnology and Oceanography*, 36(7), 1457-1462.
- Postius, C., & Ernst, A. (1999). Mechanisms of dominance: coexistence of picocyanobacterial genotypes in a freshwater ecosystem. *Archives of microbiology*, 172(2), 69-75.
- Ragotzkie, R. A. (1978). Heat budgets of lakes. In *Lakes* (pp. 1-19). Springer New York.
- Reynolds, C. S., Oliver, R. L., & Walsby, A. E. (1987). Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zealand journal of marine and freshwater research*, 21(3), 379-390.
- Rodrigo, M. A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (1993). Short-term calcite precipitation in the karstic meromictic Lake La Cruz (Cuenca, Spain). *Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 25(2), 711-719.
- Rodrigo, M. A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2001). The meromictic Lake La Cruz (Central Spain). Patterns of stratification. *Aquatic sciences*, 63(4), 406-416.

Capítulo 3

- Salcher, M. M. (2013). Same same but different: ecological niche partitioning of planktonic freshwater prokaryotes. *Journal of Limnology*, 73(s1).
- Scully, N. M., & Lean, D. R. S. (1994). The attenuation of ultraviolet radiation in temperate lakes. *Ergebnisse der Limnologie*, 43, 135-135.
- Sendra, M. D. (2009). Distribución del fitoplancton en la Laguna de la cruz y su relación con los nutrientes. Universitat de València, València (España), 174 pp.
- Stomp, M., Huisman, J., Stal, L. J., & Matthijs, H. C. (2007). Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. *The ISME journal*, 1(4), 271-282.
- Takamura, N., Otsuki, A., Aizaki, M., & Nojiri, Y. (1992). Phytoplankton species shift accompanied by transition from nitrogen dependence to phosphorus dependence of primary production in Lake Kasumigaura, Japan. *Archiv für Hydrobiologie*, 124(2), 129-148.
- Thompson, J. B. (2000). Microbial whitings. In *Microbial sediments* (pp. 250-260). Springer Berlin Heidelberg.
- Vicente, E. and M. R. Miracle. (1988) Physicochemical and microbial stratification in a meromictic karstic lake of Spain. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 23, 522-529.
- Vila, X., & Abella, C. A. (1994). Effects of light quality on the physiology and the ecology of planktonic green sulfur bacteria in lakes. *Photosynthesis research*, 41(1), 53-65.
- Wagner, C., & Adrian, R. (2009). Cyanobacteria dominance: quantifying the effects of climate change. *Limnology and Oceanography*, 54, 2460-2468.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. Gulf Professional Publishing.

Capítulo 4

Dinámica espacio-temporal del picoplancton autótrofo en Laguna de La Cruz

4.1. Introducción

En este capítulo se describe la dinámica temporal, en el perfil vertical, de las picocianobacterias (Pcy) presentes en la Laguna de La Cruz. Las variaciones estacionales en la abundancia de las Pcy han sido muy bien documentadas en diferentes ambientes acuáticos, tanto marinos como de agua dulce; la mayor parte de estos estudios se localizan en latitudes templadas y muestran un patrón anual común, observándose las abundancias más altas en verano, cuando la temperatura del agua alcanza su máximo valor anual, y los valores mínimos en invierno (Weisse, 1988; Stockner et al., 2002; Callieri, 2007). Este patrón general presenta variaciones significativas en lagos de regiones templadas, en estos ecosistemas es más común un patrón bimodal, con un primer máximo de abundancia en primavera o principios de verano, y un segundo máximo a finales de verano y principios de otoño (Stockner et al., 2002; Callieri et al., 2012). Este tipo de patrón lo podemos observar en muchos lagos muy bien estudiados como, por ejemplo, el Lago Maggiore (Callieri y Piscia, 2002), el Lago Constanza (Gaedke y Weisse, 1998) o el lago Stechlin (Padisák et al., 2003). Sin embargo, cuando se tiene mucha información y largas series temporales se observa que, en muchos casos, no todos los años se sigue claramente este patrón bimodal.

La gran variabilidad interanual en la dinámica de las Pcy está relacionada, principalmente, con las diferencias en las condiciones climáticas, que provocan diferentes regímenes de mezcla de primavera, y el momento de la estabilización de la columna de agua (Weisse, 1993). Los estudios realizados en lagos oligotróficos templados de la Columbia Británica muestran una tendencia a máximos estacionales relacionados con los niveles y duración de la suplementación estacional de nutrientes (Stockner y Shortreed 1988, 1994). Los grandes picos de primavera también son comunes a los lagos eutróficos,

hipereutróficos y distróficos poco profundos (Sime-Ngando, 1995; Jasser, 1997; Mózes et al., 2006). Los patrones estacionales que se encuentran en los lagos daneses (Søndergaard, 1991), lagos canadienses (Pick and Agbeti, 1991), Lago Biwa, Japón (Maeda et al., 1992), lagos ingleses (Hawley y Whitton, 1991; Sánchez-Baracaldo et al., 2008), lago Mondsee, Austria (Crosbie et al., 2003), Lagos Bourget y Ginebra, Francia (Personnic et al., 2009), todos carecen del máximo de primavera, existiendo sólo un máximo de verano o de otoño. La falta del máximo de primavera Pcy en éstos fue probablemente debido a la estratificación débil en marzo y abril, y a la mezcla vertical, por lo tanto, relativamente profunda. Esta interpretación se ve reforzada por los estudios en el Lago Baikal, donde debido a la capa de hielo de invierno y las condiciones isotérmicas de primavera, las Pcy alcanzan una alta abundancia en los meses de verano y carecen del máximo de primavera.

Las picocianobacterias (Pcy) presentan dos morfologías comunes: las células individuales (cocos y bacilos) y colonias con diversa morfología colonial. Callieri et al., (2007) propone considerar las microcolonias como formas de transición de células individuales a morfotipos coloniales. En condiciones favorables, algunas picocianobacterias pueden desarrollar una cubierta de mucílago, formando un grupo de entre 5 a 50 células y deben ser consideradas Pcy.

En general, la morfometría y el estado trófico de sistemas acuáticos influyen de manera muy importante en la composición, diversidad y abundancia de las comunidades de Pcy. La distribución relativa respecto al resto de las poblaciones de organismos fotosintéticos depende de factores como la diferenciación de nicho, el flujo y disponibilidad de nutrientes o la presión de depredación. La gran mayoría de los estudios confirman que el porcentaje de contribución de las Pcy a la biomasa total de fitoplancton aumenta con la

Capítulo 4

disminución del estado trófico, que comúnmente se explica por la alta afinidad de Pcy por el ortofosfato, su capacidad de utilizar, a bajas concentraciones, sustratos orgánicos de fosfato y sus adaptaciones a la luz de baja intensidad. Una consecuencia, del estudio de las dinámicas de los principales microorganismos fotosintéticos presentes en la laguna, es intentar establecer los factores más relevantes que influyen en la dinámica de cada grupo, y en especial de Pcy, que es el más abundante en la laguna; esta cuestión será abordada en capítulos posteriores, concretamente en el capítulo 8.

4.2. Métodos específicos

Todos los métodos de este capítulo se encuentran incluidos en el capítulo 2 de metodología general. Las técnicas microscópicas para el recuento de abundancias y cálculos de biomasa, de los diferentes microorganismos presentes en la laguna, así como, los métodos para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos se encuentran detallados en el capítulo 2.

4.3. Resultados

Dinámica espacio-temporal de Pcy en la Laguna de La Cruz

La abundancia de las Pcy en la Laguna de La Cruz, estimada por microscopía, muestra un patrón general, que se repite durante los años estudiados, el mixolimnion presenta valores de abundancia de Pcy homogéneos y relativamente bajos. A medida que aumenta la temperatura y se inicia la estratificación térmica en primavera, la abundancia de las Pcy aumenta en el

Capítulo 4

epilimnion y, sobretudo, en el metalimnion. Sin embargo, a medida que avanza el proceso de estratificación térmica en verano, la abundancia de Pcy disminuye con rapidez en el epilimnion y metalimnion superior, concentrándose las mayores abundancias en el metalimnion profundo, bajo la termoclina y alrededor de la oxiclina, formando un máximo profundo de Pcy. Entre junio y agosto, se observa un importante descenso de la abundancia de las Pcy, tanto en el perfil vertical (figura 4.1 y 4.3) como en los valores de abundancia integrada en toda la laguna (figura 4.2), patrón que se repite durante los tres ciclos estudiados (1997, 1998 y 2006). El aumento de abundancia en el monimolimnion y el aumento de la sedimentación de Pcy, durante julio y agosto, indica que este descenso está asociado al proceso de precipitación tumultuosa de carbonato cálcico.

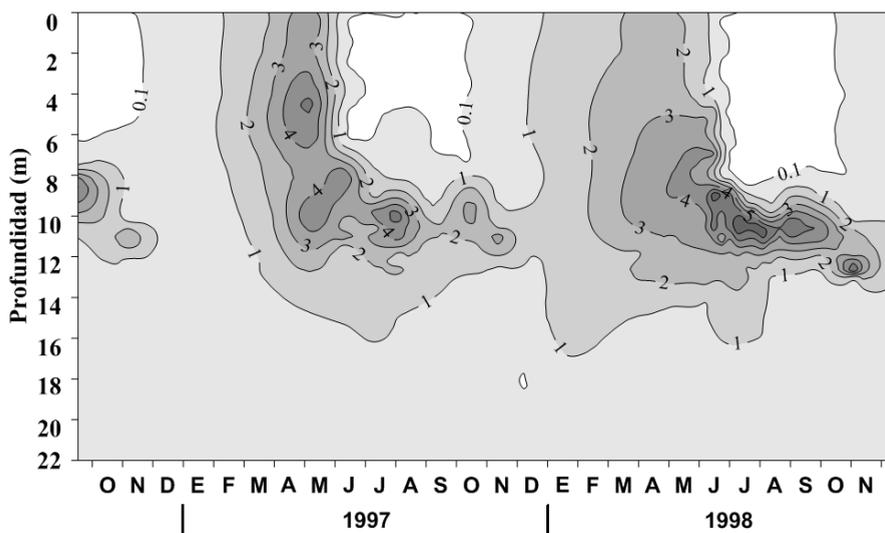


Figura 4.1. Distribución espacio-temporal de la abundancia de Pcy total (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) en La Laguna de La Cruz, durante el período de estudio comprendido entre 1997-1998, estimado por microscopía de epifluorescencia.

Capítulo 4

Tras esta importante retirada de biomasa en verano (figura 4.2 y 4.3), entre julio y agosto dependiendo de la fecha exacta de la precipitación (“whiting”), los valores integrados de Pcy en la columna de agua ya no vuelven a los registrados en primavera, sin embargo, el máximo profundo de clorofila se recupera en otoño, principalmente debido a las Pcy, aunque muy localizado en torno a los 12 metros de profundidad. El máximo profundo de clorofila-*a* (DCM) se mantiene estable durante todo el periodo otoñal hasta la llegada de la mezcla invernal.

En total se han identificado, para este estudio, 7 morfologías diferentes de cianobacterias en la Laguna de La Cruz. Dos de estas morfologías no podemos considerarlas picocianobacterias, el morfotipo colonial (COL1) y la cianobacteria filamentosa *Pseudoanabaena* (PSEUDO). COL1 solo presenta abundancias relevantes por debajo de 14 metros de profundidad en diferentes momentos del ciclo limnológico (figura 4.10). PSEUDO tiene una presencia muy limitada y su presencia es anecdótica (figura 4.7).

El resto de morfotipos, propiamente Pcy, son dos morfotipos bacilares y unicelulares, BAC1 formado por bacilos de pequeño tamaño (2.4 x 1 μm) y BAC2 formado por bacilos un poco más grandes (2.1 x 0.8 μm). Un morfotipo tipo coco (COC1) unicelular (0.5 x 0.5 μm) y dos morfotipos que forman cadenas más o menos alargadas, FIL1 formado por cadenas de bacilos (2.1 x 1.1 μm) y FIL2 formado por cadenas de cocos (1 x 1 μm).

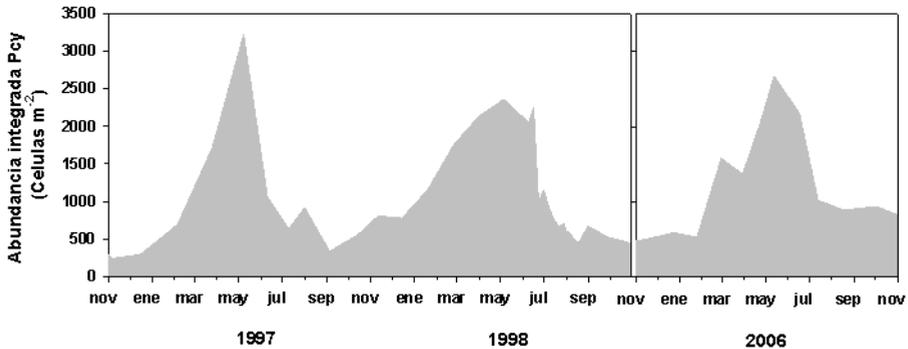


Figura 4.2. Evolución de la abundancia total integrada de Pcy total (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) en la columna de agua de la Laguna de La Cruz, durante los años 1997, 1998 y 2006. En la integración se ha tenido en cuenta el perfil hipsográfico de la cubeta.

BAC1 (figura 4.4) es el morfotipo dominante y es el responsable de la dinámica limnológica antes descrita en general para Pcy en la laguna. BAC2 (figura 4.5) sin embargo, se desarrolla en el metalimnion en primavera, sin formar parte del DCM de verano, tras precipitación “whiting” recupera su población en el DCM otoñal. El morfotipo COC1 presenta abundancias importantes en el mixolimnion durante la mezcla y en el metalimnion en verano, formando parte además del DCM de otoño FIL 1 y FIL2 (4.9 y 4.10) presentan una distribución y abundancia muy similar, pese a la diferencia morfológica, localizándose principalmente áreas superficiales durante la mezcla y en el metalimnion al inicio de la estratificación, en primavera, y en verano.

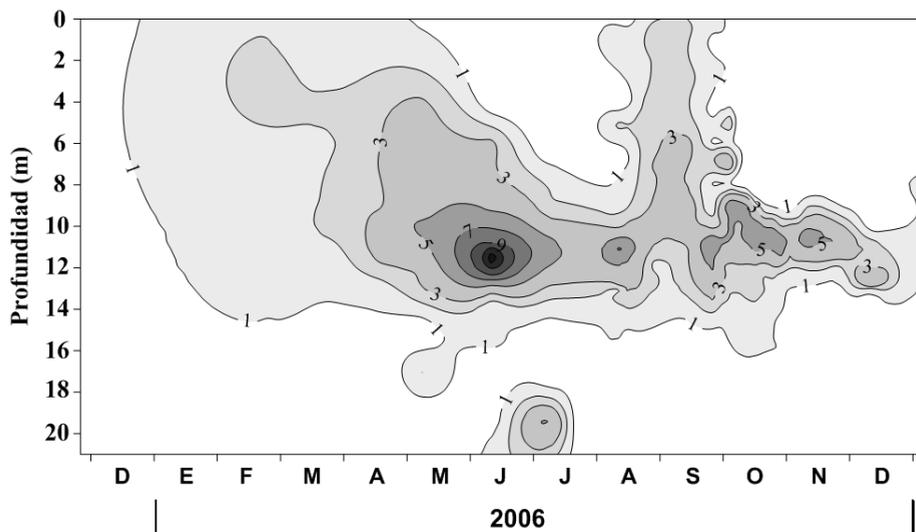


Figura 4.3. Distribución espacio-temporal de la abundancia de Pcy total (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) en la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico de 2006, estimado por microscopía de epifluorescencia.

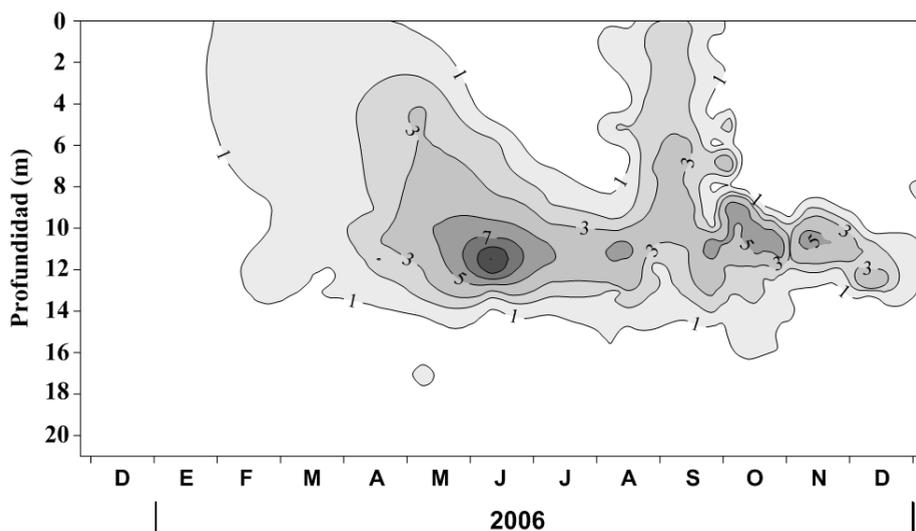


Figura 4.4. Distribución espacio-temporal de la abundancia del morfotipo BAC1 de Pcy (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) en la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico de 2006, estimado por microscopía de epifluorescencia.

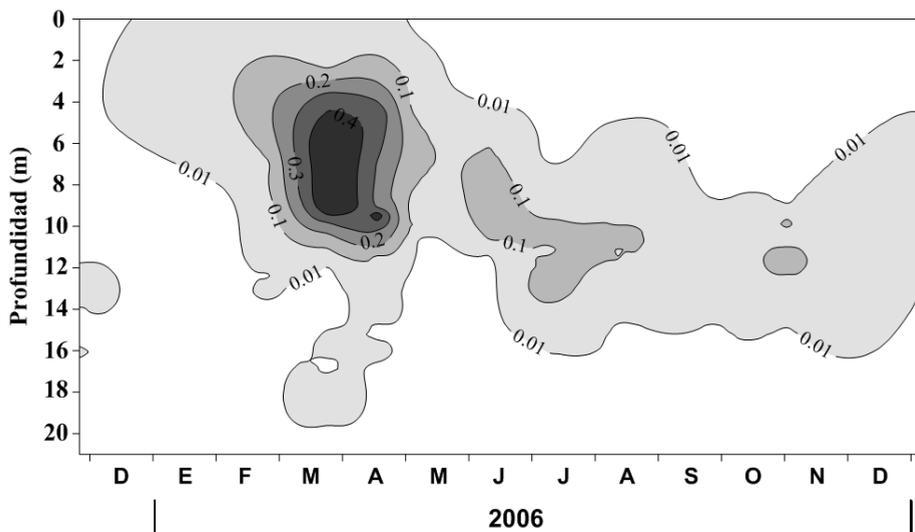


Figura 4.5. Distribución espacio-temporal de la abundancia del morfotipo BAC2 de Pcy (células ml⁻¹ × 10⁶) en la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico de 2006, estimado por microscopía de epifluorescencia.

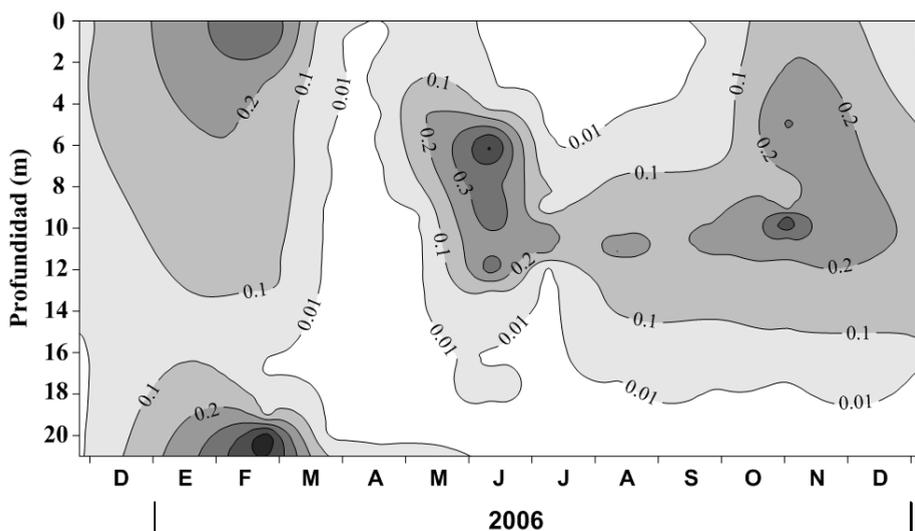


Figura 4.6. Distribución espacio-temporal de la abundancia del morfotipo COC1 de Pcy (células ml⁻¹ × 10⁶) en la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico de 2006, estimado por microscopía de epifluorescencia.

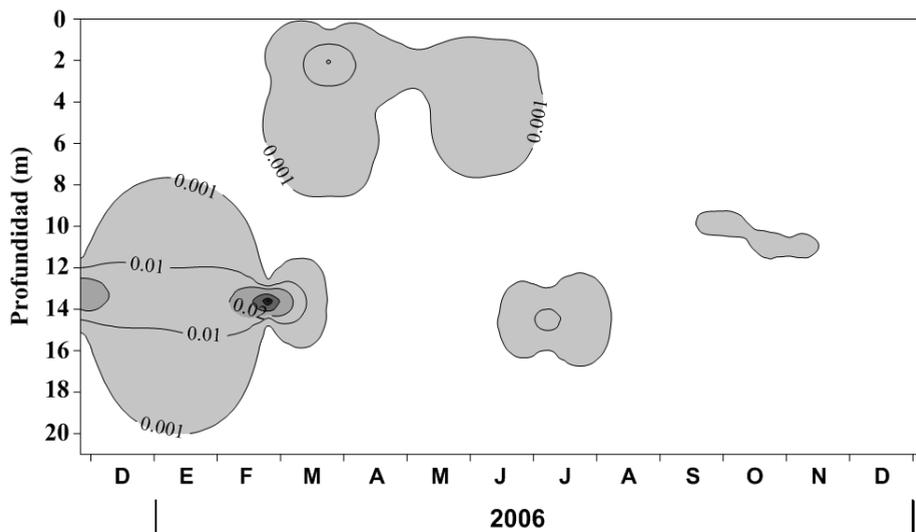


Figura 4.7. Distribución espacio-temporal de la abundancia del morfotipo PSEUDO (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) en la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico de 2006, estimado por microscopía de epifluorescencia.

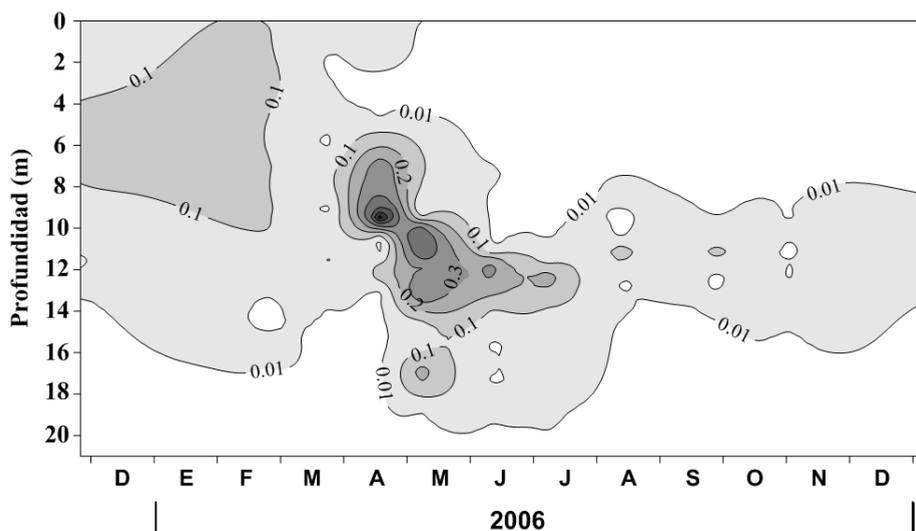


Figura 4.8. Distribución espacio-temporal de la abundancia del morfotipo FIL1 de Pcy (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) en la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico de 2006, estimado por microscopía de epifluorescencia.

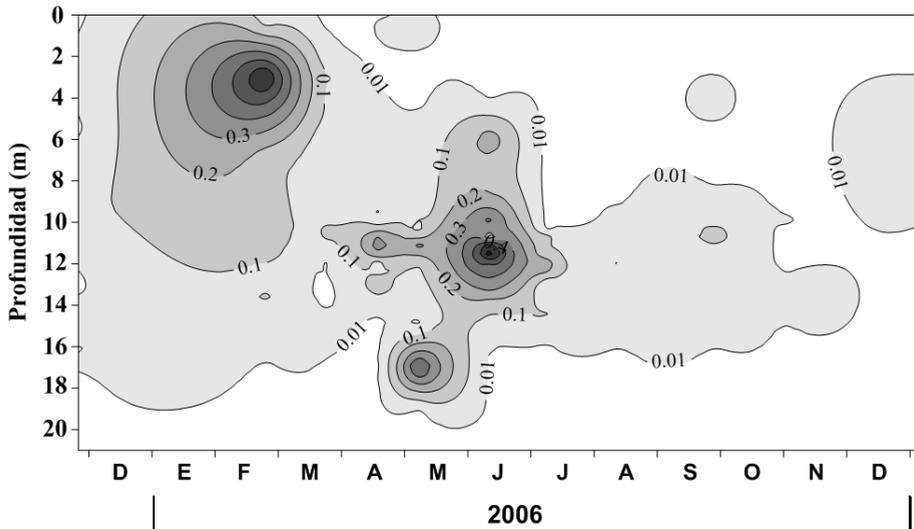


Figura 4.9. Distribución espacio-temporal de la abundancia del morfotipo FIL2 de Pcy (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) en la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico de 2006, estimado por microscopía de epifluorescencia.

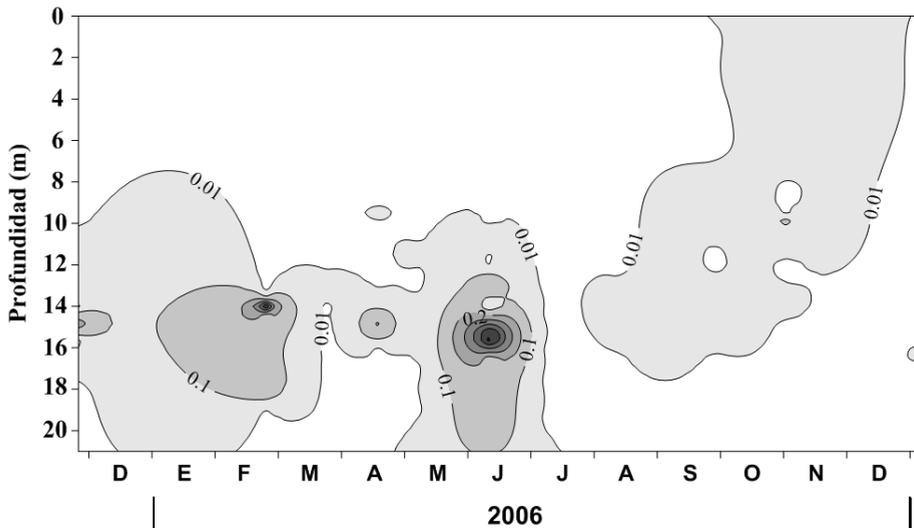


Figura 4.10. Distribución espacio-temporal de la abundancia del morfotipo COL (células $\text{ml}^{-1} \times 10^6$) en la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico de 2006, estimado por microscopía de epifluorescencia.

Biomasa de Pcy en relación al resto de organismos autótrofos

La distribución, en el perfil vertical, de la biomasa de los principales grupos fotosintéticos muestra el desarrollo de Pcy en primavera formando un máximo profundo en torno a los 12 metros de profundidad en verano.

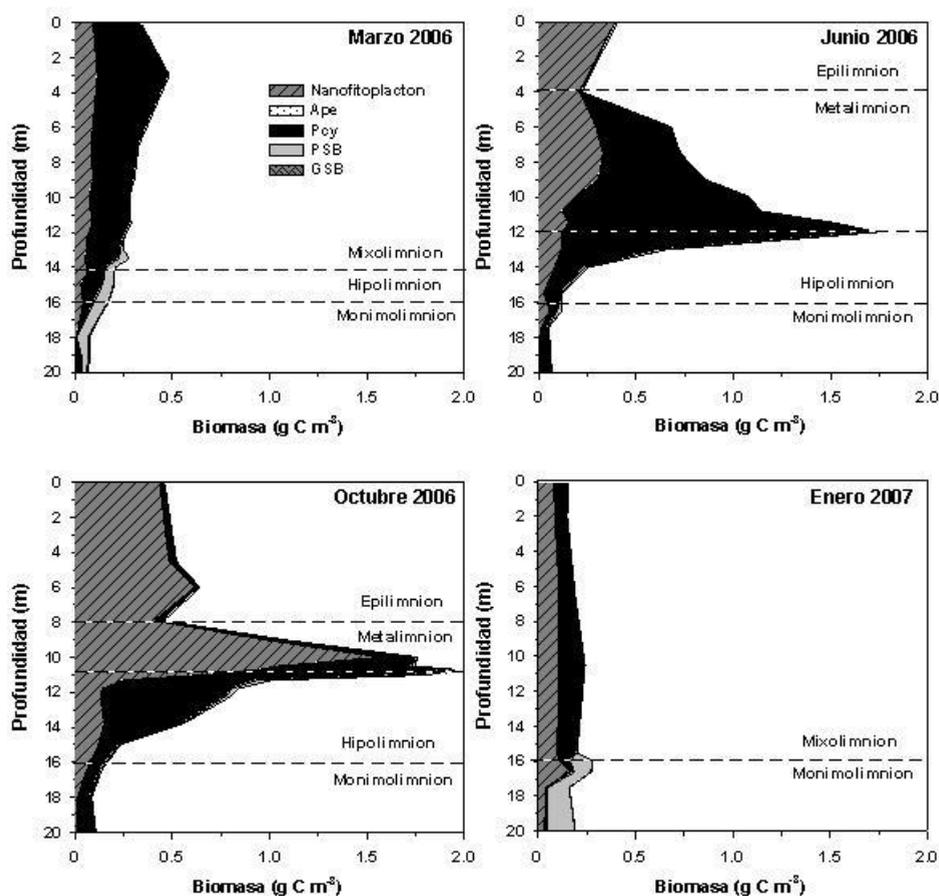


Figura 4.11. Perfiles de biomasa acumulados (g C m^{-3}) de nanofitoplancton, picoeucariotas autótrofos (Ape), picocianobacterias (Pcy), bacterias púrpuras del azufre (PSB) y bacterias verdes del azufre (GSB), en la columna de agua de la Laguna de la Cruz en diferentes momentos del ciclo limnológico estudiado.

Capítulo 4

También se observa como el aumento de abundancia de nanofitoplancton a medida que avanza la estratificación, con un máximo profundo de abundancia en otoño, debido a la sedimentación del Bloom epilimnético de verano de *Cosmarium sp.*

La biomasa integrada de organismos fotosintéticos del perfil vertical aumentó gradualmente a medida que se desarrollaba la estratificación. Tras la mezcla vertical invernal, se midieron los valores mínimos de biomasa ($1,6 \text{ g C m}^{-2}$), mientras que los máximos se registraron al final del período de estratificación ($5,7 \text{ g C m}^{-2}$).

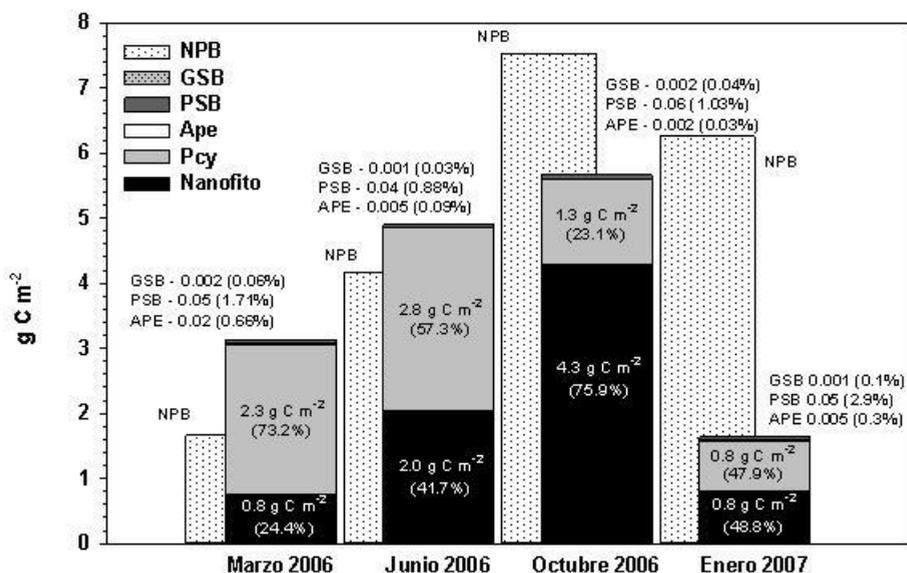


Figura 4.12. Biomasa total integrada (g C m^{-2}) y % de contribución a la biomasa total (integrada a todo el volumen de la laguna) de nanofitoplancton, picocariotas autótrofos (Ape), picocianobacterias (Pcy), bacterias púrpuras del azufre (PSB), bacterias verdes del azufre (GSB) y NPB (“non-photosynthetic bacteria”), en la columna de agua de la Laguna de La Cruz.

En el período de mezcla invernal Pcy y nanofitoplancton co-dominan mostrando una distribución homogénea en todo el mixolimnion, representando en conjunto alrededor del 97% de la biomasa autótrofa total. A medida que se establece la estratificación aumenta la importancia relativa del nanofitoplancton a la contribución total de biomasa, hasta llegar al máximo de un 76 % en otoño. En general, su contribución a la biomasa global integrada de organismos fotosintéticos de las bacterias fotosintéticas del azufre es relativamente pequeña, entre 1-3% del total de biomasa para *Lamprocystis purpurea* y entorno al 0,1% para *Chlorobium chlatratiforme*. *Lamprocystis purpurea* se desarrolla principalmente, en el monimolimnion durante el período de mezcla invernal y en la interfase óxico-anóxica, justo debajo de la DCM, y en el hipolimnion superior durante el período de estratificación. *Chlorobium chlatratiforme* se desarrolla, principalmente en primavera, manteniendo poblaciones estables durante el resto del período de estratificación por debajo de *Lamprocystis*.

Pigmentos fotosintéticos presentes en la Laguna de La Cruz

La distribución de clorofila-*a* en el perfil vertical (figura 4.13) muestra un patrón muy similar al observado en las abundancias de las Pcy, con máximos profundos de clorofila (DCM) muy marcados, en verano y en otoño, en torno a la oxiclina, entre 10 y 12 metros de profundidad. El feoforbido-*a* se localizan principalmente bajo los DCM de verano y otoño. La feofitina-*a* se acumula en el monimolimnion y en el hipolimnion de la laguna y puntualmente en el epilimnion en diferentes momentos de la mezcla. La clorofilida-*a*, sigue un patrón muy similar al de la distribución de las Pcy, con máximos en el DCM de verano y otoño.

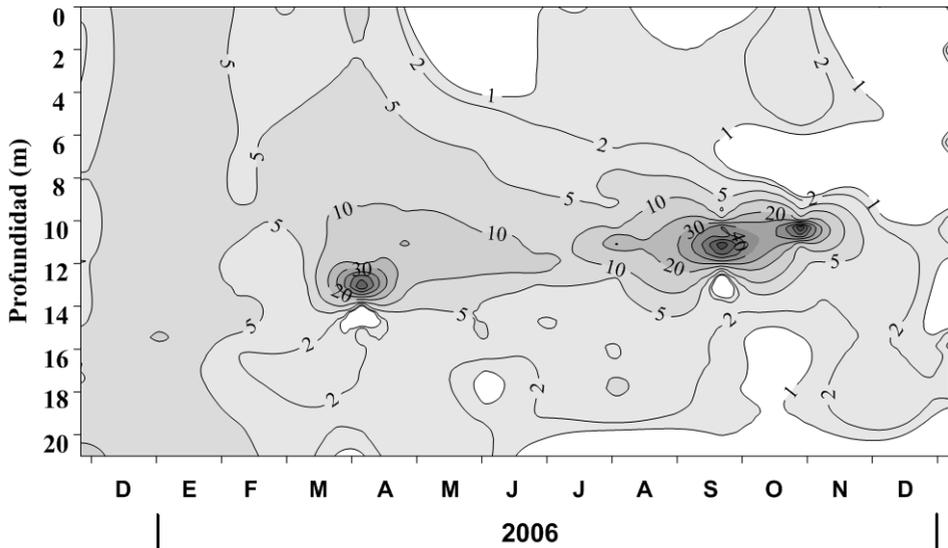


Figura 4.13. Distribución espacio-temporal de la concentración de clorofila-*a* ($\mu\text{g l}^{-1}$) en la Laguna de La Cruz, durante el período 2006, estimado por cromatografía líquida HPLC.

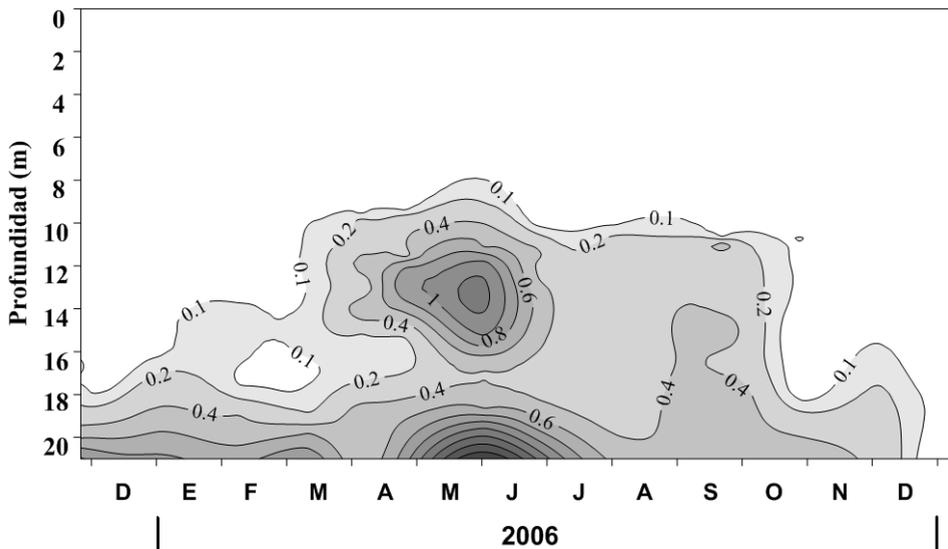


Figura 4.14. Distribución espacio-temporal de la concentración de feofórbido-*a* ($\mu\text{g l}^{-1}$) en la Laguna de La Cruz, durante el período 2006, estimado por cromatografía líquida HPLC.

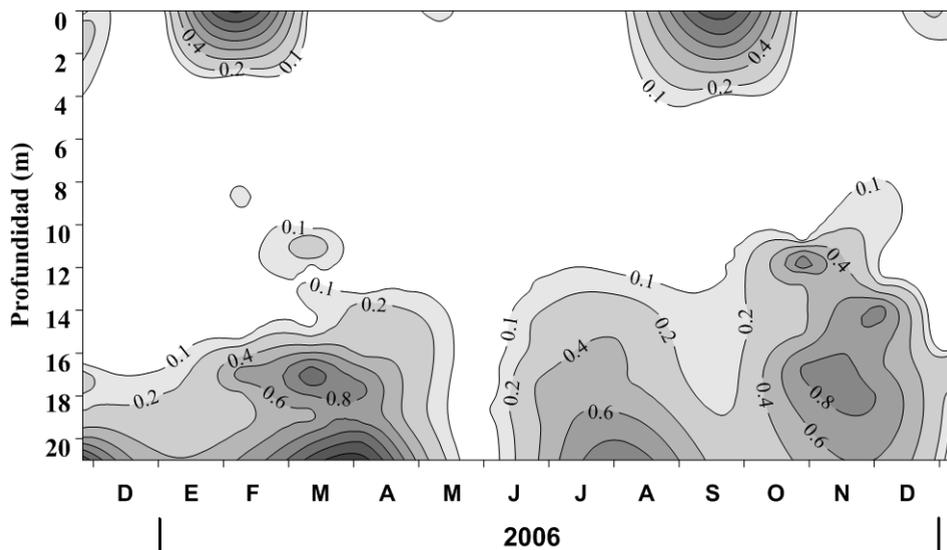


Figura 4.15. Distribución espacio-temporal de la relación feofitina-a/clorofila-a en la Laguna de La Cruz, durante el período 2006, estimado por cromatografía líquida HPLC.

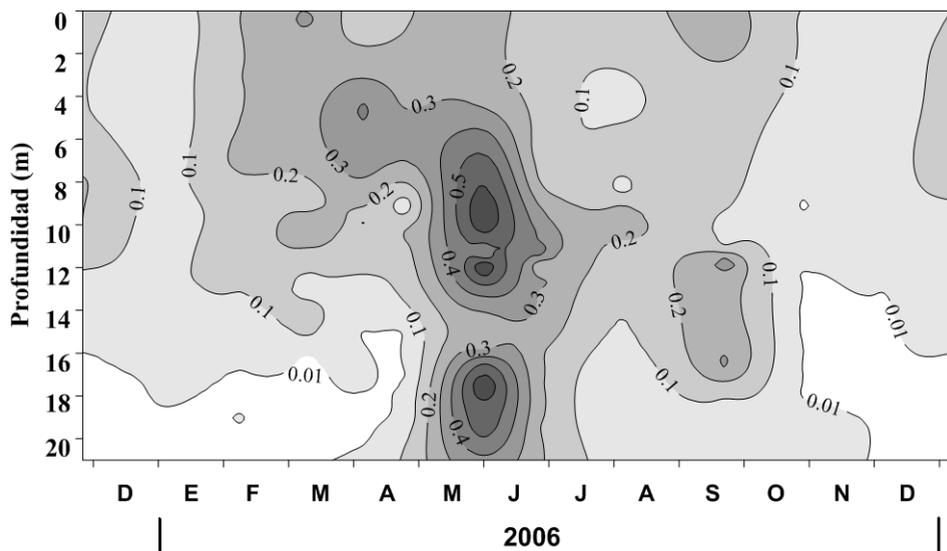


Figura 4.16. Distribución espacio-temporal de la proporción clorofilida-a/clorofila-a en la Laguna de La Cruz, durante el período 2006, estimado por cromatografía líquida HPLC.

Ciliados y nanoflagelados

Durante el desarrollo de la estratificación, diferentes especies de ciliados microaerófilos y anaeróbicos se desarrollan en el metalimnion y el monimolimnion de la Laguna de La Cruz. En concreto, muestran que, numéricamente, los géneros dominantes son *Mesodinium* sp. y *Scuticociliates*. El género *Pseudocohnilembus* también se encontraba presente en todo el gradiente de oxígeno disuelto, mientras que *Sathrophilus* (*Sphenostomella*) y *Cristigera* se encontraban, principalmente, en la oxiclina. Géneros mixotróficos, como *Coleps* y *Pelagothrix* (*Prorodon*), junto con *Spirostomum teres*, dominaron en términos de bioamasa la parte inferior del metalimnion y de la oxiclina, respectivamente. En el monimolimnion se encontraron ciliados del género *Caenomorpha* y *Odontostomatids*. *Teres Spirostomum* es un ciliado muy bien conocido en las interfaces óxico-anóxicas de los sistemas acuáticos estratificados, mostrando altas tasas de depredación, sobre picocyanobacterias y bacterias heterótrofas, en el metalimnion inferior y el monimolimnion de la Laguna de La Cruz.

4.4. Discusión

Variaciones estacionales en la abundancia de picocianobacterias (Pcy) han sido muy bien documentadas en diferentes ambientes acuáticos, tanto marinos como de agua dulce; la mayor parte de estos estudios se localizan en latitudes templadas y muestran un patrón anual común, observándose las abundancias más altas en verano, cuando la temperatura del agua alcanza su máximo valor anual, y los valores mínimos en invierno (Weisse, 1988; Callieri, 2007). Este patrón general presenta variaciones significativas en lagos de regiones templadas; en estos ecosistemas es más común un patrón bimodal, con un

Capítulo 4

primer máximo de abundancia en primavera o principios de verano, y un segundo máximo a finales de verano y principios de otoño (Stockner et al., 2002; Callieri et al., 2012).

En la Laguna de La Cruz no se observa este patrón bimodal, los valores máximos integrados en la columna de agua, y corregidos por el perfil batimétrico del lago, muestran un máximo de abundancia integrada en primavera, más concretamente en mayo. En primavera Pcy se distribuye homogéneamente por el epilimnion y el metalimnion, sin embargo, a medida que avanza la estratificación, y como consecuencia del agotamiento de nutrientes, posible presión por depredación, y una intensidad y calidad de luz más favorables, se acumulan en el metalimnion, en torno a la oxiclina, entre los 10 y 13 metros de profundidad. Con los máximos profundos bien establecidos, a mediados del verano se produce, en la Laguna de La Cruz, la precipitación cálcica tumultuosa “*whiting*”, generalmente a finales de julio o principios de agosto; este fenómeno que afecta, de manera global, a toda la laguna produce una pérdida muy importante de biomasa en el perfil vertical.

A partir de septiembre, se observa un incremento muy importante de biomasa en el máximo profundo de clorofila, entre 10 y 12 metros de profundidad. Este aumento de biomasa no afecta significativamente a los valores integrados en la laguna debido, principalmente, a que la abundancia en el epilimnion es menor (la concentración de todos los nutrientes mayoritarios llega a los mínimos niveles, incluso el nitrato) y a que el máximo profundo se encuentra más concentrado en torno a la oxiclina. Sin embargo, este segundo máximo profundo está sin duda relacionado con el segundo pico anual, citado como patrón general, en este tipo de ecosistemas. Hay múltiples ejemplos que muestran que este tipo de patrón bimodal puede no repetirse todos los años, bien por falta del máximo de primavera, como ocurre en el caso de lagos donde

la estratificación es relativamente débil, como lagos alpinos o prealpinos (Callieri et al., 2012), o bien por falta del máximo otoñal, como se observa en lagos con series temporales largas (como el lago Constanza o Scheling). Esta variabilidad interanual tan marcada se ha justificado en función de diferencias en las condiciones climatológicas que influyen en los períodos de mezcla y en la estabilidad general de la columna de agua. En la Laguna de La Cruz, donde los factores climáticos están muy amortiguados, se observa que el principal responsable de que no exista un máximo otoñal integrado es la pérdida de biomasa en verano, principalmente por co-precipitación con calcita, aunque pérdidas de biomasa por depredación también pueden ser importantes.

El aumento en la abundancia, observado en la Laguna de La Cruz a finales de septiembre y que se mantiene hasta la mezcla invernal, se produce principalmente por la combinación de dos factores, en primer lugar, la intensidad de luz que llega al DCM es mayor al aumentar la transparencia del epilimnion y, en segundo lugar, las concentraciones de nutrientes han aumentado en el hipolimnion difundiendo a la oxiclina.

En general, los rangos de abundancia normales de Pcy, en lagos de regiones templadas, se sitúan entre 10^3 - 10^5 células ml^{-1} , observándose valores de abundancia más altos (10^5 - 10^6), puntualmente, en máximos profundos y en lagos tropicales. En la Laguna de La Cruz, los valores de abundancia promedio en el perfil vertical siempre están por encima de 10^6 , con valores máximos de abundancia puntual en los DCM de 14×10^6 células ml^{-1} . Estos son los valores más altos de Pcy registrados en lagos templados (Camacho et al., 2003); la causa de esta abundancia tan alta parece debida a diversos factores: los niveles de estabilidad de la columna de agua son muy elevados, la intensidad y, principalmente, la calidad de la luz en este tipo de lagos favorece los máximos profundos dominados por Pcy, la dinámica de los nutrientes inorgánicos

Capítulo 4

mayoritarios puede favorecer también el desarrollo de la fracción picoplanctónica, mejor adaptada a esta limitación y, por último, la depredación también puede jugar un importante papel, aunque en este caso los mecanismos están menos claros. Para intentar esclarecer la relevancia relativa de los diferentes factores involucrados se prepararon bioensayos específicos que se detallan en el capítulo 8.

A la hora de comparar la relevancia de los diferentes microorganismos que se desarrollan en la Laguna de La Cruz, hemos optado por usar la biomasa, en lugar de otras aproximaciones como la abundancia o el biovolumen. Esta aproximación presenta una complejidad adicional, ya que la diversidad morfológica de los diferentes grupos hace necesario un estudio más completo que el simple recuento de abundancia. Por ejemplo, a diferencia de lo que ocurre en otros sistemas como los marinos, las picocianobacterias de agua dulce presentan una gran riqueza y diversidad morfológica (Callieri et al., 2012).

En sistemas acuáticos de agua dulce, los picoeucariotas suelen encontrarse cerca de la superficie, en general en abundancias entre 2 y 3 órdenes de magnitud por debajo de las de Pcy, sin embargo, este grupo puede ser dominante en el epilimnion de lagos eutróficos y distróficos (Craig, 1987; Stockner y Shortreed, 1991) en la parte más baja de la zona eufótica en ambientes marinos (Chisholm et al., 1988). En la Laguna de La Cruz las abundancias observadas son relativamente bajas, en torno a 3 órdenes de magnitud inferiores a la abundancia de Pcy, y con un patrón estacional muy definido. Durante el período de mezcla, estos picoeucariotas se encuentran en todo el mixomilnion y presentan los valores de abundancia máximos anuales en la superficie de la laguna, sin embargo, a medida que avanza el proceso de estratificación se acumulan en el máximo profundo de clorofila siguiendo un patrón paralelo al observado en Pcy. Esta dinámica es coherente con los resultados observados por otros autores, que

Capítulo 4

destacan un aumento en la abundancia de este grupo tras la mezcla invernal, con temperaturas inferiores a 10°C (Vörös et al., 2009); su desarrollo metalimnético posterior está aparentemente relacionado con esta adaptación a temperaturas relativamente bajas. Su proporción en biomasa relativa, respecto al resto de grupos fotosintéticos, es muy baja en la Laguna de La Cruz.

El grupo de bacterias procariotas, no fotosintéticas, estimadas por tinción con DAPI, está formado principalmente por lo que en la bibliografía se denomina HPP (“heterotrophic picoplankton”), sin embargo, una parte de estas bacterias pueden ser quimiolitioautótrofas, como veremos en el capítulo 5, por lo que hemos llamado a este grupo “NPB” (“Non photosynthetic bacteria”). Se han observado valores de abundancia y biomasa de NPB mayores en aguas anóxicas (en el hipolimnion y, sobre todo, en el monimolimnion) que en profundidades óxicas. Estos resultados han sido descritos en diferentes lagos (Ochs, 1991; Lovell y Konopka, 1985).

En general, la biomasa integrada de todos los productores primarios (Pcy, Ape, GSB, PSB y nanofitoplacton) aumenta a medida que se desarrolla la estratificación, desde 3 g C m⁻² en primavera a 5,5 g C m⁻² en otoño. La biomasa de “NPB” está acoplada a la producción primaria, subiendo desde 1,5 g C m⁻² en primavera a 7,5 g C m⁻² en otoño. Sin embargo, la mezcla vertical produce un desfase muy significativo en este acoplamiento; la biomasa fotosintética, principalmente debido al nanofitoplacton, desciende a 1,5 g C m⁻², parte de esta biomasa sedimenta en el monimolimnion y otra parte es mineralizada en el mixolimnion, que además ha sido fertilizado con los nutrientes del hipolimnion. Esto permite mantener la biomasa bacteriana de “NPB” en más de 6 g C m⁻², sin depender de la producción primaria contemporánea, que es muy baja en ese período. La demanda de oxígeno disuelto se eleva, mostrando concentraciones mixolimnéticas inferiores a 4 mg l⁻¹. Este proceso de mineralización invernal,

junto con el proceso de mezcla, son responsables de la mayor disponibilidad de nutrientes, principalmente de fósforo, que las Pcy acumulan eficientemente, permitiendo su rápido desarrollo primaveral.

La laguna de La Cruz presenta comunidades estables de bacterias fotosintéticas, principalmente, la bacteria púrpura del azufre (PSB), *Lamprocystis purpurea*, y la bacteria verde del azufre (GSB), *Chlorobium chlatratiforme*. En general, su contribución a la biomasa global integrada de organismos fotosintéticos es relativamente pequeña, entre 1-3% del total de biomasa para *Lamprocystis purpurea* y entorno al 0,1% para *Chlorobium chlatratiforme*. *Lamprocystis purpurea* se desarrolla principalmente, en el monimolimnion durante el período de mezcla invernal y en la interfase óxico-anóxica, justo por debajo de la DCM, y en el hipolimnion superior durante el período de estratificación. *Chlorobium chlatratiforme* se desarrolla, principalmente en primavera, manteniendo poblaciones estables durante el resto del período de estratificación por debajo de *Lamprocystis*. Pese a lo limitado de su contribución a la biomasa global, sus poblaciones se localizan en capas relativamente densas, donde pueden alcanzar tasas netas de asimilación de carbono, en primavera, equiparables a las de la fotosíntesis oxigénica, pero localizadas en capas muy finas.

4.5. Referencias

- Callieri, C., & Piscia, R. (2002). Photosynthetic efficiency and seasonality of autotrophic picoplankton in Lago Maggiore after its recovery. *Freshwater Biology*, 47(5), 941-956.
- Callieri, C., Cronberg, G., & Stockner, J. G. (2012). Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. In *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 229-269). Springer Netherlands.
- Callieri, C., Modenutti, B., Queimalinos, C., Bertoni, R., & Balseiro, E. (2007). Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology*, 41(4), 511-523.
- Camacho, A., Picazo, A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2003). Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. *Algalogical Studies*, 109(1), 171-184.
- Craig, S. R. (1987). The distribution and contribution of picoplankton to deep photosynthetic layers in some meromictic lakes. *Acta Acad. Aboensis*, 47(2), 55-81.
- Crosbie, N. D., Teubner, K., & Weisse, T. (2003). Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 33(1), 53-66.
- Chisholm, S. W., Olson, R. J., Zettler, E. R., Goericke, R., Waterbury, J. B., & Welschmeyer, N. A. (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334, 340-343.
- Gaedke, U., & Weisse, T. (1998). Seasonal and interannual variability of picocyanobacteria in Lake Constance (1987-1997). *Lake Constance: Characterization of an ecosystem in transition*, 53, 143-158.

Capítulo 4

- Hawley, G. R. W., & Whitton, B. A. (1991). Survey of algal picoplankton from lakes in five continents. *Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie. Verhandlungen IVTLAP*, 24(2).
- Jasser, I. (1997). The dynamics and importance of picoplankton in shallow, dystrophic lake in comparison with surface waters of two deep lakes with contrasting trophic status. In *Shallow Lakes' 95* (pp. 87-93). Springer Netherlands.
- Lovell, C. R., & Konopka, A. (1985). Primary and bacterial production in two dimictic Indiana lakes. *Applied and environmental microbiology*, 49(3), 485-491.
- Maeda, H., Kawai, A., & Tilzer, M. M. (1992). The water bloom of cyanobacterial picoplankton in Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia*, 248(2), 93-103.
- Mózes, A., Présing, M., & Vörös, L. (2006). Seasonal dynamics of picocyanobacteria and picoeukaryotes in a large shallow lake (Lake Balaton, Hungary). *International Review of Hydrobiology*, 91(1), 38-50.
- Mózes, A., Présing, M., & Vörös, L. (2006). Seasonal dynamics of picocyanobacteria and picoeukaryotes in a large shallow lake (Lake Balaton, Hungary). *International Review of Hydrobiology*, 91(1), 38-50.
- Ochs, C. A., Cole, J. J., & Likens, G. E. (1995). Population dynamics of bacterioplankton in an oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 17(2), 365-391.
- Padisák, J., Barbosa F. A. R., Koschel R., & Krienitz L. (2003). Deep layer cyanoprokaryota maxima are constitutional features of lakes: examples from temperate and tropical regions. *Arch Hydrobiol Spec Issues Adv Limnol*, 58:175–199.
- Personnic, S., Domaizon, I., Dorigo, U., Berdjeb, L., & Jacquet, S. (2009). Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio-, and picophytoplanktonic abundances in three peri-alpine lakes. *Hydrobiologia*, 627(1), 99-116.

Capítulo 4

- Pick, F. R., & Agbeti, M. (1991). The seasonal dynamics and composition of photosynthetic picoplankton communities in temperate lakes in Ontario, Canada. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 76(4), 565-580.
- Sánchez-Baracaldo, P., Handley, B. A., & Hayes, P. K. (2008). Picocyanobacterial community structure of freshwater lakes and the Baltic Sea revealed by phylogenetic analyses and clade-specific quantitative PCR. *Microbiology*, 154(11), 3347-3357.
- Sime-Ngando, T. (1995). Population dynamics of autotrophic picoplankton in relation to environmental factors in a productive lake. *Aquatic sciences*, 57(2), 91-105.
- Søndergaard, M. (1991). Phototrophic picoplankton in temperate lakes: seasonal abundance and importance along a trophic gradient. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 76(4), 505-522.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. A., Lin, H., Ligon, A. H., & Tavtigian, S. V. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature genetics*, 15(4), 356-362.
- Stockner, J. G., & Shortreed, K. S. (1988). Response of *Anabaena* and *Synechococcus* to manipulation of nitrogen: phosphorus ratios in a lake fertilization experiment. *Limnology and Oceanography*, 33(6), 1348-1361.
- Stockner, J. G., & Shortreed, K. S. (1991). Autotrophic picoplankton: community composition, abundance and distribution across a gradient of oligotrophic British Columbia and Yukon Territory lakes. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 76(4), 581-601.
- Stockner, J. G., & Shortreed, K. S. (1994). Autotrophic picoplankton community dynamics in a pre-alpine lake in British Columbia, Canada. *Hydrobiologia*, 274(1-3), 133-142.

Capítulo 4

Stockner, J., Callieri, C., & Cronberg, G. (2002). Picoplankton and other non-bloom-forming cyanobacteria in lakes. In *The ecology of cyanobacteria* (pp. 195-231). Springer Netherlands.

Vörös, L., Mózes, A., & Somogyi, B. (2009). A five-year study of autotrophic winter picoplankton in Lake Balaton, Hungary. *Aquatic ecology*, 43(3), 727-734.

Weisse, T. (1988). Dynamics of autotrophic picoplankton in Lake Constance. *Journal of Plankton Research*, 10(6), 1179-1188.

Weisse, T. (1993). Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. In *Advances in microbial ecology* (pp. 327-370). Springer US.

Capítulo 5

**Estudio comparado del uso de métodos
espectrofotométricos frente a métodos cromatográficos
para la determinación de pigmentos fotosintéticos. La
Laguna de La Cruz como lago modelo**

5.1. Introducción

Desde los inicios de la investigación en limnología, la correcta cuantificación de los pigmentos fotosintéticos ha sido un tema de gran interés. Durante muchos años, los métodos espectrofotométricos eran los únicos disponibles para realizar esta cuantificación, siendo un aspecto muy importante en la metodología limnológica. A pesar del desarrollo más reciente de técnicas cromatográficas (cromatografía líquida de alta resolución o HPLC) para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos, dada la gran cantidad de información previa, parece aconsejable continuar usando técnicas espectroscópicas, utilizando técnicas cromatográficas para calibrar los resultados obtenidos. Cuestiones relacionadas con la optimización de los métodos para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos se han planteado desde hace mucho tiempo, sobre todo en sistemas marinos y en sistemas no estratificados (Murray et al., 1986; Salinas, 1988; Pinckney et al., 1994; Latasa et al., 1996; Mantoura et al., 1997; Dos Santos et al., 2003; Ritchie, 2008; Jodłowska y Latała, 2011). Sin embargo, hay poca información científica para sistemas fuertemente estratificados que presenten una mezcla compleja de organismos fotosintéticos y, por lo tanto, una gran variedad de pigmentos, tanto en el perfil vertical como en las abundancias relativas estacionales de esos organismos fotosintéticos y sus pigmentos.

Como norma general, los estudios limnológicos utilizan la concentración de clorofila-*a* como análisis para estimar la biomasa de fitoplancton y/o la productividad primaria, en contraste con los más lentos y costosos procedimientos de recuento microscópico. La concentración de clorofila-*a* es, además, un indicador común y fiable de la calidad del agua y del estado trófico, utilizándose de forma rutinaria en la gestión de este tipo de ecosistemas. La discriminación analítica de pigmentos fotosintéticos es de gran valor para dilucidar la composición de las comunidades de fitoplancton, al ser algunos

pigmentos biomarcadores quimiotaxonómicos (Wright y Jeffrey, 2006). En este contexto, la clorofila-*a* es un marcador universal de la abundancia de fitoplancton en sistemas acuáticos, junto a la concentración de clorofila-*b* y -*c* que pueden ser buenos indicadores de la abundancia de grupos de algas específicos, tales como clorofitas o bacillariofitas y crisofitas respectivamente. En consecuencia, los ratios clorofila *b/a* y *c/a* han sido sugeridos como indicadores de la dominancia relativa de estos grupos de algas (MacLulich, 1986). En aguas anóxicas, tales como el hipolimnion anóxico de lagos y embalses estratificados o el monimolimnion de los lagos meromícticos, también es posible evaluar la biomasa y la estructura de las comunidades bacterianas fotosintéticas a través de la cuantificación de los diferentes pigmentos de estos microorganismos, como bacterioclorofilas y carotenos específicos. Además, la concentración total o relativa de los carotenos ha sido utilizada desde hace mucho tiempo para investigar tanto la presencia como el estado fisiológico de las poblaciones fitoplanctónicas, observándose grandes variaciones dependiendo de las condiciones de luz (Jodłowska y Latała, 2011) o la disponibilidad de nutrientes (Shimura y Fujita, 1975). En este contexto, el ratio de caroteno frente a la clorofila-*a* se ha propuesto como una medida de la acumulación de ácidos grasos en microalgas de agua dulce en condiciones de limitación por nitrógeno o de estrés lumínico (Solovchenko et al., 2009). Estas relaciones simples entre los pigmentos pueden ser consideradas como “proxies” del estado fisiológico de las poblaciones fitoplanctónicas, siendo esta metodología práctica, rápida y con resultados equiparables a otros enfoques más complejos y costosos.

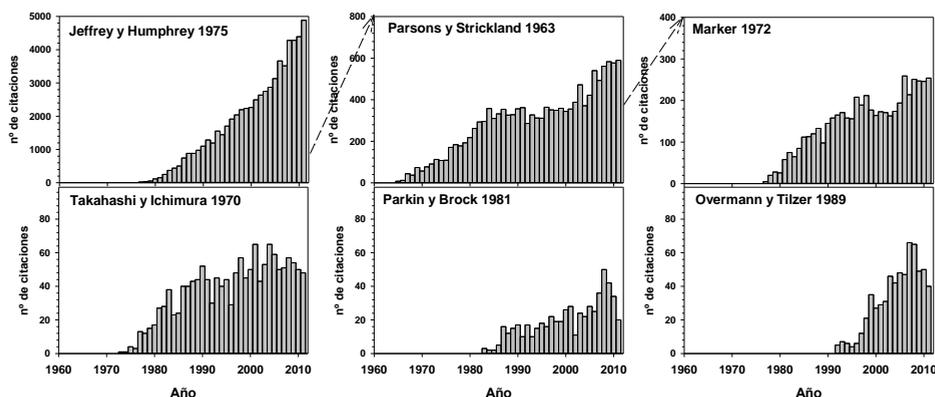


Figura 5.1. Informe de citas, por año de publicación, de los métodos de cálculo más utilizados en la determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos y analizados en este estudio (fuente: ISI-Thomson Reuters, Web of Knowledge). Las ecuaciones de Parsons & Strickland (1963) se citan normalmente refiriendo el manual de análisis de aguas marinas de Strickland & Parsons (1972), por lo que los datos de la cita del artículo de 1963 obtenidos del ISI-WOK estarían subestimando el uso real de estas ecuaciones. Nótese las diferentes escalas para el número de citas.

Los métodos espectrofotométricos para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos en muestras que contienen pigmentos de diferentes grupos fitoplanctónicos, se basan en mediciones de absorbancia en extractos de solventes orgánicos. En este caso, los pigmentos se pueden extraer del interior de las células por medio de diferentes solventes orgánicos, tales como acetona, metanol, etanol, éter dietílico, sulfóxido de dimetilo (DMSO) o dimetilformamida (DMF). La acetona es, probablemente, el solvente más utilizado (Ritchie, 2006) ya que produce picos de absorción más nítidos en comparación con otros solventes, como contrapartida es más volátil e inflamable que otros. La acetona también se considera menos eficiente en la extracción de los pigmentos del interior celular en comparación con otros solventes (Ritchie, 2006). Sin embargo, la metodología de extracción se puede mejorar de distintas maneras como, por ejemplo, con el uso de la sonicación (Schagerl y Künzl, 2007).

Capítulo 5

Los métodos utilizados para la cuantificación de pigmentos varían en precisión, sensibilidad y coste. La cuantificación por HPLC permite la discriminación de las diferentes formas de la clorofila, de los carotenos y de los derivados de ambos (Mantoura y Llewellyn, 1983). La metodología de HPLC mejora considerablemente el límite de detección en comparación con otros métodos, en contrapartida requiere el uso de instrumentos caros, la necesidad de conocimientos técnicos sobre estos equipos y el tratamiento de datos superior a otros métodos. En general, la cuantificación espectrofotométrica directa es, hoy en día, más asequible y más ampliamente utilizada (figura 5.1) pese a lo limitado de su información. Un protocolo de HPLC estándar para la determinación de pigmentos fotosintéticos ya ha sido recopilado en la 21ª edición del “Estandar Methods” APHA (2005). Sin embargo, organismos de gestión responsables del control de la calidad del agua como, por ejemplo, la EPA de los EE.UU en su método 447.0 (Arar, 1997), aún recomiendan métodos espectrofotométricos, por ejemplo, el de Jeffrey y Humphrey (1975). La cuantificación espectrofotométrica de una mezcla de pigmentos fotosintéticos requiere el uso de ecuaciones que utilizan coeficientes de extinción molar específicos para cada pigmento (tabla 5.1). Estas ecuaciones pueden utilizar sólo un coeficiente de extinción (ecuaciones monocromáticas) o incluir varios coeficientes para reducir al mínimo la interferencia producida por la superposición de los espectros de absorción entre diferentes pigmentos (ecuaciones tricromáticas). Es muy común que se produzcan resultados diferentes dependiendo de la ecuación utilizada para unos mismos espectros de absorción (Mantoura et al., 1997). Esto implica la necesidad de especificar muy claramente, para cada análisis, el tipo de ecuación usada, aunque en general es difícil justificar el uso de unas u otras.

Capítulo 5

Tabla 5.1. Ecuaciones más usadas para la determinación espectrofotométrica de los pigmentos fotosintéticos testados en este estudio. v: Volumen de acetona añadido para la extracción; V: Volumen total de agua filtrada para la extracción. TC: Número total de citas; ACI: Media de citas por ítem; SPU: Unidades de pigmentos específicos.

Monocromáticas				TC	ACI
Marker 1972	Clor-a	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$13.14 \cdot \text{DO665}^*(\text{vV})$	5359	21.18
Dicromáticas (Clor- a - Bclor-d)					
Parkin y Brock 1981	Clor-a	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$11.9 \cdot \text{DO663}^*((\text{DO663}/\text{DO654} \cdot 0.93) - 0.33)^*(\text{vV})$	593	21.18
	Bclor-d	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$10.2 \cdot \text{D654}*((\text{DO663}/\text{DO654} \cdot (-0.99) + 1.55)^*(\text{vV}))$		
Overmann y Tilzer 1989	Clor-a	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$(1.315 \cdot \text{DO663} - 0.643 \cdot \text{DO651} + 0.005) \cdot \text{v} \cdot 10^3 / (\text{V} \cdot \text{d} \cdot 84)$	684	23.59
	Bclor-d+e	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$(1.315 \cdot \text{DO651} - 0.643 \cdot \text{DO663} + 0.005) \cdot \text{v} \cdot 10^3 / (\text{V} \cdot \text{d} \cdot 98)$		
Tricromáticas					
Strickland y Parsons 1972	Clor-a	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$11.6 \cdot \text{DO665} - 1.3 \cdot \text{DO645} - 0.14 \cdot \text{DO630}^*(\text{vV})$	13441	34.91
	Clor-b	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$20.7 \cdot \text{DO645} - 4.34 \cdot \text{DO665} - 4.42 \cdot \text{DO630}^*(\text{vV})$		
	Clor-c	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$55 \cdot \text{DO630} - 4.64 \cdot \text{DO665} - 16.3 \cdot \text{DO645}^*(\text{vV})$		
Jeffrey y Humphrey 1975	Clor-a	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$11.85 \cdot \text{DO664} - 1.54 \cdot \text{DO647} - 0.08 \cdot \text{DO630}^*(\text{vV})$	66647	29.53
	Clor-b	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$-5.47 \cdot \text{DO664} + 21.03 \cdot \text{DO647} - 2.66 \cdot \text{DO630}^*(\text{vV})$		
	Clor-c	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$-1.67 \cdot \text{DO664} - 7.60 \cdot \text{DO647} + 24.52 \cdot \text{DO630}^*(\text{vV})$		
Bacterioclorofilas					
Takahashi y Ichimura 1970	Bclor-a	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$25.2 \cdot \text{DO772}^*(\text{vV})$	1489	21.58
	Bclor-c	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$10.8 \cdot \text{DO662}^*(\text{vV})$		
	Bclor-d	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$10.2 \cdot \text{DO654}^*(\text{vV})$		
	Bclor-e	($\mu\text{g l}^{-1}$)	$10.2 \cdot \text{DO652}^*(\text{vV})$		
Carotenos					
Strickland y Parsons 1972	Carotenos	($\mu\text{PSU l}^{-1}$)	$4 \cdot \text{DO480}^*(\text{vV})$	---	---
Índice 430/665	Car/clor-a ratio	---	$\text{DO430}/\text{DO665}$	---	---
Índice 480/665	Car/clor-a ratio	---	$\text{DO480}/\text{DO665}$	---	---

Los lagos y embalses que presentan interfases óxicas-anóxica y fuerte estratificación, pueden soportar densas comunidades de fitoplancton cuya abundancia y composición en pigmentos fotosintéticos puede variar notablemente (Steenbergen y Korthals, 1982). Además, la distribución espacial de los diferentes grupos de fitoplancton generalmente se superponen en el perfil vertical de la columna de agua (Miracle et al., 1992; Camacho et al., 2001). En aguas más profundas, la anoxia y la disponibilidad de luz puede permitir el desarrollo de densas poblaciones de bacterias fotosintéticas (Takahashi y Ichimura, 1970), coexistiendo con fitoplancton epilimnético senescente y

Capítulo 5

poblaciones de picocianobacterias unicelulares, formando máximos de clorofila profundo. Todos estos factores aumentan la complejidad en la composición de pigmentos fotosintéticos de las muestras de estos sistemas acuáticos, intensificando así la anteriormente mencionada imprecisión de las ecuaciones espectrofotométricas (Stal et al., 1984).

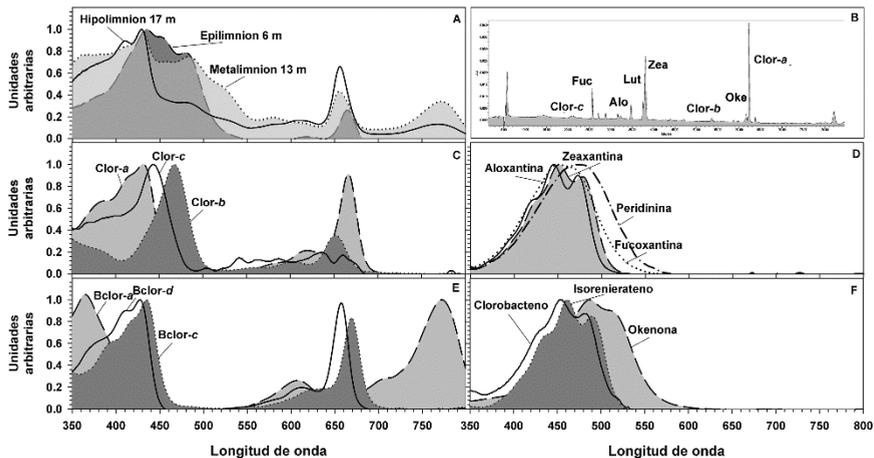


Figura 5.2. A) Espectros de absorción espectrofotométricos de los pigmentos extraídos a diferentes profundidades (epilimnion, metalimnion e hipolimnion) en la Laguna de La Cruz, junio 2006. B) Perfiles por cromatografía líquida (HPLC) de una muestra de aguas metalimnéticas de la Laguna de La Cruz, junio 2006. C y D) Espectros de absorción individuales de los pigmentos fotosintéticos más abundantes en las aguas óxicas de la Laguna de La Cruz. E y F) Espectros de absorción individuales de los pigmentos fotosintéticos más abundantes en las aguas anóxicas de la Laguna de La Cruz. Todos los datos de los espectros individuales provienen de los perfiles de HPLC, en muestras de junio de 2006.

La precisión en la estimación y la idoneidad de las ecuaciones espectrofotométricas en los sistemas acuáticos estratificados son el principal objetivo de este estudio. Se contrastan los resultados obtenidos con las

ecuaciones espectrofotométricas con cuantificaciones patroneadas y, a priori, más fiables, realizadas por cromatografía (HPLC). El estudio se realizó con muestras de la Laguna meromítica de La Cruz, situada en el centro de España, que presenta múltiples combinaciones de microorganismos y pigmentos fotosintéticos en superposición, dentro de sus diferentes gradientes verticales. De los resultados de este análisis, se proporcionan recomendaciones que sería importante tener en cuenta antes de emprender estudios limnológicos en este tipo de sistemas acuáticos fuertemente estratificados, en un intento de establecer las ventajas y desventajas al utilizar este tipo de ecuaciones espectrofotométricas. En este sentido, el presente capítulo tiene como objetivo facilitar la selección de métodos espectrofotométricos simples en sistemas acuáticos estratificados cuando la aplicación de procedimientos más costosos tales como HPLC no es adecuado, sobre todo, al considerar que los métodos espectrofotométricos son el medio más común de obtener este tipo de datos limnológicos clave.

5.2. Resultados

Durante el período estudiado, las concentraciones de todos los pigmentos fotosintéticos analizados mostraron una gran variabilidad (figura 5.3). Para toda la columna de agua, la concentración de clorofila-*a* varió entre 0,5-85 $\mu\text{g l}^{-1}$. Los derivados de este pigmento (principalmente clorofilida y feofitina) representan entre un 3 y un 60% del total de la concentración de clorofila-*a*, con grandes variaciones tanto en el perfil vertical como en su dinámica estacional. Se han observado concentraciones por debajo del límite de detección del método espectrofotométrico (0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$) en el 89% de las muestras para la clorofila-*b* y en el 61% para la clorofila-*c*. Las concentraciones más altas de chlorophyll-*b* y -*c* fueron de 3,2 y 15,7 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente.

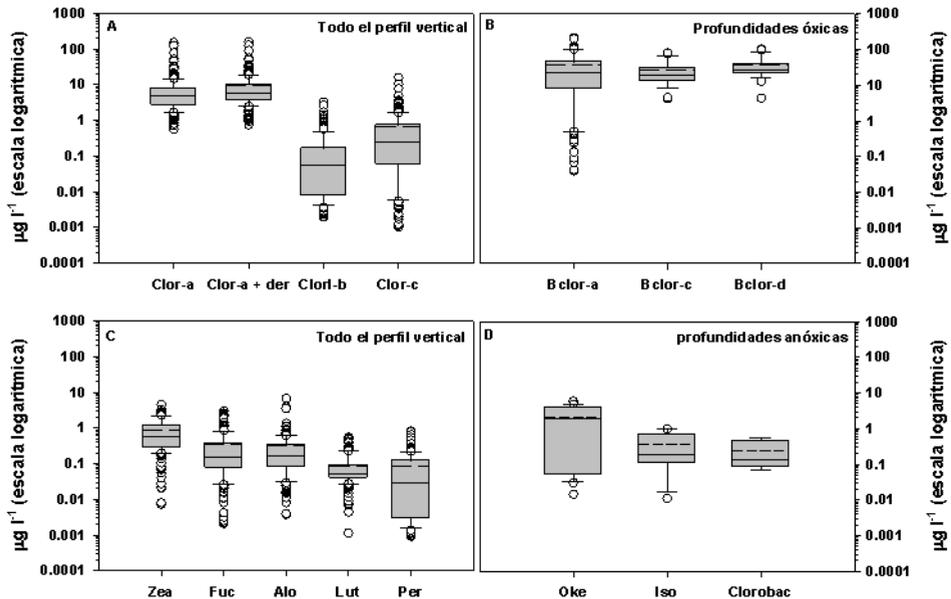


Figura 5.3. Diagrama de cajas de la distribución (logaritmo de la concentración: $\mu\text{g l}^{-1}$) de los pigmentos fotosintéticos más abundantes encontrados en la Laguna de La Cruz. Se muestran los datos estadísticos en bruto usados en el presente estudio. A) Clorofila-*a* y derivados, Clorofila-*b* y -*c* de todo el perfil vertical. B) Bacterioclorofilas-*a*, *c* y *d* en muestras de aguas anóxicas. C) Principales carotenos de algas y cianobacterias en todas las muestras (Zea: Zeaxantina, Fuc: Fucoxantina, Alo: Alloxantina, Lut: Luteína, Per: Peridina). D) Principales carotenos bacterianos en muestras de aguas anóxicas (Oke: Okenona, Iso: Isorrenierateno, Chloro: Chlorobacteno).

En las capas anóxicas, la concentración de bacterioclorofila también varió ampliamente, con un promedio de $20 \mu\text{g l}^{-1}$ y valores máximos de aproximadamente $200 \mu\text{g l}^{-1}$ en un estrato relativamente fino, justo bajo el máximo profundo de clorofila (DCM). En la figura 5.3C se observan los carotenos más abundantes observados en el lago, más de 15 carotenoides diferentes fueron recuperados en el análisis cromatográfico para el lago de La

Capítulo 5

Cruz. Los carotenos más relevantes para la identificación de clorofitas fueron la zeaxantina, la luteína, la violaxantina y la antheroxanthin. Otros carotenoides relevantes fueron: zeaxantina y myxoxanthophyll para la identificación de cianobacterias; alloxanthin para la identificación de criptofitas; y, por último, fucoxantina y diatoxanthin para la identificación de bacillariofitas. Carotenoides comunes y sin criterio taxonómico, como el β -caroteno, también se observaron regularmente en las muestras. Entre los carotenos bacterianos, la okenona fue el más abundante. Este caroteno es característico de algunas bacterias púrpuras del azufre (PSB), como *Lamprocystis purpurea* que es la especie de bacteria fotosintética dominante en la Laguna de La Cruz. También se observaron en las muestras carotenos de bacterias verdes del azufre (GSB), como el isorrenierateno y clorobacteno.

Las relaciones entre las concentraciones de clorofila-*a* medidas usando HPLC y las estimaciones realizadas con las diferentes ecuaciones espectrofotométricas analizadas se muestran en la figura 5.4 y en la tabla 5.2. Los datos de HPLC se expresan como la concentración total de clorofila-*a* nativa, en la figura 5.4 columna izquierda, y como la concentración de la suma de sus formas derivadas y nativa, en la figura 5.4 columna derecha. Estas formas derivadas fueron principalmente clorofilida-*a* y feofitina-*a*, aunque relativamente pequeñas concentraciones de feofórbidos también fueron detectadas y tenidas en cuenta. Se encontraron diferencias importantes en los resultados de las ecuaciones estudiadas en relación a la profundidad del lago. Esto implica un importante componente de la variabilidad espacial en la columna de agua, comportándose estas ecuaciones de manera diferente dependiendo de si las muestras son de origen óxico o anóxico. Las correlaciones entre las determinaciones espectrofotométricas de clorofila-*a* (formas nativas más derivados) y las mediciones realizadas por HPLC (tabla 5.2) para todos los datos del perfil vertical (muestras óxicas y anóxicas), mostraron que las ecuaciones

Capítulo 5

monocromáticas y tricromáticas (Marker, 1972; Strickland y Parsons, 1972; Jeffrey y Humphrey, 1975), aunque se correlacionan significativamente, presentan valores relativamente bajos de coeficiente de Pearson y errores relativamente altos (aproximadamente del 25%). También se observa que las pendientes subestiman fuertemente la concentración de clorofila-*a* con respecto a los resultados obtenidos por HPLC, cuando fueron consideradas conjuntamente todas las muestras. Las ecuaciones espectrofotométricas con corrección para la bacterioclorofila (Parkin y Brock, 1981; Overmann y Tilzer, 1989) mostraron mejores correlaciones (valores más altos de coeficiente de Pearson). Sin embargo, la ecuación de Parkin y Brock (1981) tenía un error similar al de las ecuaciones monocromáticas y tricromáticas pero, en este caso, sobreestimando la concentración de clorofila-*a* (pendiente 1,235). En general, la ecuación cuyas predicciones se adaptaron mejor a todos los escenarios revisados, fue la dada por Overmann y Tilzer (1989), que muestra un error bajo (1,9%) y una desviación también muy baja respecto a los valores estimados por cromatografía (pendiente 1,019).

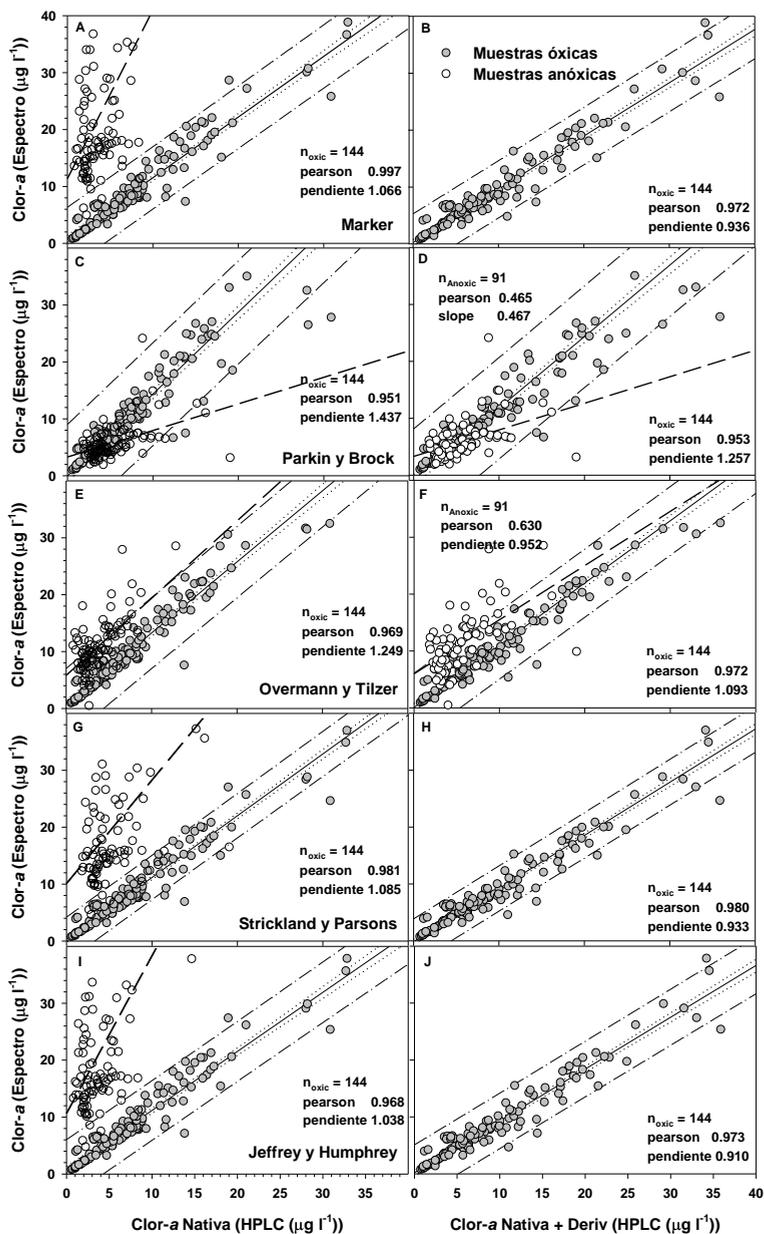


Figura 5.4. Relación entre las concentraciones de clorofila-*a* ($\mu\text{g l}^{-1}$) obtenidas mediante las diferentes ecuaciones espectrofotométricas estudiadas, respecto a las obtenidas por HPLC. En la columna de la izquierda (A, C, E, G, e I) se muestran las correlaciones entre las concentraciones estimadas por las ecuaciones espectrofotométricas y la concentración de clorofila-*a* nativa medida por HPLC

Capítulo 5

(sumando su alómero y epímero). En la columna derecha (B, D, F, H, y J) se muestran las correlaciones entre las concentraciones estimadas por ecuaciones espectrofotométricas y la concentración total de clorofila-*a* medida por HPLC (sumando a la nativa los pigmentos derivados como clorofilida-*a*, feofitina-*a* y feoforbido-*a*). Las muestras anóxicas han sido excluidas para las ecuaciones sin corrección para bacterioclorofilas, y mantenidas sólo para Parkin y Brock (1981) y Overmann y Tilzer (1989). Línea continua: correlación de las muestras óxicas. Línea de puntos: intervalos de confianza. Línea de rayas y puntos: intervalo de predicción. Línea de rayas: correlación de las muestras de anoxia.

Para las muestras de las profundidades óxicas, en general, todas las ecuaciones espectrofotométricas sobreestimaron la concentración de clorofila-*a* con respecto a los valores de clorofila-*a* nativa (figura 5.4 A, C, E, G, I) medidos por HPLC. Sin embargo, cuando se consideran todas las formas derivadas, todas las ecuaciones, tanto las monocromáticas como las tricromáticas (Marker, 1972; Strickland y Parsons 1972; Jeffrey y Humphrey, 1975) subestimaron la concentración de clorofila-*a* (más derivados) (figura 5.4 B, H, J). Dado que las ecuaciones espectrofotométricas incluyen la determinación de todas las formas (nativa más derivados), la tabla 5.2 sintetiza los resultados de la aplicación de las diferentes ecuaciones, y se realizó considerando las correlaciones de determinaciones espectrofotométricas con las concentraciones de HPLC de las formas nativas más los derivados de la clorofila-*a*. En cuanto a las ecuaciones para la determinación de la concentración de clorofila-*a* con correcciones por la presencia de bacterioclorofila-*d* ($d + e$), se observó que la ecuación de Parkin y Brock (1981) presenta un error relativamente alto (25,7%), sobreestimando la concentración de clorofila-*a*. Aunque para muestras óxicas todos las ecuaciones, a excepción de la de Parkin y Brock, producen errores relativamente bajos (por debajo del 10%), los mejores valores fueron proporcionados por la ecuación de Overmann y Tilzer (1989), con un error de un 5,6%, mientras que la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975), que es mucho más utilizada, presenta un error de un 9,0%.

Tabla 5.2. Resumen de los datos estadísticos (coeficiente de correlación de Pearson, pendiente y % de error) de las correlaciones entre las diferentes ecuaciones espectrofotométricas probadas y las determinaciones por HPLC para todas las muestras, así como para las muestras óxicas y anóxicas por separado. Se muestran en negrita, para la aplicación de distintas ecuaciones, aquellas que presentan una menor discrepancia con la determinación por HPLC (% error), siendo, en consecuencia, las más recomendables para el caso particular. El % de error toma valores negativos cuando se produce una subestimación por parte de las determinaciones espectrofotométricas en comparación con las medidas por HPLC, mientras que toma valores positivos cuando se da una sobreestimación. Las correlaciones se refieren a todas las formas de cada pigmento (p.ej. concentraciones de clorofila-*a* y sus derivados en el caso de la clorofila-*a*).

Estrato	n	Pigmento	Marker 1972		Jeffrey y Humphrey 1975		Strickland y Parsons 1972		Parkin y Bock 1981		Overmann y Tlizer 1989		Takahashi y Ichimura 1970						
			pearson	pendiente	% error	pearson	pendiente	% error	pearson	pendiente	% error	pearson	pendiente	% error	pearson	pendiente	% error		
Total	235	Clor-a	0.462	0.736	-26.4	0.486	0.724	-27.6	0.516	0.754	-24.6	0.946	1.235	23.5	0.924	1.019	1.9		
	235	Clor-b				-0.217	-18.4	-1935.4	-0.214	-12.9	-1391.0								
	235	Clor-c				0.081	0.019	-98.1	0.081	0.043	-95.7								
	118	Carotenoids						0.243	1.492	49.2									
Óxicas	144	Clor-a	0.972	0.936	-6.4	0.973	0.910	-9.0	0.980	0.933	-6.7	0.954	1.257	25.7	0.972	0.944	-5.6		
	144	Clor-b				0.324	0.875	-12.5	0.377	0.632	-36.8								
	144	Clor-c				0.655	0.362	-63.8	0.689	0.834	-16.6								
	93	Carotenos						0.919	1.620	62.0									
Anóxicas	91	Clor-a	0.447	2.963	196.3	0.455	2.772	177.2	0.459	2.557	155.7	0.465	0.467	-53.3	0.630	0.952	-4.8		
	91	Clor-b				--	--	--	--	--	--								
	91	Clor-c				--	--	--	--	--	--								
	91	bclor-a														0.987	1.090	9.0	
	25	bchl-d									0.985	1.124	12.4	0.949	0.440	-56.0	0.983	1.102	10.2
	25	bchl-c														0.979	0.774	-22.6	
	25	Carotenos						0.970	3.224	222.4									

Capítulo 5

En cuanto a las muestras de profundidades de anoxia, no se encontró correlación significativa para las ecuaciones monocromáticas y tricromáticas que no incluían la corrección respecto a la bacterioclorofila-*d* en el cálculo de la concentración de clorofila-*a* (línea discontinua en las figura 5.4 A, C, E, G, I), mostrando además errores relativamente altos (tabla 5.2). Esas ecuaciones son, por lo tanto, inadecuadas para la determinación de la clorofila-*a* en aguas de profundidades anóxicas y que presentan poblaciones de bacterias fotosintéticas verdes del azufre. Respecto a las ecuaciones con corrección de bacterioclorofila-*d* (figura 5.4 D, F), la ecuación de Parkin y Brock (1981) muestra una baja correlación de Pearson (0,465), una baja pendiente (0,467) y un error muy alto (53 %), presentando una fuerte subestimación de los valores de clorofila-*a* con respecto a los valores obtenidos por HPLC. De nuevo, la ecuación de Overmann y Tilzer (1989) mostró la mejor correlación (0,630), con una pendiente próxima a uno (0,952) y un error relativante bajo (4,8%).

La figura 5.5 presenta la relación entre los dos métodos de análisis pero, en este caso, para la medición de la clorofila-*b* y -*c*, usándose las ecuaciones tricromáticas de Strickland y Parsons (1972) y las de Jeffrey y Humphrey (1975). Al igual que ocurre con las estimaciones de concentración de clorofila-*a*, las ecuaciones tricromáticas se muestran inadecuadas para estimar con precisión las concentraciones de estos pigmentos en los estratos anóxicos de la laguna, donde estos pigmentos probablemente pertenecen a algas en proceso de sedimentación. Cuando se consideraron conjuntamente todas las muestras óxicas y anóxicas (figura 5.5, gráficas de la izquierda y tabla 5.2), de nuevo no se observó correlación entre las medidas espectrofotométricas y las realizadas por HPLC. Incluso cuando se consideran sólo las muestras óxicas (figura 5.5, gráficas de la derecha y tabla 5.2), la precisión en las determinaciones espectrofotométricas fue muy baja, aunque hay que tener en cuenta que las concentraciones de estos pigmentos en la laguna también fueron muy bajas.

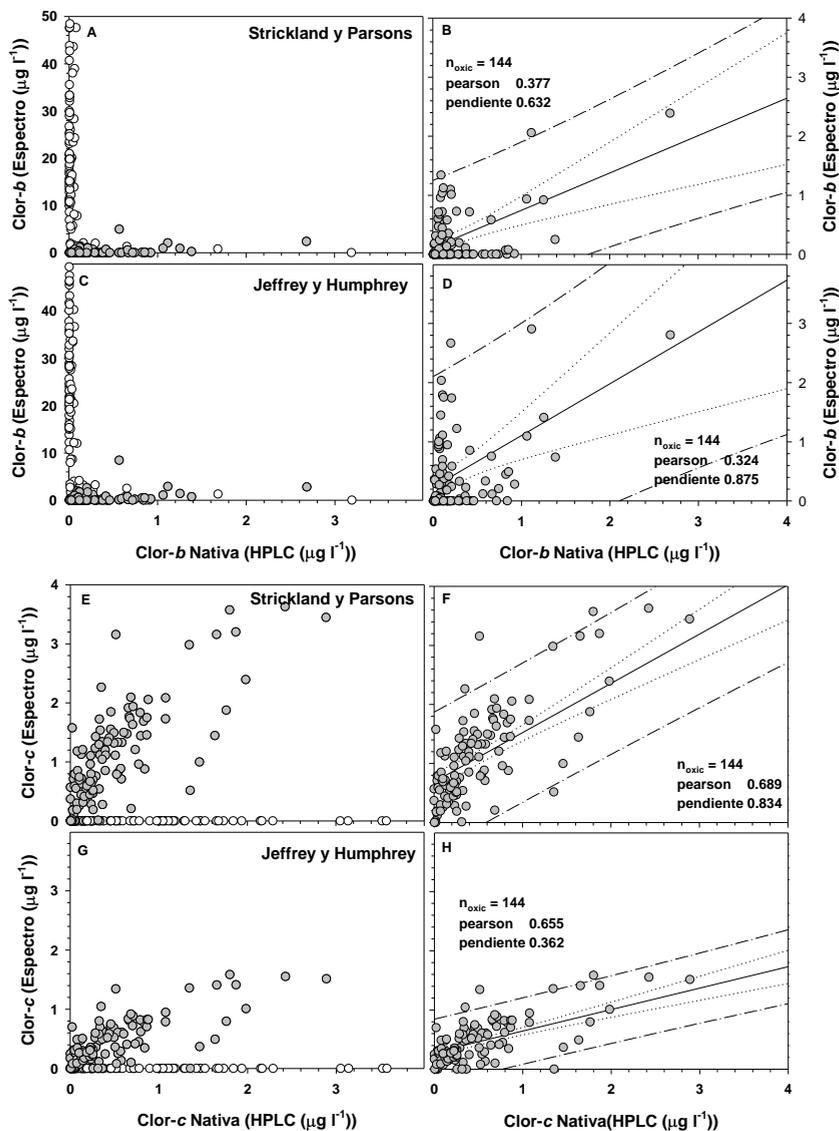


Figura 5.5. A-D) Relación entre las concentraciones ($\mu\text{g l}^{-1}$) de clorofila-*b* obtenidas mediante las ecuaciones espectrofotométricas de Strickland & Parsons (A y B) y Jeffrey

Capítulo 5

& Humphrey (C y D) respecto a las obtenidas por HPLC. E-H) Relación entre las concentraciones ($\mu\text{g l}^{-1}$) de clorofila-*c* obtenidas mediante las ecuaciones espectrofotométricas de Strickland & Parsons (E y F) y Jeffrey & Humphrey (G y H) respecto a las obtenidas por HPLC. Nótese el cambio de escala para las figuras de la clorofila-*b*, A-B, respecto a las C-D. Línea continua: correlación de las muestras óxicas; línea de puntos: intervalos de confianza; línea de rayas y puntos: intervalo de predicción. Cuando se incluyeron todas las muestras, óxicas y anóxicas (gráficas de la izquierda) no se encontró ninguna correlación, en las gráficas de la derecha se incluyeron sólo las muestras óxicas.

En cuanto a la estimación de la concentración de las diferentes bacterioclorofilas presentes en la laguna (figura 5.6), Takahashi y Ichimura (1970) proporcionaron una ecuación para el cálculo de concentración de bacterioclorofila-*a* que se ajusta bien a las determinaciones realizadas por HPLC, con un coeficiente de correlación alto. Esta alta correlación se ve favorecida por el alto número de muestras, en comparación con el relativamente bajo número de muestras para el cálculo de otras bacterioclorofilas. Las ecuaciones de Takahasi y Ichimura (1970) son las más ampliamente utilizadas para estimar pigmentos fotosintéticos de origen bacteriano, estas ecuaciones sobrestiman ligeramente, tanto la concentración de bacterioclorofila-*a* como la concentración de bacterioclorofila-*d* en aproximadamente un 10%, mientras que la concentración de bacterioclorofila-*c* presenta una subestimación de aproximadamente un 23%. Una menor precisión se observó para el cálculo de la concentración de bacterioclorofila-*d* con la ecuación de Parkin y Brock (1981), que sobreestimó la concentración de este pigmento en un 12%. Por el contrario, la ecuación de Overmann y Tilzer (1989) subestimó la concentración de bacterioclorofila-*d* en más de un 50%.

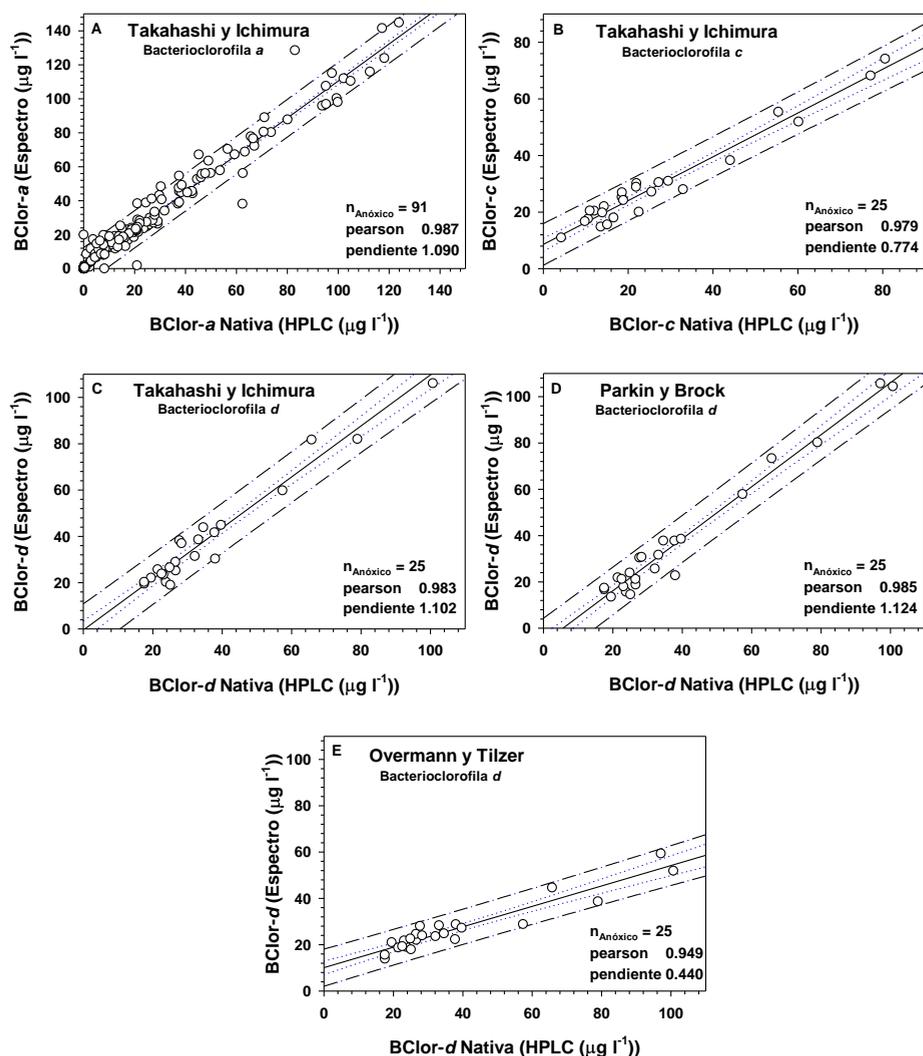


Figura 5.6. Incluye sólo muestras anóxicas. A) Relación entre las concentraciones de bacterioclorofila-a ($\mu\text{g l}^{-1}$) obtenidas mediante la ecuación espectrofotométrica de Takahashi & Ichimura respecto a las obtenidas por HPLC. B) Relación entre las concentraciones de bacterioclorofila-c ($\mu\text{g l}^{-1}$) obtenidas mediante la ecuación espectrofotométrica de Takahashi & Ichimura respecto a las obtenidas por HPLC. C-D-E) Relación entre las concentraciones de bacterioclorofila-d ($\mu\text{g l}^{-1}$) obtenidas mediante las ecuaciones espectrofotométricas de Takahashi & Ichimura (C) Parkin & Brock (D) y Overmann & Tilzer (E) respecto a las obtenidas por HPLC. Línea continua: correlación

Capítulo 5

de las muestras anóxicas. Línea de puntos: intervalos de confianza; línea de rayas y puntos: intervalo de predicción.

La comparación entre las cuantificaciones de carotenos realizados en extractos no purificados, utilizando las ecuaciones de Strickland y Parsons (1972), respecto a las determinaciones realizadas por HPLC, se muestra en la figura 5.7.

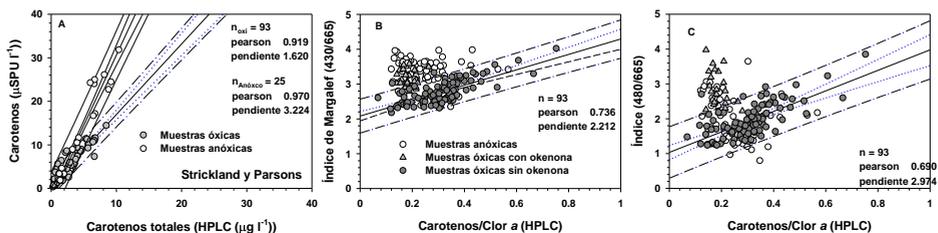


Figura 5.7. Relación entre los diferentes índices de carotenos obtenidos por espectrofotometría (unidades relativas o de absorbancia) y las concentraciones de carotenos ($\mu\text{g l}^{-1}$) medidas por HPLC. A) Correlación entre la estimación de la abundancia de carotenos estimada mediante la ecuación de Strickland & Parsons (1972) y la concentración total de carotenos ($\mu\text{g l}^{-1}$) medida por HPLC para las muestras óxicas y anóxicas. B) Correlación, para las muestras óxicas que no presentan okenona, entre el índice de absorbancia 430/665 y el ratio entre las concentraciones de carotenos algales respecto a las concentraciones de clorofila-*a* total (nativa más derivados) medidas por HPLC. C) Correlación, para las muestras óxicas que no presentan okenona, entre el índice de absorbancia 480/665 y el ratio entre las concentraciones de carotenos algales respecto a las concentraciones de clorofila-*a* total medidas por HPLC. Línea continua: en el gráfico A corresponde a las muestras óxicas y, por separado, a las muestras anóxicas, mientras que en los gráficos B y C corresponde sólo a las muestras óxicas que no presentan okenona; línea de puntos: intervalos de confianza; línea de rayas y puntos: intervalo de predicción.

Tanto las cuantificaciones directas como los ratios de absorbancia fueron sensibles al origen de las muestras, bien de profundidades óxicas o profundidades anóxicas. Si bien se observó una correlación estadísticamente significativa en la comparación de los carotenos totales medidos mediante la ecuación de Strickland y Parsons (1972) respecto a las medidas obtenidas por

HPLC, las diferentes pendientes observadas, de 1,62 para las capas óxicas y 3,22 para las capas anóxicas, indican que la respuesta de la ecuación de Strickland y Parsons es diferente cuando hay presencia de carotenos bacterianos. Esto indica que estas ecuaciones no son adecuadas para ser utilizadas indistintamente para muestras óxicas y anóxicas. Por otro lado, las dos relaciones de absorbancia de doble longitud de onda (430/665 y 480/665 según Margalef, 1983) mostraron moderadamente buenas correlaciones para las muestras epilimnéticas, mientras que para las muestras metalimnéticas e hipolimnéticas (que incluyen el caroteno bacteriano okenona) no se observaron correlaciones significativas en los ratios caroteno/clorofila-*a* estimados a partir de las medidas de HPLC.

5.3. Discusión

Aunque los análisis para determinación de pigmentos fotosintéticos realizados por HPLC permiten la discriminación cuantitativa de pigmentos y proporcionan una mayor precisión en la caracterización en comparación con los métodos espectrofotométricos (Wright y Jeffrey, 2006), presentan el principal inconveniente de ser más caros, lentos y requerir un equipo más especializado. Es por eso que, para muchas aplicaciones, las medidas espectrofotométricas directas pueden ofrecer unos resultados lo suficientemente correctos como para no necesitar métodos más costosos. Nuestro examen de las obras citadas en el Thomson Reuters (antiguo ISI) “Web of Knowledge” revela que, en la actualidad, las ecuaciones espectrofotométricas aún se utilizan en muchos artículos de investigación (figura 5.1). El número de citas sigue aumentando continuamente para alguna de estas ecuaciones, como las propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975), así como las de Strickland y Parsons (1972), a mediados de la década de 1970. Este uso en la actualidad de ecuaciones espectrofotométricas

puede estar justificado por la sencillez y bajo coste. Sin embargo, las imprecisiones inherentes de este tipo de ecuaciones requieren cuidado al aplicar las diferentes fórmulas y a la hora de interpretar los resultados, sobre todo, cuando en el estudio que se realiza hay mezclas complejas de pigmentos fotosintéticos como, por ejemplo, en sistemas acuáticos estratificados. Varios estudios, entre los que se encuentra la presente tesis, demuestran que la validez de algunas de estas ecuaciones depende del origen de la muestra y de la presencia o ausencia de ciertas formas o derivados de los pigmentos, pudiendo variar significativamente la precisión e incluso la validez de las determinaciones. Por ejemplo, las características de absorción de los derivados de la clorofila-*a* pueden introducir un sesgo significativo en la cuantificación de la concentración de clorofila-*a* nativa (Salinas, 1988; Rowan, 1989; Jacobsen y Rai, 1990; Pinckney et al., 1994; Ritchie, 2008). Para explorar esta cuestión, se compararon las correlaciones lineales de las cuantificaciones obtenidas, considerando y sin considerar la presencia de estos derivados de la clorofila-*a*. Cuando los derivados de la clorofila-*a* fueron excluidos en la determinación por HPLC (figura 5.4 A, C, E, G, e D), todas las ecuaciones sobreestimaron la concentración de clorofila-*a* nativa. Esto se debe a que estas ecuaciones suman los derivados a la absorbancia, aunque la sobreestimación fue generalmente menor de un 10%. Sin embargo, al tener en cuenta las formas derivadas en las cuantificaciones realizadas por HPLC, todas las ecuaciones que no eran dicromáticas, es decir, todas menos la de Parkin y Brock (1981) y la de Overmann y Tilzer (1989), subestimaron las mediciones realizadas por HPLC. En estudios anteriores, se ha sugerido que el uso de métodos espectrofotométricos puede ser aceptable para la determinación de la concentración de clorofila-*a* si las formas degradadas de este pigmento representan menos del 5% del total (Jodłowska y Latała, 2011). El error de nuestras estimaciones era comúnmente menor de 10% (figura 5.4), lo que

podría explicarse por la presencia de estos derivados, excepto para el caso de la ecuación de Parkin y Brock que, constantemente, y en gran medida sobreestima la concentración de clorofila-*a*.

Existen otras ecuaciones espectrofotométricas que no han sido evaluadas en este estudio. Estas ecuaciones permiten la corrección de la concentración de clorofila-*a* respecto a sus derivados de degradación a través de una etapa previa de acidificación (Lorenzen, 1967), transformándose la clorofila-*a* nativa en feofitina-*a*. La clorofilida-*a* es un derivado de la clorofila-*a* que se produce como resultado de la pérdida de la cadena de fitol. Es una forma de degradación común, su presencia se ha asociado con la senescencia celular debido a la actividad enzimática de las clorofilasas (Louda et al., 1998, 2002) y/o por el paso a través del tracto digestivo como resultado de la depredación (Barlow et al., 1988). En la Laguna de La Cruz, altas concentraciones de este pigmento se asocian generalmente al máximo profundo de clorofila metalimnético, aunque se puede encontrar en todo el perfil vertical, invalidando el uso de métodos de acidificación. Esta invalidez se debe a que la presencia de altas cantidades de clorofilida-*a* en los extractos modifica la validez de las ecuaciones que presuponen como derivado la feofitina-*a*, incluso después de la acidificación (Plante-Cuny et al., 1993). Por esa razón, no evaluamos esos métodos.

En los sistemas acuáticos fuertemente estratificados, se produce una interferencia adicional en la cuantificación de clorofila-*a* debida al solapamiento espectral con algunos tipos de bacterioclorofila. Las bacterioclorofilas se producen principalmente en las profundidades anóxicas y microaeróbicas, donde las bacterias fotosintéticas del azufre pueden desarrollarse. Esto explicaría por qué ni la ecuación monocromática (Marker, 1972) ni la tricromática (Strickland y Parsons, 1972; Jeffrey y Humphrey, 1975) produjeron buenas estimaciones de la concentración de clorofila-*a* en las capas anóxicas de

la laguna. A principios de los 80, Parkin y Brock (1981) propusieron una ecuación dicromática para estimar las concentraciones de clorofila-*a* en presencia de bacterioclorofila-*d*, que es la principal fuente de interferencia para las estimaciones de concentración de clorofila-*a*. Desde entonces, esta ecuación se ha utilizado ampliamente en diferentes sistemas acuáticos. La efectividad de esta ecuación fue posteriormente cuestionada por Overmann y Tilzer (1989), quienes propusieron una ecuación diferente. En nuestro estudio, la ecuación de Parkin y Brock (1981) no estimó con la precisión esperada la concentración de clorofila-*a* en presencia de bacterioclorofila-*d*, por lo que no se recomienda su uso cuando este pigmento está presente. La ecuación desarrollada por Overmann y Tilzer (1989) ofreció, sin embargo, los mejores resultados en la estimación de la concentración de clorofila-*a*, independientemente del origen de la muestra (agua óxica o anóxica), siendo la única ecuación que realiza buenas estimaciones para muestras anóxicas. En contraste, para las muestras óxicas, a excepción de la ecuación de Parkin y Brock (1981), el resto de ecuaciones no presentaron desviaciones particularmente altas respecto a las medidas realizadas por HPLC, lo que hace que cualquiera de estas ecuaciones sean adecuadas para la estimación significativamente buena de la concentración de clorofila-*a* en aguas óxicas.

Las ecuaciones tricromáticas son ampliamente utilizadas para la determinación de la concentración de clorofila-*b* y -*c* (Jeffrey et al., 1997), proporcionando valiosa información relativa a la composición taxonómica de la comunidad de fitoplancton. Las dos ecuaciones más utilizadas fueron definidas por Parsons y Strickland (1963) (normalmente referida como Strickland y Parsons, 1972 y también referida como SCOR-UNESCO, 1966) y por Jeffrey y Humphrey (1975). La ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975) es mucho más utilizada, probablemente al ser la ecuación recomendada por los métodos EPA de EE.UU. Sin embargo, un aspecto crítico de estas ecuaciones tricromáticas es que son

muy imprecisas en la estimación a bajas concentraciones de estos pigmentos. En la Laguna de La Cruz son las picocyanobacterias unicelulares en las capas óxicas y las bacterias fotosintéticas en las anóxicas las que dominan la comunidad fitoplanctónica (Rodrigo et al., 2001; Camacho et al., 2003). Por el contrario, los grupos de algas que contienen clorofila-*b*, principalmente clorofitas, o clorofila-*c*, principalmente bacillariofitas y crisófitas, presentan generalmente una menor abundancia en la laguna, lo que implica que el posible uso de estas ecuaciones se vea comprometido por las bajas concentraciones de estos pigmentos, encontrándose en muchos casos cerca o por debajo del límite de resolución de las ecuaciones. Esto parece afectar particularmente a la estimación de la concentración de clorofila-*b* que, en nuestro caso, produce los peores resultados estadísticos, aunque las observaciones realizadas por Ritchie (2008) dan una menor precisión de las ecuaciones para el cálculo de la clorofila-*c* en comparación con la clorofila-*b*. Por otra parte, en las profundidades de la laguna, donde se desarrollan las poblaciones de bacterias fotosintéticas verdes del azufre, en el monimolimnion e hipolimnion, es probable que las bacterioclorofilas produzcan una interferencia muy acusada debido a la superposición de espectros, como se puede observar en la figura 5.2. En nuestro caso, la estimación de clorofila-*b* es más sensible a esta interferencia en comparación con la clorofila-*c*.

Para evaluar la concentración de las diferentes bacterioclorofilas (*a*, *c* y *d*) presentes en la laguna, hemos aplicado las ecuaciones de Takahashi y Ichimura (1970), que son las más comúnmente utilizadas en los ecosistemas de agua dulce. También se evaluaron las ecuaciones dicromáticas de Parkin y Brock (1981), así como las de Overmann y Tilzer (1989) que, aunque diseñadas para el cálculo de la concentración de clorofila-*a* cuando existe bacterioclorofila-*d* presente, también permite la estimación de las concentraciones de la bacterioclorofila-*a* -*d* y -*e*. La bacterioclorofila-*e* no fue detectada en la Laguna

Capítulo 5

de La Cruz, como confirman los resultados obtenidos por HPLC, por lo que la ecuación de Overmann y Tilzer (1989) podría ser utilizada para determinar la concentración de bacterioclorofila-*d*. Durante el período de mezcla, las bacterias fotosintéticas del azufre en la Laguna de La Cruz pueden aparecer esporádicamente en capas óxicas debido a la falta de control de la flotabilidad y a la formación de agregados que pueden permanecer durante mucho tiempo en el mixolimnion. Sin embargo, estas bacterias se desarrollan naturalmente en el monimolimnion anóxico e hipolimnion cuando suficiente luz alcanza estas profundidades en presencia de sulfhídrico (Casamayor et al., 2011). Por esta razón, las correlaciones solamente se exploraron para las capas anóxicas de la laguna (figura 5.6). En contraste con lo observado para la clorofila-*a*, los derivados de los pigmentos bacterianos están presentes sólo en cantidades muy bajas, por lo que cualquier corrección es, en principio, innecesaria. La bacterioclorofila-*a* se encuentra en bacterias fotosintéticas púrpuras del azufre (PSB). En la laguna de La Cruz, *Lamprocystis purpurea* domina respecto a otras especies de PSB (Casamayor et al., 2011). Las correlaciones obtenidas para bacterioclorofila-*a*, entre las ecuaciones de Takahashi y Ichimura (1970) y las determinaciones realizadas por HPLC, son bastantes concluyentes, produciéndose una subestimación de la concentración de bacterioclorofila-*a* de sólo un 8%. Respecto a las bacterioclorofilas -*c* y -*d*, que se producen en las bacterias fotosintéticas verdes del azufre (GSB), cuyo microorganismo más abundante en la Laguna de La Cruz es *Chlorobium clathratiforme*, los resultados obtenidos con las ecuaciones de Takahashi y Ichimura (1970) muestran un mejor ajuste para la bacterioclorofila-*d*. En nuestro caso, la concentración de bacterioclorofila-*c* fue subestimada en aproximadamente un 23%. La ecuación de Parkin y Brock (1981) produjo una buena correlación para bacterioclorofila-*d*, mientras que la ecuación de Overmann y Tilzer (1989) parece subestimar notablemente la concentración de este pigmento. Respecto a

este último resultado, debe hacerse notar que la ecuación de Overmann y Tilzer (1989) fue diseñada para evaluar mezclas de bacterioclorofila-d y -e, que no es nuestro caso.

Existen diferentes enfoques analíticos para evaluar la proporción de caroteno respecto a la concentración de clorofila-*a* en sistemas acuáticos. Incluyendo relaciones simples de absorbancia entre las longitudes de onda específicas, como por ejemplo 480/665 nm ó 430/665 nm, que evalúan la proporción de caroteno en relación a la clorofila-*a* (Margalef, 1983), así como métodos cuantitativos tales como la determinación por HPLC. El uso de los ratios antes mencionados es muy poco común en la literatura científica, sin embargo, todavía se utilizan oficialmente en gestión y estudios técnicos. Uno de los primeros intentos de cuantificar espectrofotométricamente las concentraciones de carotenos fue hecho por Richards y Thomson (1952), sin embargo, estas ecuaciones producen resultados poco precisos cuando existen densas poblaciones de diatomeas y/o crisófitas en las muestras. Strickland y Parsons (1972) propusieron una ecuación que resuelve parcialmente este problema, no obstante, esta ecuación hace la suposición de que la relación entre las concentraciones de los diferentes carotenos se mantiene constante en toda la columna de agua, lo que sabemos que no es cierto para lagos estratificados como la Laguna de La Cruz. Aunque las longitudes de onda utilizadas en estas ecuaciones están dentro de los rangos de absorción máxima de todos los carotenos, una variación notable en la composición relativa de los carotenoides con la profundidad, como se esperaría de sistemas acuáticos estratificados, puede introducir un sesgo importante en la cuantificación. En cualquier caso, los ratios caroteno/clorofila-*a* analizados pueden ser adecuados para estudios de análisis cualitativos, representando una estima sencilla de algunas propiedades funcionales de la comunidad fitoplanctónica. Sin embargo, nuestros resultados indican que sólo las muestras del epilimnion se pueden analizar con exactitud

Capítulo 5

debido a la interferencia de algunos carotenos bacterianos tales como la okenona presente en aguas microaerófilas y anóxicas.

En resumen, nuestros resultados demuestran que, en los sistemas acuáticos estratificados, sólo la concentración de algunos pigmentos fotosintéticos de algas y bacterias fotosintéticas pueden estimarse con la precisión apropiada usando las ecuaciones espectrofotométricas disponibles en la bibliografía y que aún son de uso común. Además, el uso de sólo una de estas ecuaciones no siempre es recomendable para toda la columna de agua. El uso de una ecuación u otra depende de la mezcla y la abundancia relativa de los diferentes microorganismos fotosintéticos. En cualquier caso, para la determinación de la concentración de clorofila-*a* encontramos que la ecuación proporcionada por Overmann y Tilzer (1989) es la que mejor se ajusta en todas las circunstancias estudiadas, por lo tanto, se recomienda el uso de esta ecuación en sistemas acuáticos estratificados con presencia en el perfil vertical de microorganismos fotosintéticos. Respecto a la estimación de la concentración de bacterioclorofilas, las fórmulas proporcionadas por Takahahi y Ichimura (1970) funcionan bien en aguas anóxicas, donde se desarrollan poblaciones de bacterias fotosintéticas. Consideraciones similares para otros pigmentos, tales como concentraciones de clorofilas -*b* y -*c* o proporciones en carotenos respecto a clorofila-*a*, se pueden hacer mediante la revisión de la información sintetizada en la tabla 5.2. Esta tabla resume la adecuación de cada ecuación cuando se aplica a un sistema estratificado como la Laguna de La Cruz y podría servir como una referencia para la selección de la ecuación más apropiada, cuando se usan métodos espectrofotométricos para la determinación de pigmentos fotosintéticos.

5.4. Referencias

- APHA–AWWA–WEF. (2005). Standard methods for the examination of water and watershed. 21th edition. American public health association. Washington DC, USA. 1200 pp.
- Arar, E. J. (1997). Determination of chlorophylls *a* and *b* and identification of other pigments of interest in marine and freshwater algae using high performance liquid chromatography with visible wavelength detection. Method 447.0, U.S. Environmental Protection Agency.
- Barlow, R. G., Burkill, P. H., & Mantoura, R. F. C. (1988). Grazing and degradation of algal pigments by marine protozoan *Oxyrrhis marina*. Journal of experimental marine biology and ecology, 119(2), 119-129.
- Camacho, A., Erez, J., Chicote, A., Florín, M., Squires, M. M., Lehmann, C., & Backofen, R. (2001). Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web. Aquatic Sciences, 63(1), 91-106.
- Camacho, A., Picazo, A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2003). Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. Algological Studies, 109(1), 171-184.
- Casamayor, E. O., Llíros, M., Picazo, A., Barberán, A., Borrego, C. M., & Camacho, A. (2011). Contribution of deep dark fixation processes to overall CO₂ incorporation and large vertical changes of microbial populations in stratified karstic lakes. Aquatic sciences, 74(1), 61-75.
- Dos Santos, A. C. A., Calijuri, M. D. C., Moraes, E. M., Adorno, M. A. T., Falco, P. B., Carvalho, D. P., & Benassi, S. F. (2003). Comparison of three methods for Chlorophyll determination: Spectrophotometry and Fluorimetry in samples containing pigment mixtures and spectrophotometry in samples with separate pigments through

Capítulo 5

High Performance Liquid Chromatography. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 15(3), 7-18.

Jacobsen, T. R., & Rai, H. (1990). Comparison of spectrophotometric, fluorometric and high performance liquid chromatography methods for determination of chlorophyll a in aquatic samples: effects of solvent and extraction procedures. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 75(2), 207-217.

Jeffrey, S. T., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz BPP*.

Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., & Bjørnland, T. (1997). Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO, Paris, 449-559.

Jodłowska, S., & Latala, A. (2011). The comparison of spectrophotometric method and high performance liquid chromatography in photosynthetic pigments analysis. *Online Journal of Biological Sciences*, 11, 63–69.

Latasa, M., Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., & Kennicutt, M. C. (1996). HPLC analysis of algal pigments: a comparison exercise among laboratories and recommendations for improved analytical performance. *Marine Chemistry*, 51(4), 315-324.

Lorenzen, C. J. (1967). Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 12(2), 343-346.

Louda, J. W., Li, J., Liu, L., Winfree, M. N., & Baker, E.W. (1998). Chlorophyll a degradation during cellular senescence and death. *Organic Geochemistry*, 29, 1233–1251.

Louda, J. W., Liu, L., & Baker, E. W. (2002). Senescence-and death-related alteration of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. *Organic Geochemistry*, 33(12), 1635-1653.

- MacLulich, J. H. (1986). Experimental evaluation of methods for sampling and assaying intertidal epilithic microalgae. *Marine Ecology Progress Series*, 34, 275-280.
- Mantoura, R. F. C., & Llewellyn, C. A. (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 151, 297-314.
- Mantoura, R. F. C., Jeffrey, S. W., Llewellyn, C. A., Claustre, H., & Morales, C. E. (1997). Comparison between spectrophotometric, fluorometric and HPLC methods for chlorophyll analysis. In: Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (eds). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO Publishing Paris, pp 361-380.
- Margalef, R. (1983). *Limnología* (p. 1010). Barcelona. Omega.
- Marker, A. F. H. (1972). The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*, 2(4), 361-385.
- Miracle, M. R., Vicente, E., & Pedrós-Alió, C. (1992). Biological studies of Spanish meromictic and stratified karstic lakes. *Limnetica*, 8, 59-77.
- Murray, A. P., Gibbs, C. F., Longmore, A. R., & Flett, D. J. (1986). Determination of chlorophyll in marine waters: intercomparison of a rapid HPLC method with full HPLC, spectrophotometric and fluorometric methods. *Marine Chemistry*, 19(3), 211-227.
- Overmann, J., & Tilzer, M. M. (1989). Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic kettle lake. *Mittlerer Buchensee, West-Germany. Aquatic Sciences*, 51(4), 261-278.
- Parkin, T. B., & Brock, T. D. (1981). Photosynthetic bacterial production and carbon mineralization in a meromictic lake. *Archiv fur Hydrobiologie*, 91(3).
- Parsons, T. R., & Strickland, J. D. (1963). Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Journal of Marine Research*, 21(3), 155-163.

Capítulo 5

- Pinckney, J., Papa, R., & Zingmark, R. (1994). Comparison of high-performance liquid chromatographic, spectrophotometric, and fluorometric methods for determining chlorophyll a concentrations in estuarine sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 19(1), 59-66.
- Plante-Cuny, M. R., Barranguet, C., Bonin, D., & Grenz, C. (1993). Does chlorophyllidea reduce reliability of chlorophylla measurements in marine coastal sediments?. *Aquatic Sciences*, 55(1), 19-30.
- Richards, F. A., & Thompson, T. G. (1952). The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *Journal of Marine Research*, 11(2), 156-172.
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*, 89(1), 27-41.
- Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1), 115-126.
- Rodrigo, M. A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2001). The meromictic Lake La Cruz (Central Spain). Patterns of stratification. *Aquatic Sciences*, 63(4), 406-416.
- Rowan, K. S. (1989). *Photosynthetic Pigments of Algae* Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Salinas, J. T. (1988). A critical comparison of methods for the determination of phytoplankton chlorophyll (Doctoral dissertation).
- Schagerl, M., & Künzl, G. (2007). Chlorophyll a extraction from freshwater algae - a reevaluation. *Biologia*, 62(3), 270-275.
- SCOR-UNESCO. (1966). Determination of photosynthetic pigments in seawater. *Monographs on Oceanographic Methodology*, UNESCO, Paris, vol. 1, p.11-18.
- Shimura, S., & Fujita, Y. (1975). Changes in the activity of fucoxanthin-excited photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown under different culture conditions. *Marine Biology*, 33(3), 185-194.

Capítulo 5

- Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Merzlyak, M. N. (2009). Carotenoid-to-chlorophyll ratio as a proxy for assay of total fatty acids and arachidonic acid content in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 21(3), 361-366.
- Stal, L. J., Van Gernerden, H., & Krumbein, W. E. (1984). The simultaneous assay of chlorophyll and bacteriochlorophyll in natural microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 2(6), 295-306.
- Steenbergen, C. L. M., & Korthals, H. J. (1982). Distribution of phototrophic microorganisms in the anaerobic and microaerophilic strata of Lake Vechten (The Netherlands). Pigment analysis and role in primary production. *Limnology and Oceanography*, 27(5), 883-895.
- Strickland, J. D., & Parsons, H. (1972). A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, 167.
- Takahashi, M., & Ichimura, S. E. (1970). Photosynthetic properties and growth of photosynthetic sulfur bacteria in lakes. *Limnology and Oceanography*, 15(6), 929-944.
- Wright, S. W., & Jeffrey, S. W. (2006). Pigment markers for phytoplankton production. In *Marine organic matter: biomarkers, isotopes and DNA* (pp. 71-104). Springer Berlin Heidelberg.

Capítulo 6

Estudio de la estructura vertical de algas eucarióticas, picocianobacterias y bacterias fotosintéticas anoxygenicas en la Laguna de La Cruz mediante citometría de flujo

6.1. Introducción

El estudio de los productores primarios en los ecosistemas acuáticos, es uno de los aspectos más importantes en la comprensión del funcionamiento de los ecosistemas marinos y limnológicos (Wetzel, 2001; Kirk, 2011; Kirchman y Hanson, 2012). Históricamente, los estudios de organismos fotosintéticos se han centrado primero en el fitoplancton eucariota y más recientemente en las cianobacterias. Picocianobacteria (Pcy) se ha convertido en un grupo clave debido a su abundancia, ubicuidad y relevancia en la producción primaria de los ecosistemas acuáticos (Craig, 1985; Stockner, 1988). En algunos ecosistemas las bacterias fotosintéticas, bacterias verdes y púrpuras del azufre, pueden alcanzar altas abundancias y, la fotosíntesis anoxigénica que estos microorganismos realizan, puede contribuir de manera significativa a la producción primaria de los sistemas que habitan (Parkin y Brock, 1981). Diferentes técnicas han sido desarrolladas para estimar la abundancia de este conjunto tan heterogéneo de microorganismos fotosintéticos. Las técnicas microscópicas clásicas siguen siendo la referencia en la cuantificación de la abundancia microbiana. Estas técnicas tienen algunas desventajas, como el límite de detección visual de microorganismos muy pequeños, la cantidad de tiempo que requiere la preparación y recuento de cada muestra o la necesidad de personal cualificado. También presentan algunas ventajas como, ser el método de referencia clásico, lo que hace que los datos sean comparables a la mayoría de la literatura existente y, además, incluye la posibilidad de observar y cuantificar la morfología celular, lo que permite una taxonomía más detallada, incluso a nivel de especie, para grandes grupos de fitoplancton eucariota de gran tamaño (Hofstraat et al., 1994; Monfort y Baleux, 1992). El procedimiento habitual para estimar la abundancia de organismos fotosintéticos por microscopía implica diferentes métodos de fijación que, por lo general, requiere

la obtención de diferentes muestras utilizando diversas técnicas de microscopía, involucrando diferentes operadores y diferencias en el procesado de datos. El procedimiento general para la fijación de especies pequeñas, fracción picoplanctónica, es usar glutaraldehído o formaldehído, filtrándose sobre filtros negros, y realizándose los recuentos por microscopía de epifluorescencia (MacIsaac y Stockner, 1993; Marie et al., 1997). Para fitoplancton eucariota de mayor tamaño, lo más común es el uso de muestras fijadas con lugol, realizando el recuento por microscopía invertida (Utermöhl, 1958). En el caso de las bacterias fotosintéticas la metodología es menos estándar, pero lo habitual es la fijación con eritrosina fenicada y el recuento por microscopía de contraste de fase (Jones, 1979). Las principales razones que impulsaron el desarrollo de la citometría de flujo (CF) para el recuento de organismos en general, y de organismos fotosintéticos en particular, fue el poder usar una muestra única, con un único método de fijación, un único técnico y forma de procesar los datos, minimizando así, sesgos. Sin embargo, la principal ventaja de la CF es la posibilidad de contar miles de eventos (entre 2 y 3 órdenes de magnitud superiores que por microscopía) en un análisis, lo que hace que el resultado estadístico de los recuentos sea más robusto.

El uso de citometría de flujo (CF) en la investigación del fitoplancton comenzó muy temprano en los años 80 (Trask et al., 1982; Yentsch et al., 1983; Olson et al., 1989; Balfort et al., 1992), resaltando el potencial de esta técnica en el seguimiento de población de organismos y su investigación. La CF, con un buen calibrado, puede realizar mediciones a nivel de una única célula a alta velocidad, pudiendo discriminar microorganismos fotosintéticos específicos por dispersión de la luz y autofluorescencia individual, por lo menos para los grupos más abundantes (Hofstraat et al., 1994; Boddy et al., 2001). También proporciona una manera rápida para el estudio de las propiedades estructurales y funcionales de microorganismos individuales, haciendo así que CF sea una

herramienta útil para aplicaciones en ecología microbiana acuática (Vives-Rego et al., 2000). Hoy en día el uso de la CF está muy generalizado para determinar la abundancia de picoplancton, tanto heterótrofos como autótrofos, especialmente en ambientes marinos (Dominique et al., 1997; Dubelaar y Jonker, 2000; Lomas et al., 2011; Bergquist et al., 2009; Gasol y del Giorgio, 2000). Sin embargo, en ecosistemas de agua dulce el uso de esta técnica para el recuento y monitoreo de organismos fotosintéticos ha sido mucho más limitado (Cellamare, 2010; Casamayor et al., 2007; Crosbie et al., 2003; Toepel et al., 2004).

La Laguna de La Cruz es un buen modelo para el estudio por CF de la distribución en la columna de agua de diferentes grupos de organismos fotosintéticos (Vicente y Miracle, 1988; Dasi y Miracle, 1991; Rodrigo et al., 2000). Como se ha visto en el capítulo 4, esta laguna presenta un dominio importante e inusual de Pcy en todo el perfil vertical, con una sucesión estratificada en capas más o menos solapadas de diferentes poblaciones de organismos fotosintéticos, picocianobacterias, piceocariotas y algas eucariotas de mayor tamaño, en la zona óxica y oxiclina, y bacterias fotosintéticas en las profundidades anóxicas, en concreto, bacteria púrpura del azufre como dominante *Lamprocystis purpurea* y bacterias verdes del azufre, *Chlorobium clathratiforme* en menor abundancia (Rodrigo et al., 2000; Casamayor et al., 2012).

El uso de CF para la identificación y discriminación de microorganismos fotosintéticos en muestras naturales en una laguna fuertemente estratificada, como la de La Cruz, implica varios retos como la identificación y asociación de los subgrupos observados por CF con grupos específicos de microorganismos fotosintéticos observados por microscopía. El tamaño de los microorganismos es un factor muy importante en la identificación y discriminación por CF.

Además, la autofluorescencia natural de los pigmentos fotosintéticos permite la discriminación sin añadir fluorocromos externos (Marie et al., 2005; Trask et al., 1982). Los pigmentos más relevantes para esta discriminación son la clorofila-*a* para el fitoplancton eucariota y cianobacterias, las ficobiliproteínas (ficoeritrina y ficocianina) para las cianobacterias y, para las bacterias fotosintéticas, las bacterioclorofilas son el marcador que permite discriminar estas poblaciones (Casamayor et al., 2007). Con el fin de identificar los diferentes grupos de interés mediante esta metodología, en la Laguna de La Cruz se aislaron físicamente los microorganismos fotosintéticos más abundantes de la propia laguna en cultivos puros para poder contrastar con los resultados.

El objetivo de este capítulo es delimitar la capacidad de la CF estándar para la identificación y la discriminación de comunidades complejas de microorganismos fotosintéticos en sistemas estratificados, como el perfil vertical de la Laguna de La Cruz, además de determinar la utilidad de la CF para el recuento y seguimiento de la dinámica de estas comunidades fotosintéticas en la laguna.

6.2. Métodos específicos

Determinaciones de microscópicas

Las muestras para las bacterias fototróficas del azufre, se fijaron con formaldehído al 2%, y se contaron por contraste de fase a 1250x en un microscopio Zeiss RS III después de retenerlos en un filtro de acetato de celulosa (0,2 μm de diámetro de poro). Estos filtros se secaron y se tiñeron con eritrosina para permitir la identificación celular (Jones, 1979).

Las muestras para el nanofitoplancton de se fijaron con una solución de Lugol y fueron examinados en las cámaras de sedimentación Utermöhl después de 48h de sedimentación (Utermöhl, 1958). En este caso, la identificación y el recuento se realizaron con un microscopio Nikon Eclipse TE2000-S invertido en 600x y 1000x. For each technique at least 500 individuals were counted and 10 individuals of each species measured in order to perform abundance and biomass estimations. Para cada técnica se contaron, al menos, 500 individuos. De cada especie, 10 de estos individuos, fueron medidos para realizar la estimación de biovolumen y biomasa.

Análisis de citometría de flujo

Para la identificación de los principales grupos fotosintéticos con citometría de flujo, se usó un citómetro de flujo Coulter Cytomics FC500 equipado con un láser de argón (488 de excitación), un diodo emisor de rojo (635 de excitación), y cinco filtros para la emisión de fluorescencia (FL1-FL5). Para cada muestra, se utilizaron dos protocolos diferentes. Un primer protocolo (P1) se usó para contar picocianobacteria con discriminación por tamaño (dispersión lateral SS0). El segundo protocolo (P2), se utilizó para la identificación del resto de nanofitoplancton y bacterias fotosintéticas, la discriminación fue por fluorescencia en FL4 (clorofila y bacterioclorofila) (Veldhuis y Kraay, 2000). Para P1, los ajustes de los parámetros de citometría fueron los siguientes: FSC (550), SSC (390), FL1 (600), FL2 (670), FL3 (670), FL4 (620) y FL5 (700), mientras que para P2 se utilizó la misma configuración pero con la discriminación en FL4.

Los análisis se llevaron a cabo durante 160 segundos para el protocolo picocianobacteria (P1) y, 600 segundos para el protocolo del nanofitoplancton (P2), ambos a la tasa de flujo único de 128 ml min⁻¹ que es el más alto del

citómetro utilizado. La abundancia de cada población se calculó de acuerdo a las fórmulas: $N = (n \times 1000) / Q \times t$, donde Q es el caudal (microlitros por minuto), t es la duración (minutos) de la adquisición, n es el número de eventos contados por el citómetro de flujo, y N es el número de células por mililitro.

Los datos fueron recogidos con el software Beckman Coulter para la adquisición de "CXP Version 2.2 Acquisition" y el análisis de los datos se realizó utilizando el software Beckman Coulter para el análisis "CXP Version 2.2 Analysis".

Cultivos y enriquecimientos

Los aislamientos o enriquecimientos de los principales productores primarios en el Laguna La Cruz se realizaron con diferentes metodologías. Para las dos cepas diferentes de Pcy aislado (PE-rich y PC-rich), se utilizó un citómetro de flujo "sorter" (MoFlo, Beckman Coulter). Para aislar el nanofitoplancton, (*Scenedesmus*, *Cosmarium*, *Pectodictium* y *Cyclotella*), los aislamientos se obtuvieron placas de Petri con agarosa (0,8%) en medio BG11 después de diversas diluciones en serie. Cuando los cultivos puros no se pudieron obtener, se utilizaron enriquecimientos (por ejemplo, para *Cryptomonas* y para las bacterias fotosintéticas anoxigénicas). Los enriquecimientos de las bacterias púrpura de azufre (PSB) y bacterias verdes del azufre (GSB), se obtuvieron a partir del colapso estacional y natural de estas poblaciones, que se produce durante el proceso de mezcla de la laguna. Este colapso provoca la acumulación de biomasa en la superficie del lago. Se recogieron muestras de esta biomasa y se fijaron con paraformaldehído: solución de glutaraldehído a una concentración final en la muestra de 1%: 0,05% (w / v) (Marie et al., 1997).

6.3. Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la viabilidad del uso de la citometría de flujo para identificar y estimar la abundancia de las diferentes poblaciones de organismos fotosintéticos presentes en la Laguna de La Cruz. Para este estudio se seleccionó un periodo de estratificación, en concreto en el perfil vertical de octubre de 2006. En esta fecha la Laguna de La Cruz presenta un epilimnion bien oxigenado a 8 metros de profundidad, y un fuerte gradiente térmico que delimita la termoclina y oxiclina entre 8 y 10,5 metros, el hipolimnion anoxigénico se situó entre los 10,5 a 16,5 metros (figura 6.1A).

La máxima abundancia de pigmentos fotosintéticos se localiza entre el metalimnion inferior y en el hipolimnion superior (figura 6.1B). Se observó un máximo profundo de clorofila (DCM) muy marcado a 11 metros de profundidad, de aproximadamente 80 mg m^{-3} de la clorofila-*a*, mientras que la concentración media epilimnética fue de $1\text{-}2 \text{ mg m}^{-3}$. En la interfase óxico-anóxica se observó una compleja mezcla de pigmentos fotosintéticos (figura 6.1C). El perfil vertical de la abundancia de los principales microorganismos fotosintéticos muestra que las picocianobacterias son el grupo dominante en abundancia en todo el perfil vertical (tabla 6.1). Las Pcy son aproximadamente un 95% de la abundancia promedio respecto al total de microorganismo fotosintéticos en la laguna y presentan valores máximos a los 11 metros coincidiendo con el DCM. En el epilimnion y metalimnion superior la variedad de Pcy dominante fue PC-Rich y en el metalimnion inferior e hipolimnion una variedad PE-Rich. En contraste, las poblaciones de picoeucariotas (Ape) presentaron una abundancia relativa muy baja en todo el perfil vertical, siempre por debajo del 0,1% de la abundancia total de todos los microorganismos fotosintéticos.

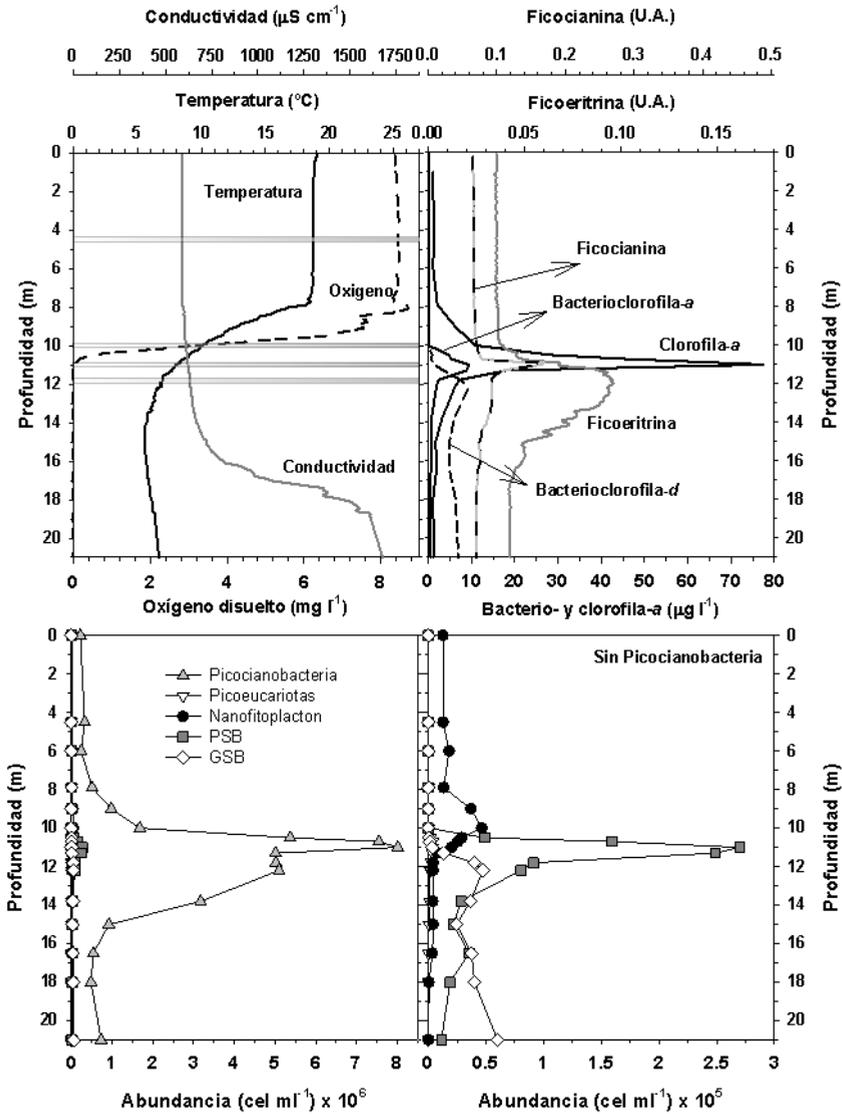


Figura 6.1. Estructura del perfil vertical en el periodo de estratificación a finales de octubre de 2006 en la Laguna de La Cruz. A) Perfiles verticales de temperatura, conductividad y oxígeno disuelto. B) Perfiles verticales de los principales pigmentos fotosintéticos. C) Abundancia de diversos miembros de la comunidad fotosintética en el perfil vertical. D) Reescalado de la abundancia de los miembros de la comunidad fotosintética en el perfil vertical excluyendo las picocianobacteria.

Las determinaciones realizadas por microscopía, muestran que la comunidad con mayor diversidad a lo largo del perfil vertical fue la del nanofitoplancton. En capas oxigénicas (epilimnion y metalimnion superior) el taxón dominante fue *Scenedesmus sp.* (tabla 6.1), seguido de *Pectodiction sp.*, *Cosmarium sp.* y *Cyclotella sp.* Las mayores abundancias de nanofitoplancton se observaron en el metalimnion inferior, debido principalmente a la sedimentación de *Cosmarium sp.* (tabla 6.1). Este máximo profundo de nanofitoplancton se produjo a 10 metros de profundidad y no se correlaciona con el perfil del máximo profundo de clorofila (DCM) situado a 11 metros de profundidad.

Tabla 6.1. Contribución relativa (%) de los diferentes organismos fotosintéticos más abundantes en la Laguna de La Cruz a diferentes profundidades.

4.5 metros - % of Abundancia				10 metros - % of Abundancia	
Picocianobacteria	96.2 %			Picocianobacteria	97.3 %
Nanofitoplancton	3.8 %	<i>Scenedesmus</i>	52.4 %	Nanofitoplancton	2.7 %
Bacterias púrpuras del azufre	0 %	<i>Pectodiction</i>	10.2 %	Bacterias púrpuras del azufre	0 %
Bacterias verdes del azufre	0 %	<i>Cosmarium</i>	8.6 %	Bacterias verdes del azufre	0 %
	100 %	<i>Cyclotella</i>	6.6 %		100 %
			77.8 %	<i>Cosmarium</i>	75.5 %
				<i>Cyclotella</i>	10.9 %
				<i>Tetrahedrom</i>	3.1 %
				<i>Scenedesmus</i>	1.5 %
					91.0 %
11 metros - % of Abundancia				11.8 metros - % of Abundancia	
Picocianobacteria	96.5 %			Picocianobacteria	97.4 %
Nanofitoplancton	0.2 %	<i>Cryptomonas</i>	45.5 %	Nanofitoplancton	0.1 %
Bacterias púrpuras del azufre	3.3 %	<i>Cosmarium</i>	37.9 %	Bacterias púrpuras del azufre	1.7 %
Bacterias verdes del azufre	0 %	<i>Cyclotella</i>	6.4 %	Bacterias verdes del azufre	0.8 %
	100 %	<i>Tetrahedrom</i>	2.1 %		100 %
			79.5 %	<i>Cosmarium</i>	34.9 %
				<i>Cyclotella</i>	27.5 %
				<i>Euglena</i>	13.9 %
				<i>Scenedesmus</i>	3.2 %
					79.5 %

En el metalimnion profundo (cerca de la extinción de oxígeno) y en el hipolimnion superior, *Cryptomonas sp.* fue el grupo más abundante de nanofitoplancton (tabla 6.1). Las bacterias fotosintéticas anoxigénicas se localizaron en el metalimnion inferior, hipolimnion y en el monimolimnion anóxico. Las bacteria púrpura del azufre mostraron máximos de abundancia entre los 11 y 12 metros, y las bacterias verdes del azufre entre los 12 y 13 metros de profundidad (figura 6.1D).

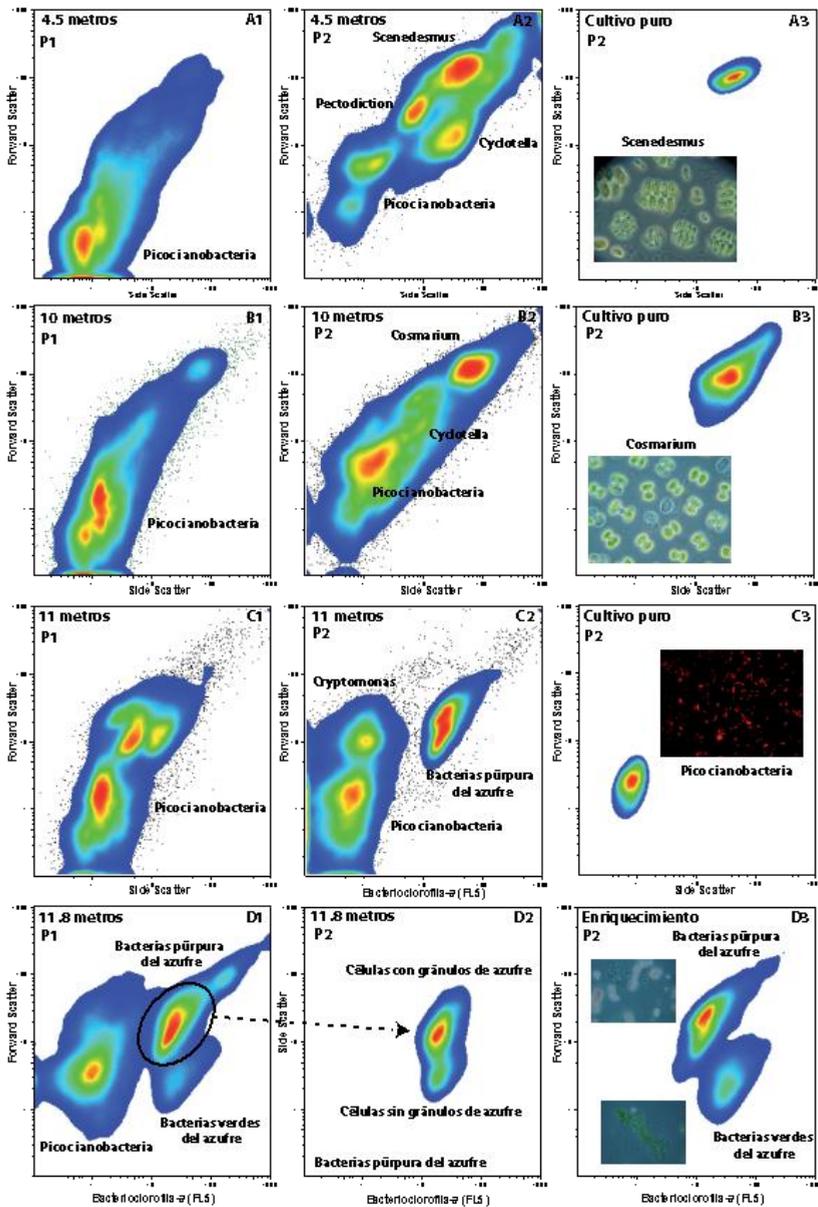


Figura 6.2. Citogramas que muestran las diferentes nubes de eventos de la comunidad fotosintética en la Laguna de La Cruz. A1, B1 y C1 Pcy con P1 (protocolo 1) a 4,5, 10 y 11 metros. A2, B2 y C2) nanofitoplancton con P2 (protocolo 2) a 4,5, 10 y 11 metros. A3, B3, C3) ejemplo con la foto del cultivo aislado D1) poblaciones de la bacterias fotosintéticas y segregación de Pcy a 11,8 metros. D2) Dispersión lateral de la

segregación de bacterias púrpuras del azufre respecto a la presencia de gránulos de azufre. D3) Nube de eventos y microfotografía de bacterias fotosintéticas en un cultivo enriquecido la Laguna de La Cruz.

La caracterización de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos por CF en la Laguna de La Cruz mostró un patrón complejo de agrupaciones de eventos en función de tamaño, estructura interna y fluorescencia en las diferentes profundidades estudiadas. Con el protocolo P1 se observó principalmente el clúster de picocyanobacteria (figura 6.2A1, B1, C1) y con el protocolo P2 podemos reconocer una distribución más compleja de clusters en los que se intenta identificar las diferentes poblaciones de nanofitoplancton y bacterias fotosintéticas. Los resultados de CF de las muestras de epilimnion y metalimnion superior, (figura 6.2 A1 y A2) muestran el predominio de las Pcy, con un promedio del 96% del total de la abundancia de microorganismos fotosintéticos. Con el protocolo 2, se observan 4 grupos principales de nanofitoplancton que representan 3,8% del total (figura 6.2A1). En estas profundidades el taxón más abundante fue *Secenedesmus sp.* (figura 6.2A3), seguido por *Pectodiction sp.*, *Cosmarium sp.* y *Cyclotella sp.* (tabla 6.1A). No se observaron bacterias fotosintéticas en el epilimnion y metalimnion superior.

La máxima abundancia de nanofitoplancton en el perfil vertical se produce en el metalimnion inferior a 10 metros (figura 6.2B), aunque solo representa un 2,7% de la abundancia total de microorganismos fotosintéticos presentes en esa profundidad. El principal género es *Cosmarium sp.* (75,5% de todo el nanofitoplancton), seguido por *Cyclotella sp.*, *Tetrahedron sp* y *Scenedesmus sp.* A 11 metros de profundidad, donde se localiza el máximo profundo de clorofila-*a* (DCM) y la oxiclina (figura 6.2C), es donde se encuentra la máxima abundancia de las Pcy. La abundancia relativa de nanofitoplancton a esta profundidad se redujo hasta el 0,2% del total de microorganismos fotosintéticos, aumentando la abundancia relativa de las bacterias púrpura del azufre hasta un

3,3%, sin observarse poblaciones significativas de bacterias verdes del azufre. Bajo la oxiclina, en el hipolimnion superior, la abundancia de las Pcy aun representa un porcentaje muy importante del total fotosintético, mientras que el nanofitoplancton desciende al 0,1%, aunque el tamaño de *Cryptomonas sp.* hace que en términos de biomasa pueda ser una fracción representativa. Se observaron bacterias fotosintéticas en todo el hipolimnion (figura 6.1D). A 11,8 metros de profundidad la abundancia relativa de las bacterias púrpuras del azufre fue del 1.7%, mientras que la de las bacterias verdes del azufre aumentó a 0,8%. Con estas abundancias ya fue posible discriminar y cuantificar las dos poblaciones por CF (figura 6.2D). La fluorescencia roja de la bacterioclorofila (canal FL5 en nuestra configuración) permite la discriminación específica de Pcy y del nanofitoplancton, mientras que la dispersión frontal (FS0) permite la discriminación entre las bacterias púrpuras del azufre y las verdes (figura 6.2D1 y D3). Además, las bacterias púrpura del azufre pueden acumular gránulos de azufre, que son detectables en la señal de dispersión lateral (SS0). La refracción diferencial de estos gránulos permite la discriminación posterior de estas dos subpoblaciones de bacterias púrpura del azufre (figura 6.2D2).

Tabla 6.2. Ajuste no paramétrico (Spearman Rho) entre los resultados de abundancia obtenidos por citometría de flujo y los obtenidos por microscopia (Diferencias no significativas determinadas a: $**\alpha = 0.01$ o $*\alpha = 0.001$).

	rho de Spearman	Grados de libertad	P-valor	Pendiente
<i>Scenedesmus</i>	0.936	9	P<0.001*	1.06
<i>Cosmarium</i>	0.945	9	P<0.001*	1.05
<i>Cyclotella</i>	0.564	9	0.071	0.71
<i>Pectodiction</i>	0.982	9	P<0.001*	1.21
Pcy	0.957	13	P<0.001*	0.82
<i>Cryptomonas</i>	0.946	13	P<0.001*	1.13
PSB	0.996	13	P<0.001*	1.14
GSB	1.000	13	P<0.001*	1.05
Total	---	83	P<0.001*	0.86

En la tabla 6.2 se resumen los resultados de las regresiones lineales entre los recuentos realizados por citometría de flujo respecto a los recuentos clásicos determinados por microscopía de diferentes poblaciones de organismos fotosintéticos identificados y cuantificados en la Laguna de La Cruz.

Se observa un buen ajuste general entre los dos métodos, con altos coeficientes de correlación de Spearman, siendo todos significativos ($p > 0,001$), excepto para el caso de *Cyclotella sp.* ($p = 0,071$). Para las *Pcy* y *Cyclotella sp.* Se observa que los valores de pendiente fueron inferiores a 1 (aunque en el caso *Cyclotella sp.* la regresión no fue significativa), lo que implica que las abundancias estimadas por CF esta subestimada con respecto a los recuentos microscópicos. Para todos los demás taxones las pendientes fueron superiores a 1, apuntando a una sobreestimación de las abundancias estimadas por CF respecto a los recuentos por microscopía.

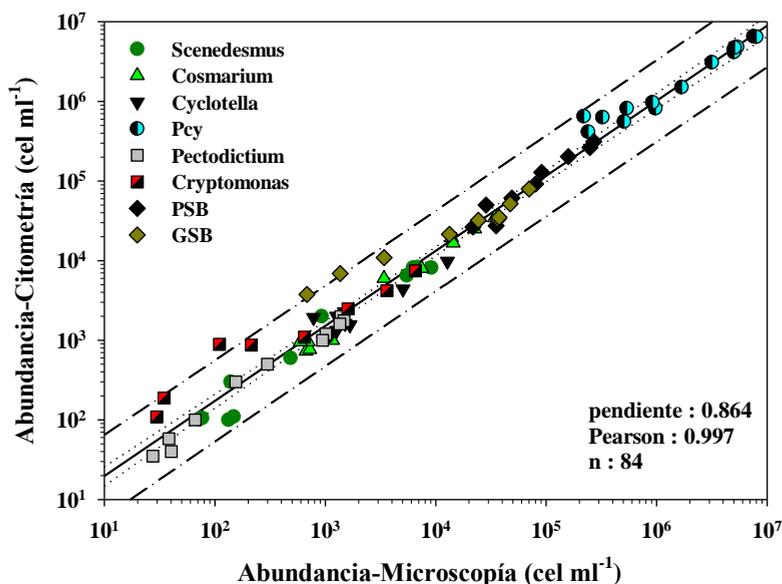


Figura 6.3. Ajuste entre los recuentos de abundancia realizados por microscopía (diferentes técnicas) y los recuentos realizados por citometría de flujo de los principales miembros de la comunidad fotosintética en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz.

Cuando representamos (figura 6.3) todas las abundancias, de los organismos fotosintéticos identificados y cuantificado en la columna de agua, estimadas por CF respecto a las estimaciones realizadas por microscopia, se observa un buen ajuste en un rango de 6 órdenes de magnitud de abundancia ($N = 84$, $\text{pearson} = 0,997$).

6.4. Discusión

El objetivo principal del presente capítulo es determinar el potencial de la citometría de flujo (CF) para la identificación y cuantificación de las diferentes comunidades de organismos fotosintéticos en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz. Se trata de un buen modelo para este tipo de estudio porque a lo largo del perfil vertical están representados todos los organismos fotosintéticos posibles, distribuidos de manera estratificada en función del perfil de luz, temperatura y nutrientes disponibles. Además, existe un amplio conocimiento sobre la distribución y dinámica del nanofitoplancton y bacterias fotosintéticas de este lago (Vicente y Miracle, 1988; Dasí y Miracle, 1991; Armengol-Díaz et al., 1993; Rodrigo et al., 2000; Miracle et al., 2001; Camacho et al., 2003; Romero-Viana et al., 2010). Nuestros resultados muestran que es posible identificar y cuantificar a los organismos fotosintéticos más abundantes de la laguna por citometría de flujo. En general, en sistemas acuáticos templados las poblaciones de Pcy pueden presentar una abundancia relativa muy alta respecto al resto de microorganismos fotosintéticos (Dokulil y Teubner, 2000; Callieri, 2008) aunque con una diferenciación fenotípica muy limitada. Sin embargo, el nanofitoplancton presenta una gran diversidad de especies, tamaños y morfologías.

Las primeras publicaciones sobre la viabilidad del uso de la CF para la identificación y recuento de las comunidades fotosintéticas en ecosistemas acuáticos datan del primer desarrollo de esta tecnología en los años 70 (Peeters et al., 1989; Phinney y Cucci, 1989; Yentsch y Horan, 1989; Marie et al., 2005), aunque los citómetros de flujo estándar no están diseñados para el rango tan variable de tamaño que se observa en las poblaciones naturales (Petersen et al., 2012). Las comunidades fotosintéticas tienen características particulares que permiten la discriminación de sus población por CF, (i) importantes diferencias en tamaño y morfología, (ii) la autofluorescencia de pigmentos accesorios (Gasol y Del Giorgio, 2000) con diferentes longitudes de onda de emisión en función de los pigmentos involucrados (Becker et al., 2002).

Con el fin de obtener todas las identificaciones y recuentos de la misma muestra se ha desarrollado, en este trabajo, dos protocolos diferentes. Debido a la gran abundancia de las Pcy en esta laguna ha sido necesario el uso de un protocolo corto de 160 segundos (P1) que discrimina a las Pcy por tamaño, ficoeritrina, ficocianina y clorofila-*a* y que permite también la discriminación entre las cepas PC-Rich y PE-Rich. A pesar de que el nanofitoplancton y las bacterias fotosintéticas representan en abundancia, que es lo que estima el CF, menos del 3% de los microorganismos fotosintéticos totales, es posible identificarlas. Para ello se usó un segundo protocolo (P2) más largo, 600 segundos, que discrimina en el canal de la clorofila, FL4, y con un umbral de discriminación mucho más alto que P1. En comparación con el cloroplasto eucariota, una célula de Pcy tiene mucha menos clorofila, en torno a un orden de magnitud inferior (Vaillancourt et al., 2004), por lo que el umbral se sitúa en el límite para no detectar las Pcy pero si los cloroplastos del nanofitoplancton. Las cianobacterias filamentosas y coloniales de mayor tamaño sí que son detectadas por el protocolo P2, aunque en la Laguna de La Cruz son poblaciones minoritarias. La fluorescencia de las bacterias fotosintéticas, principalmente por la

bacterioclorofila, tiene su máxima emisión en el canal FL5 del citómetro, pero la señal obtenida por el protocolo P2 en el canal FL4 es suficiente para discriminar cuantitativamente sin la necesidad de un tercer protocolo.

Se observa un amplio rango de tamaños en las poblaciones de organismos fotosintéticos en ecosistemas acuáticos naturales. En el caso de la Laguna de La Cruz, la CF nos permite identificar y cuantificar los grupos fotosintéticos más abundantes de una misma muestra, en un análisis que toma aproximadamente 20 minutos. El elevado número de eventos que se tienen en cuenta en un recuento, minimiza el error experimental, generalmente asumido cuando se utilizan técnicas microscópicas (Kemp, 1993).

El análisis microscópico necesita, en nuestro caso, tres muestras diferentes fijadas con varios fijadores, recogidas en diferentes momentos del muestreo con tres técnicas diferentes. Estas técnicas son, microscopía de epifluorescencia para picoplancton autotrófico (picoprocariotas y piceucariotas), método de Utermöhl para nanofitoplancton y tinción con eritrosina fenicada para la cuantificación de bacterias fotosintéticas (bacterias púrpuras de azufre y bacterias verdes del azufre). Eso hace que la CF sea una técnica rápida y eficiente a tener en cuenta (Hofstraat et al., 1994; Rutten et al., 2005; Troussellier et al., 1993). Sin embargo, la microscopía también cuenta con múltiples ventajas. Permite la identificación de morfotipos y de tamaños que son esenciales para el cálculo de biovolúmenes y biomasa, posibilita la detección de cambios morfológicos e identificar a nivel de especie el nanofitoplancton. Por otro lado, el uso de múltiples fijadores tiene una justificación metodológica, no todos los grupos de organismos se comportan de igual manera ante un mismo fijador, por lo que hay que tener en cuenta que el uso de un fijador único y una muestra única también puede plantear problemas metodológicos.

La utilidad de las diferentes técnicas, CF o microscopía, depende del objetivo final del estudio. La diversidad de microorganismos fotosintéticos es relativamente grande en sistemas estratificados, como la Laguna de La Cruz. Para el seguimiento de poblaciones específicas o experimentos concretos, CF ofrece, obviamente, múltiples ventajas en tiempo, dinero y posibilidad de realizar estudios más complejos con los mismos recursos. Sin embargo, para estudios taxonómicos o funcionales, los recuentos microscópicos proporcionan mucha información de gran valor, llegando a identificar con precisión un promedio de 40-50 especies, con su descripción morfológica y rango de tamaños, mientras que la CF puede diferenciar entre 5-10 especies con información de tamaño muy limitada (Schiaffino et al., 2013). En conclusión, los resultados muestran que la identificación y cuantificación de los principales organismos fotosintéticos en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz puede resolverse de manera eficiente mediante citometría de flujo aunque para un estudio completo los recuentos microscópicos son totalmente necesarios.

6.5. Referencias

- Armengol-Díaz, J., Esparcia, A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (1993). Vertical distribution of planktonic rotifers in a karstic meromictic lake. In *Rotifer Symposium VI* (pp. 381-388). Springer Netherlands.
- Balfoort, H. W., Berman, T., Maestrini, S. Y., Wenzel, A., & Zohary, T. (1992). Flow cytometry: instrumentation and application in phytoplankton research. *Hydrobiologia*, 238(1), 89-97.
- Becker, A., Meister, A., & Wilhelm, C. (2002). Flow cytometric discrimination of various phycobilin-containing phytoplankton groups in a hypertrophic reservoir. *Cytometry*, 48(1), 45-57.
- Bergquist, P. L., Hardiman, E. M., Ferrari, B. C., & Winsley, T. (2009). Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles*, 13(3), 389-401.
- Boddy, L., Wilkins, M. F., & Morris, C. W. (2001). Pattern recognition in flow cytometry. *Cytometry*, 44(3), 195-209.
- Callieri, C. (2008). Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*, 1(1), 1-28.
- Camacho, A., Picazo, A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2003). Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. *Algological Studies*, 109(1), 171-184.
- Casamayor, E. O., Ferrera, I., Cristina, X., Borrego, C. M., & Gasol, J. M. (2007). Flow cytometric identification and enumeration of photosynthetic sulfur bacteria and potential for ecophysiological studies at the single-cell level. *Environmental microbiology*, 9(8), 1969-1985.

- Casamayor, E. O., Llíros, M., Picazo, A., Barberán, A., Borrego, C. M., & Camacho, A. (2012). Contribution of deep dark fixation processes to overall CO₂ incorporation and large vertical changes of microbial populations in stratified karstic lakes. *Aquatic sciences*, 74(1), 61-75.
- Cellamare, M., Rolland, A., & Jacquet, S. (2010). Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *Journal of applied phycology*, 22(1), 87-100.
- Craig, S. R. (1985). Distribution of algal picoplankton in some European freshwaters. *Abstr. 2nd Int. Phycol. Congr*, 31.
- Crosbie, N. D., Pöckl, M., & Weisse, T. (2003). Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5716-5721.
- Dasí, M. J., & Miracle, M. R. (1991). La Laguna de La Cruz (Cuenca, España). *Limnetica*, 7, 37-59.
- Dokulil, M. T., & Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438(1-3), 1-12.
- Dominique, M., Partensky, F., Vaulot, D., & Brussaard, C. Enumeration of Phytoplankton, Bacteria, and Viruses in Marine Samples. In: *Current Protocols in Cytometry*, (J.P. Robinson, Z. Darzynkiewicz, P. Dean, L. Dressler, P.Rabinovitch, C. Stewart, H. Tanke, L. Wheelless, eds.) J.Wiley & Sons, Inc., New York, 6.2.1 - 6.2.15, 1997.
- Dubelaar, G. B. J., & Jonker, R. R. (2000). Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Scientia Marina*, 64(2), 135-156.

- Gasol, J. M., & Del Giorgio, P. A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64(2), 197-224.ç
- Hofstraat, J. W., Van Zeijl, W. J. M., De Vreeze, M. E. J., Peeters, J. C. H., Peperzak, L., Colijn, F., & Rademaker, T. W. M. (1994). Phytoplankton monitoring by flow cytometry. *Journal of Plankton Research*, 16(9), 1197-1224.
- Jones, J. G. (1979). Guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in fresh water. In *Guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in fresh water*. Freshwater Biological Association.
- Kemp, P. F., Cole, J. J., Sherr, B. F., & Sherr, E. B. (Eds.). (1993). *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. CRC Press.
- Kirchman, D. L., & Hanson, T. E. (2012). Bioenergetics of photoheterotrophic bacteria in the oceans. *Environmental microbiology reports*, 5(2), 188-199.
- Kirk, J. T. O. (2011). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, Cambridge University Press.
- Lomas, M. W., Bronk, D. A., & van den Engh, G. (2011). Use of flow cytometry to measure biogeochemical rates and processes in the ocean. *Annual review of marine science*, 3, 537-566.
- MacIsaac, E. A., & Stockner, J. G. (1993). Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla, 187-197.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., & Vaulot, D. (1997). Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 186-193.

- Marie, D., Simon, N., & Vaultot, D. (2005). Phytoplankton cell counting by flow cytometry. *Algal Culturing Techniques*, 253-268.
- Miracle, M. R., Camacho, A., Julia, R., & Vicente, E. (2001). Sinking processes and their effect on the sedimentary record in the meromictic Lake La Cruz (Spain). *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 27(3), 1209-1213.
- Monfort, P., & Baleux, B. (1992). Comparison of flow cytometry and epifluorescence microscopy for counting bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*, 13(2), 188-192.
- Olson, R. J., Zettler, E. R., & Anderson, O. K. (1989). Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry*, 10(5), 636-643.
- Parkin, T. B., & Brock, T. D. (1981). Photosynthetic bacterial production and carbon mineralization in a meromictic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 91(3).
- Peeters, J. C. H., Dubelaar, G. B. J., Ringelberg, J., & Visser, J. W. M. (1989). Optical plankton analyser: A flow cytometer for plankton analysis, I: Design considerations. *Cytometry*, 10(5), 522-528.
- Petersen, T. W., Harrison, C. B., Horner, D. N., & van den Engh, G. (2012). Flow cytometric characterization of marine microbes. *Methods*, 57(3), 350-358.
- Phinney, D. A., & Cucci, T. L. (1989). Flow cytometry and phytoplankton. *Cytometry*, 10(5), 511-521.
- Rodrigo, M. A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (2000). The role of light and concentration gradients in the vertical stratification and seasonal development of phototrophic bacteria in a meromictic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 148(4), 533-548.

- Romero-Viana, L., Keely, B. J., Camacho, A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (2010). Primary production in Lake La Cruz (Spain) over the last four centuries: reconstruction based on sedimentary signal of photosynthetic pigments. *Journal of Paleolimnology*, 43(4), 771-786.
- Rutten, T., Sandee, B., & Hofman, A. R. (2005). Phytoplankton monitoring by high performance flow cytometry: a successful approach?. *Cytometry Part A*, 64(1), 16-26.
- Schiaffino, M. R., Gasol, J. M., Izaguirre, I., & Unrein, F. (2013). Picoplankton abundance and cytometric group diversity along a trophic and latitudinal lake gradient. *Aquatic Microbial Ecology*, 68, 231-250.
- Stockner, J. G. (1988). Phototrophic picoplankton: an overview from marine and freshwater ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 33, 765-775.
- Toepel, J., Wilhelm, C., Meister, A., Becker, A., & del Carmen Martinez-Ballesta, M. (2004). Cytometry of freshwater phytoplankton. *Methods in cell biology*, 75, 375-407.
- Trask, B. J., Van den Engh, G. J., & Elgershuizen, J. H. B. W. (1982). Analysis of phytoplankton by flow cytometry. *Cytometry*, 2(4), 258-264.
- Troussellier, M., Courties, C., & Vaquer, A. (1993). Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 111-121.
- Utermöhl, H. (1958). Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitt. int. Ver. theor. angew. Limnology.*, 9, 1-38.
- Vaillancourt, R. D., Brown, C. W., Guillard, R. R., & Balch, W. M. (2004). Light backscattering properties of marine phytoplankton: relationships to cell size, chemical composition and taxonomy. *Journal of plankton research*, 26(2), 191-212.

- Veldhuis, M. J., & Kraay, G. W. (2000). Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Scientia Marina*, 64(2), 121-134.
- Vicente, E., & Miracle, M. R. (1988). Physicochemical and microbial stratification in a meromictic karstic lake of Spain. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 23, 522-529.
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., & Nebe-von Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 429-448.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: Lake and River Ecosystems*, 1006 pp. Academic, San Diego, California.
- Yentsch, C. M., Horan, P. K., Muirhead, K., Dortch, Q., Haugen, E., Legendre, L., & Zahuranec, B. J. (1983). Flow cytometry and cell sorting: A technique for analysis and sorting of aquatic particles I. *Limnology and Oceanography*, 28(6), 1275-1280.
- Yentsch, C. M., & Horan, P. K. (1989). Cytometry in the aquatic sciences. *Cytometry*, 10(5), 497-499.

Capítulo 7

Asimilación inorgánica de CO₂ en la Laguna de La Cruz.

**Importancia de la fracción picoplanctónica en la
producción primaria**

7.1. Introducción

La cuantificación de la asimilación de carbono por parte de los organismos acuáticos, resulta esencial para comprender los flujos de energía y ciclos biogeoquímicos en los sistemas acuáticos en general y, en particular, en los ambientes pelágicos (Wetzel, 2001; Williams et al., 2008). Además del fitoplancton eucariota, estos procesos de asimilación de carbono implican también a organismos procariotas, tanto cianobacterias como bacterias autótrofas, quienes realizan fotosíntesis oxigénica y anoxigénica respectivamente. De igual modo, algunas bacterias y arqueas son capaces de asimilar carbono de manera autótrofa, sin intervención directa de la luz, mediante lo que se conoce como quimiolitotrofia (Berg, 2011; Hügler y Sievert, 2011; Hanson et al., 2012).

Los fuertes gradientes, tanto físicos como químicos, que se superponen en ecosistemas de agua dulce estratificados como la Laguna de La Cruz, posibilitan la concurrencia de muchos, o incluso potencialmente todos, los metabolismos autótrofos conocidos (Guerrero, 1985; Van Gernerden y Mas, 1995; Camacho et al., 2001; Casamayor et al., 2012), lo que los hace buenos modelos para llevar a cabo estudios de producción primaria. Como se describe en el capítulo 4, en la Laguna de La Cruz, las poblaciones de organismos autótrofos muestran una distribución fuertemente estratificada asociada a diferentes gradientes físico-químicos, situación en la que cabe esperar la coexistencia de la fijación de carbono fotosintética, tanto oxigénica como anoxigénica, y quimiolitotrófica. Esta última, a pesar del papel relevante que puede llegar a tener en determinadas ocasiones, constituye un metabolismo microbiano relativamente poco estudiado hasta la fecha en este tipo de ecosistemas (Camacho et al., 2001; García-Cantizano et al., 2005; Casamayor et al., 2012).

Los factores clave que regulan la asimilación autótrofa de carbono en sistemas acuáticos, son la disponibilidad de luz y sus características espectrales, la disponibilidad de nutrientes y la distribución de la biomasa en el perfil vertical (Williams et al., 2008). No sólo la carencia de luz, sino también su exceso, pueden inhibir la fotosíntesis oxigénica. Este fenómeno inhibitorio se produce en las capas más superficiales, lo que explica que las tasas de fotosíntesis más elevadas se observen generalmente en capas más profundas (Wetzel, 2001).

Son varios los métodos analíticos existentes para cuantificar la producción primaria en sistemas acuáticos. El método más comúnmente utilizado durante décadas, ha sido el basado en el uso del isótopo radiactivo ^{14}C (Nielsen, 1952), a pesar de la existencia de ciertas limitaciones inherentes al mismo (Peterson, 1980; Banse, 2002). Mediante el planteamiento metodológico apropiado, este método isotópico permite discriminar la asimilación fotosintética y quimiolitotrófica de carbono. Además, existen evidencias de que los resultados obtenidos por este método son más precisos cuando la columna de agua es relativamente estable (Marra, 2009), siendo este el caso de la Laguna de La Cruz. Además de los métodos isotópicos, en los últimos años se han desarrollado técnicas de fluorescencia pulsante para la medida del rendimiento fotosintético “*in vivo*” e “*in situ*”. Esta técnica nos proporciona información complementaria a la obtenida por ^{14}C que nos ayuda a una mejor comprensión de los mecanismos de fijación en sistemas acuáticos. El uso de la fluorescencia activa para el estudio de la fotosíntesis, tanto en fitoplancton como en plantas, ha venido desarrollándose durante las tres últimas décadas (Oxborough et al., 2012). Este método utiliza la relación entre la fluorescencia de la clorofila-*a* y la fotosíntesis, para estimar la eficiencia fotoquímica del fotosistema II. Diferentes equipos de fluorimetría activa pueden variar su protocolo de flashes a la hora de determinar parámetros fotosintéticos básicos, como la fluorescencia mínima (F_0), la fluorescencia máxima (F_m) o la eficiencia cuántica (yield).

La existencia, en la Laguna de La Cruz, de fuertes gradientes fisicoquímicos estacionales (i.e. temperatura, luz, oxígeno, nutrientes) proporciona micro-nichos bien definidos y estables, donde se desarrollan poblaciones de microorganismos diferentes que, potencialmente, presentan metabolismos adaptados a cada microambiente particular (Rodrigo et al., 2000; Casamayor et al., 2012). Esta distribución del hábitat, ya descrita en capítulos anteriores, junto con antecedentes de la bibliografía referidos a la distribución de los distintos grupos de microorganismos en la columna de agua, permite plantear hipótesis acerca del papel relativo de cada uno de ellos en la producción primaria de la laguna. Así, algunos autores sugieren que el picoplancton procariota, principalmente compuesto por picocianobacterias (Pcy), podría desempeñar un papel clave en la fijación del carbono de este lago (Camacho et al., 2003a). En el capítulo 4 ya se hace notar la notable abundancia de estas poblaciones de Pcy en la laguna, con particular relevancia de la cepa *Synechococcus sp.* AM749868 (Casamayor et al., 2012), la cual se encuentra distribuida por toda la zona fótica. Por el contrario, las fracciones nano y picoplanctónicas del fitoplancton eucariota son menos relevantes en términos de biomasa, en especial la segunda. Por otra parte, la presencia de poblaciones estables de bacterias fotosintéticas del azufre en el hipolimnion y monimolimnion de la laguna, hecho también constatado por otros autores (Rodrigo et al., 2000), hace suponerles un papel relevante en la producción primaria de la laguna, no existiendo, sin embargo, estudios previos que confirmen este supuesto.

Existen diferentes estudios que demuestran la ubicuidad, tanto de la fotosíntesis anoxigénica como la quimiolitotrofia, en aguas interiores ricas en azufre (i.e., sulfhídrico), en los cuales se describe la disposición estratificada de estos metabolismos en torno a la interfase óxico-anóxica, así como su, en ocasiones, notable contribución a la asimilación de carbono global (Camacho y Vicente, 1998; Camacho et al., 2001; Casamayor et al., 2012). Sin embargo, en lagos

donde el azufre no es tan abundante, como ocurre en la Laguna de La Cruz, estos metabolismos parecen encontrarse más restringidos a zonas profundas del hipolimnion (Enrich-Prast et al., 2009; Callieri et al., 2014), donde probablemente existan otros dadores de electrones (Walter et al., 2014).

En este capítulo se pretende adoptar la Laguna de La Cruz como modelo para evaluar la contribución relativa de los diferentes metabolismos autótrofos de asimilación de carbono inorgánico, potencialmente existentes en este tipo de sistemas. Se pretende, a su vez, poner una especial atención en la contribución relativa del componente procariota a dicha asimilación, discriminando los diferentes metabolismos involucrados (i.e., fotosíntesis oxigénica y anoxigénica, y quimiolitotrofia), con respecto a la contribución del nanoplancton eucariota. Los resultados obtenidos se pretenden relacionar con los patrones temporales y espaciales, tanto de la distribución de los microorganismos participantes como de las variables fisicoquímicas más significativas.

7.2 Metodología específica

Periodicidad y procedimientos de muestreo

Los perfiles de asimilación de carbono inorgánico, en la Laguna de La Cruz, se realizaron estacionalmente. En concreto, se realizaron cuatro perfiles que se llevaron a cabo en marzo, junio y octubre de 2006 y enero de 2007. El objetivo era tener representado: (i) el período de mezcla vertical invernal (enero), sin termoclina y con la oxiclina ubicada a 16 metros, (ii) el inicio de la estratificación a principios de primavera (marzo), con una débil termoclina y la oxiclina situada a 14,5 metros, (iii) la estratificación media (junio), con una

termoclina estable y la oxiclina situada a 12 metros, y (iv) el final del período de estratificación previo a la mezcla (octubre), con una termoclina estable y la oxiclina a 10,7 metros. Los perfiles verticales de parámetros físicos y químicos se obtuvieron con la sonda CTD (SeaBird 19) configurada con varios sensores (ver capítulo 2 de metodología para más detalles). Los puntos de ensayo del perfil vertical se eligieron, para cada muestreo, en función de los perfiles físicos y químicos "*in situ*" adquiridos con la CTD.

Experimentos de asimilación inorgánica de carbono "*In situ*"

La medida de la tasas de asimilación de carbono inorgánico en la Laguna de La Cruz, se llevó a cabo "*in situ*" mediante un marcador radioactivo ^{14}C para cada fecha de muestreo. Las profundidades de muestreo se seleccionaron de acuerdo con las variaciones espaciales, tanto en las propiedades físicas como químicas, con el fin de cubrir la heterogeneidad vertical. Los experimentos fueron diseñados para diferenciar la asimilación fotosintética (tanto oxigénica y anoxigénica) de la asimilación del carbono inorgánico oscuro. El montaje experimental (Camacho y Vicente, 1998) fue el siguiente: viales de 60 ml de policarbonato (Nunclon TM) se llenaron con el agua obtenida en cada profundidad. Este agua se distribuyó en botellas claras y oscuras (para la actividad quimiolitotrofica) y se lavó tres veces durante el llenado para evitar la contaminación de oxígeno. La mitad de las botellas transparentes se suplementaron con 1 ml de DCMU saturado (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) para inhibir la fotosíntesis oxigénica y distinguir la fotosíntesis anoxigénica. Una botella de control, que contiene 2% de formalina tamponada, también se incubó a cada profundidad. Además, en los experimentos llevados a cabo entre octubre de 2006 y enero de 2007, otras botellas que contenían el antibiótico cicloheximida se incubaron en algunas profundidades de inhibir la fotosíntesis oxigénica de algas eucariotas (Hamasaki et al., 1999). Esto permite

discernir la contribución relativa de picocianobacteria y algas eucarióticas al total de la fotosíntesis oxigénica. Todas las incubaciones se realizaron por duplicado. Una vez que se prepararon las botellas, se añadió una solución de $\text{NaH}_2^{14}\text{CO}_3$ con una actividad específica de $4\mu\text{Ci ml}^{-1}$ en cada botella. Las botellas se mantuvieron en la oscuridad durante todo el proceso de manipulación y se comprobó la ausencia de burbujas. Luego, las botellas fueron suspendidas a la misma profundidad que se recogieron. Las muestras se incubaron durante 4 horas y luego se fijaron con formaldehído tamponado (concentración final 2%) para detener la asimilación del carbono inorgánico. Un volumen de 10 a 30 ml (dependiendo de las concentraciones de células) de cada muestra se filtró a través de filtros de policarbonato de $0,2\ \mu\text{m}$ (Nuclepore™). Los filtros se lavaron dos veces con 1% de HCl (v / v) para eliminar precipitados ^{14}C -carbonato, y finalmente se lavaron con tampón TE (Tris HCl pH 8.5-EDTA). Después, los filtros se mantuvieron dentro de viales de centelleo y se secaron durante 24 h. Una vez que los filtros estaban secos, los viales de centelleo se llenaron con 10 ml de cóctel de centelleo (Ultima Gold, Canberra) para medir la radiactividad usando un contador de centelleo líquido Beckman LS7800™. Los recuentos de desintegración obtenidos en los controles tratados con formalina, se restaron de las muestras incubadas regulares a la misma profundidad. Se calculó, entonces, el carbono asimilado, teniendo en consideración el carbono inorgánico total presente en el agua, que se estima a partir de las mediciones de pH y alcalinidad (Rodier, 1996).

Cálculos integrados por área y análisis estadístico

La asimilación de carbono diaria, integrada en función del área, fue expresada como $\text{mg C m}^2 \text{ día}^{-1}$ (Wetzel, 2001). Para determinar con la mayor precisión posible la importancia de todas las variables expresadas en función del área (m^2), biomasa de asimilación de carbono inorgánico. La integración se hizo con

una ponderación adecuada, teniendo en cuenta la hipsografía de la laguna determinada en el capítulo 3, multiplicando el valor de la variable a una profundidad dada por el volumen real de agua a esa profundidad. Los valores obtenidos fueron integrados numéricamente por la regla de Simpson (Auer y Canale, 1986), para toda la columna de agua, y el valor integrado total se dividió por la superficie real del lago. La integración diaria para la producción primaria se calculó según Wetzel (2001). La integración numérica de los valores estacionales de asimilación de carbono inorgánico, se realizó para estimar los valores totales anuales de producción (g C año^{-1}) de la fotosíntesis oxigénica, la fotosíntesis anoxigénica y la asimilación oscura. Las correlaciones entre las distintas variables de estudio se realizaron utilizando el software SPSS (versión 17).

Fluorescencia pulsante

“PhytoFlash” es un sistema de fluorescencia “*in situ*” variable, que puede ser utilizada para determinar la eficiencia cuántica del fitoplancton en ambientes oligotróficos y mesotróficos. Esta técnica utiliza 3 luces de baja intensidad de emisión de diodos (LED) para monitorizar la fluorescencia mínima (F_0) y 6 LEDs de alta intensidad para saturar las células de las poblaciones fotosintéticas en la cámara de muestra y medir la fluorescencia máxima (F_m). Con estos datos se obtiene la eficiencia fotoquímica del PSII, (yield) o rendimiento fotosintético ($F_m - F_0 / F_m$). La curva de respuesta del flash saturado se puede ver en el modo laboratorio. A diferencia de otros instrumentos de fluorescencia variable, el “PhytoFlash” no proporciona datos de la curva de inducción y no está diseñado como un instrumento fisiológico para uso en laboratorio. Más bien, está diseñado como un sistema de fluorescencia variable de uso simplificado y robusto para el uso sumergible y/o de laboratorio.

7.3. Resultados

Perfiles físicos y químicos

A principios de la primavera (muestreo de marzo) aún no se ha formado la termoclina, aunque comienza a aumentar la concentración de clorofila-*a* en torno al 0,1% del PAR y la oxiclina comienza a subir desde la picnoclina (figura 7.1).

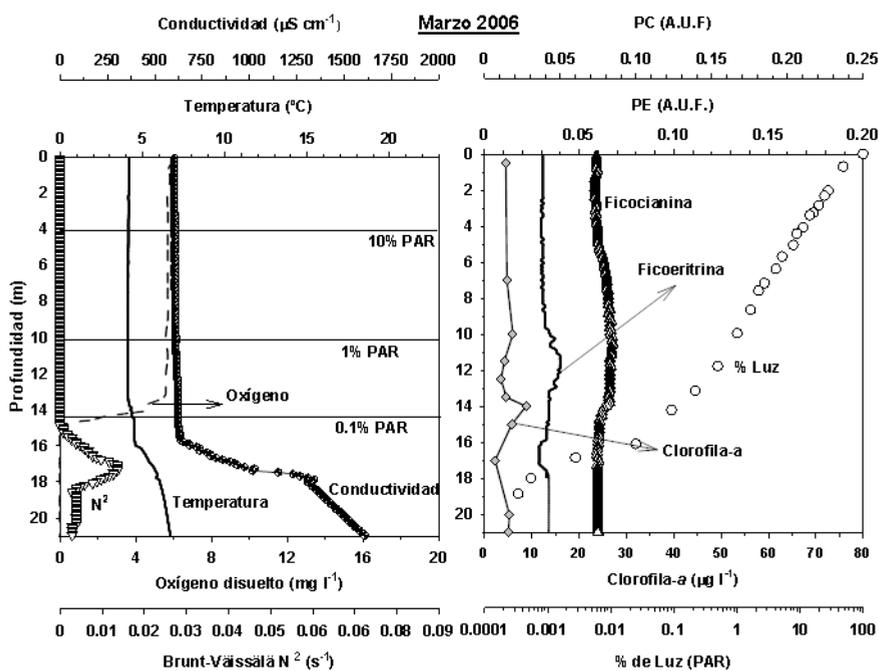


Figura 7.1. Perfiles verticales de temperatura, conductividad, frecuencia de Brunt Väissälä (N^2), % de luz (PAR), clorofila-*a*, ficoeritrina y ficocianina, en marzo de 2006, en la Laguna de La Cruz.

No se observan incrementos significativos en la concentración de ficoeritrina y ficocianina.

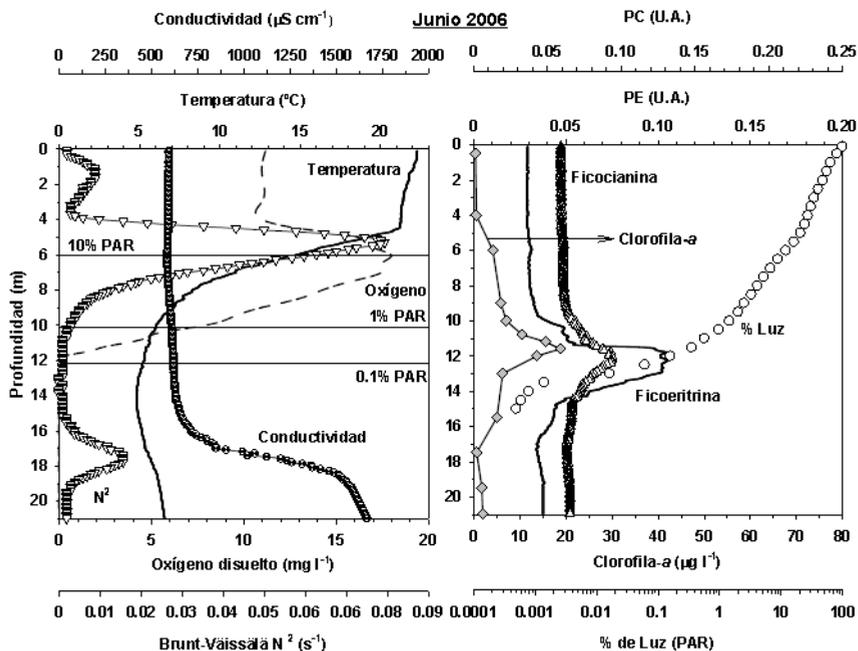


Figura 7.2. Perfiles verticales de temperatura, conductividad, frecuencia de Brunt Väissälä (N^2), % de luz (PAR), clorofila-*a*, ficoeritrina y ficocianina, en junio de 2006, en la Laguna de La Cruz.

En el muestreo de verano, junio de 2006, la estratificación térmica está perfectamente establecida, con una fuerte termoclina entre 5 y 12 metros (figura 7.2). El máximo de oxígeno se sitúa a 6 metros de profundidad y la extinción de oxígeno a 12 metros. Se observan dos máximos de estabilidad de Brunt Väissälä a 5 y 18 metros de profundidad. El máximo profundo de clorofila-*a* se localiza en torno a los 12 metros de profundidad acompañado de máximos de ficoeritrina y ficocianina.

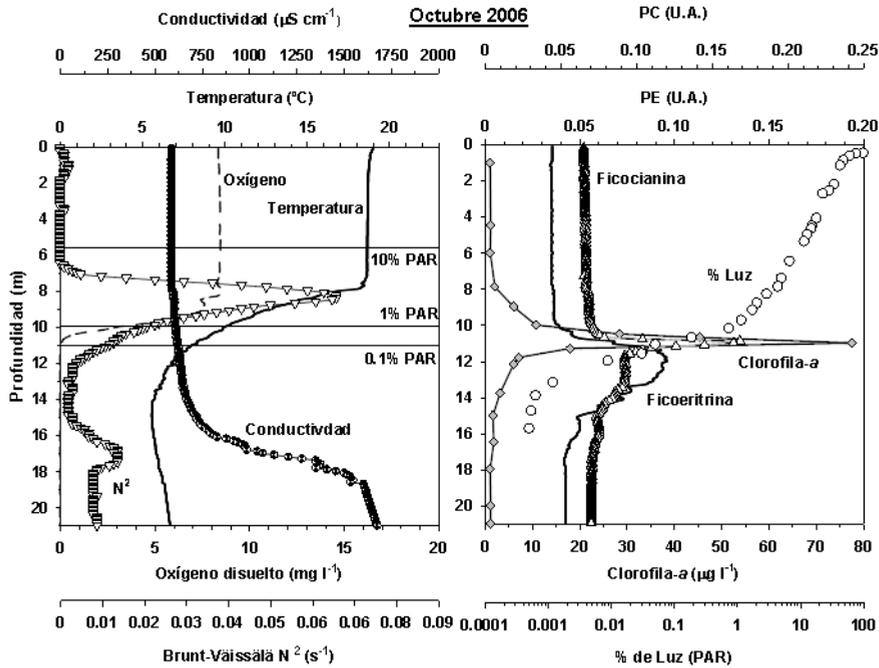


Figura 7.3. Perfiles verticales de temperatura, conductividad, frecuencia de Brunt Väissälä (N^2), % de luz (PAR), clorofila-*a*, ficoeritrina y ficocianina, en octubre de 2006, en la Laguna de La Cruz.

Al final del periodo de estratificación, en octubre de 2006, se observa el marcado descenso de la termoclina (figura 7.3), lo que aumenta de manera muy importante el volumen del epilimnion. La concentración de oxígeno disuelto y las frecuencias de Brunt Väissälä disminuyen respecto a periodo estival. El máximo de clorofila-*a* se hace mucho más acentuado llegando a un valor máximo de concentración de $80 \mu\text{g l}^{-1}$. Las concentración de ficoeritrina y ficocianina también se acentúan en torno al DCM.

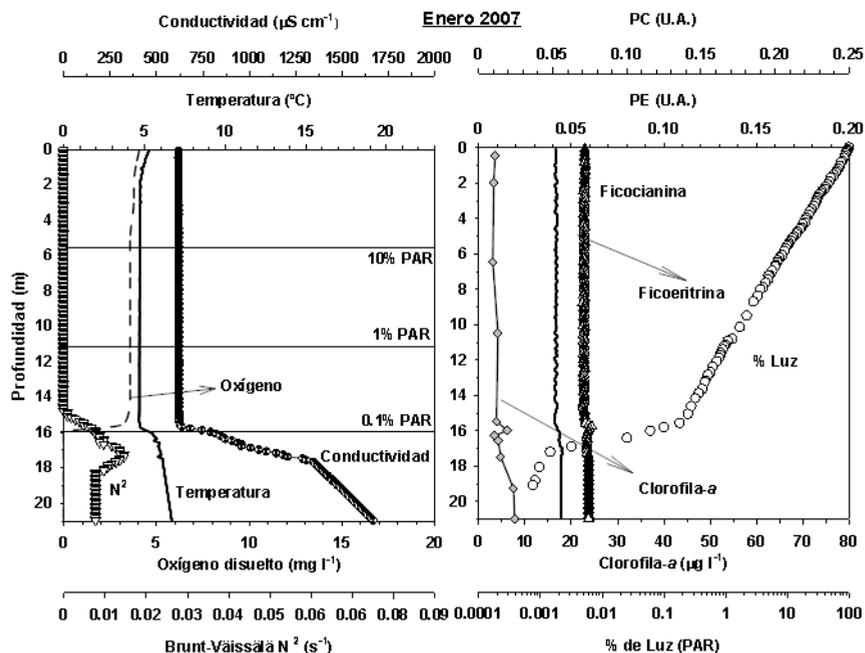


Figura 7.4. Perfiles verticales de temperatura, conductividad, frecuencia de Brunt Väissälä (N^2), % de luz (PAR), clorofila-*a*, ficoeritrina y ficocianina, en enero de 2007, en la Laguna de La Cruz.

En enero de 2007, tras la mezcla vertical se observa la homogeneización de los diferentes parámetros físicos y químico (figura 7.4). Desaparece el DCM y los máximos de los pigmentos asociados. También se observa un importante descenso en todo el mixolimnion de la concentración de oxígeno disuelto.

Asimilación de carbono inorgánico.

La producción anual integrada en la columna de agua de la Laguna de La Cruz durante el ciclo limnológico 2006-2007, estimada a partir de los muestreos estacionales llevados a cabo, fue de $183,6 \text{ g C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$. La mayor parte de esta

producción fue debida a procesos dependientes de la luz (92,4%), particularmente a la fotosíntesis oxigénica (89,7%), mientras que la fotosíntesis anoxigénica constituyó únicamente un 2,7% del total. El 7,6% restante tuvo su origen en procesos quimiolitotrofos. Si comparamos entre diferentes momentos del ciclo limnológico, observamos que, durante el período de mezcla las tasas diarias fueron de 326,2 mg C m² día⁻¹ y 245,3 mg C m² día⁻¹, en enero y marzo respectivamente, incrementando, durante el período de estratificación térmica, hasta valores de 516,5 mg C m² día⁻¹ en junio y máximos de 745,2 mg C m² día⁻¹ en octubre.

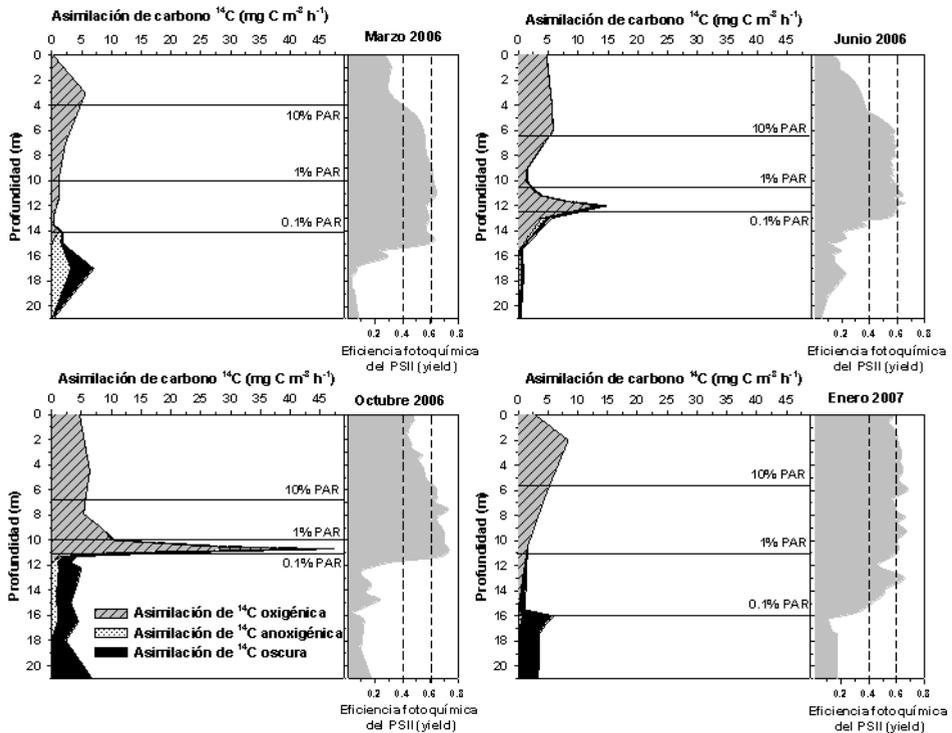


Figura 7.5. Perfiles de áreas acumuladas de las tasas de asimilación de carbono ¹⁴C (mg C m⁻³ h⁻¹) de la fotosíntesis oxigénica, anoxigénica y fijación oscura, en la columna de agua de la Laguna de La Cruz.

En términos volumétricos, la fotosíntesis oxigénica durante la mezcla, limitada al mixolimnion, mostró máximos sub-superficiales entre los 2 y 4 metros de 5,6 mg C m⁻³ h⁻¹ en marzo y 8,4 mg C m⁻³ h⁻¹ en enero (tabla 7.2). Durante el período de estratificación, algo más de la mitad de esta fotosíntesis tuvo lugar en el epilimnion, con valores promedio ligeramente inferiores (4,8 mg C m⁻³ h⁻¹). No obstante, casi un 40% de la actividad fotosintética durante este período se produjo en el metalimnion, alcanzando valores de 12,9 mg C m⁻³ h⁻¹.

Estas tasas estuvieron asociadas a la presencia de una población de picocianobacterias ricas en ficoeritrina, ubicadas aproximadamente a 12 m de profundidad, en la interfase óxico-anóxica, y expuestas a unos niveles de radiación PAR de entre el 0,1 y 1% de la luz incidente en superficie. A pesar de la reducción observada en la fotosíntesis oxigénica durante la estratificación otoñal, en el global de la laguna, este máximo profundo de picocianobacterias, ubicado entonces entre 10 y 11 m de profundidad, aumentó sus tasas fotosintéticas hasta valores de 42,2 mg C m⁻³ h⁻¹ (tabla 7.2), lo que representa los valores más elevados medidos durante todo el período de estudio.

La inhibición específica de la actividad eucariota con cicloheximida mostró que el 80,5% de esta actividad fotosintética, durante el muestreo de estratificación otoñal (octubre), era atribuible a estas picocianobacterias, una situación similar a la observada durante el muestreo de mezcla (enero). Sin embargo, la contribución fue más equilibrada en la parte inferior del metalimnion, con una contribución de hasta el 52% por parte de los eucariotas (tabla 7.1), debido a la presencia de un máximo profundo de nanoflagelados (*Cryptomonas* sp.).

Tabla 7.1. Porcentaje de contribución del nanofitoplancton eucariota y de las Pcy respecto a la fotosíntesis oxigénica en las diferentes capas de la laguna.

% de contribución respecto a la fotosíntesis oxigénica			
Fecha		<i>Algas eucariotas</i>	<i>Pcy</i>
Octubre 2006	Epilimnion	19	81
	Metalimnion superior	20	80
	Metalimnion inferior	52	48
	Hipolimnion	---	---
Enero 2007	Monimolimnion	---	---
	Mixolimnion superior	20	80
	Mixolimnion inferior	2	98
	Monimolimnion	---	---

La fotosíntesis anoxigénica, a pesar de su menor relevancia en la producción global del lago, mostró, no obstante, un claro progreso con el desarrollo de la estratificación (figura 7.5). Así, las tasas más bajas registradas en enero ($1,0 \text{ mg C m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) contrastaron marcadamente con los valores máximos observados en octubre ($43,3 \text{ mg C m}^{-2} \text{ día}^{-1}$), mientras que las mediciones de marzo y junio representaron valores intermedios de $7,9$ y $14,0 \text{ mg C m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, respectivamente. Durante el período de mezcla, en torno al 80% de esta fotosíntesis anoxigénica tuvo lugar en el monimolimnion, mientras que una menor proporción se produjo a lo largo de la interfase óxico-anóxica (tabla 7.1). Esta fracción situada entre los límites del metalimnion e hipolimnion, justo por debajo de las tasas máximas de fotosíntesis oxigénica, aumentó durante el período de estratificación, alcanzando en octubre valores de $8,2 \text{ mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (tabla 7.2).

Capítulo 7

Tabla 7.2. Asimilación inorgánica de carbono integrada para toda la laguna ($\text{mg C m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ y % del total) de la fotosíntesis oxigénica, anoxigénica y asimilación oscura (quimiolitotrofia), junto con su contribución en las diferentes capas de la laguna (mixolimnion, epilimnion, metalimnion, hipolimnion y monimolimnion).

Toda la laguna							
Fecha	Asimilación de Carbono		Capa	Volumen			
	$\text{mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$	(%)		(%)	$\text{mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$	(%)	
Marzo 2006	Oxigénica	214.9	87.6	Mixolimnion	96.7	214.9	100
				Monimolimnion	3.3	0	0
	Anoxigénica	7.9	3.2	Mixolimnion		1.7	21.6
				Monimolimnion		6.2	78.4
	Oscura	22.6	9.2	Mixolimnion		2.0	8.9
Monimolimnion					20.6	91.1	
Total	245.3						
Junio 2006	Oxigénica	481.7	93.2	Epilimnion	40.2	271.4	56.4
				Metalimnion	49.3	190.1	39.5
				Hipolimnion	7.2	20.2	4.2
				Monimolimnion	3.3	0	0
	Anoxigénica	14.0	2.7	Epilimnion		0	0.1
				Metalimnion		2.8	20.3
				Hipolimnion		10.0	71.5
				Monimolimnion		1.1	8.1
	Oscura	20.8	4.0	Epilimnion		0	0
				Metalimnion		5.1	24.3
				Hipolimnion		13.5	64.7
				Monimolimnion		2.3	11.0
	Total	516.5					
Octubre 2006	Oxigénica	553.2	74.2	Epilimnion	69.5	265.7	48.0
				Metalimnion	14.4	282.3	51.0
				Hipolimnion	13.2	5.3	1.0
				Monimolimnion	3.3	0	0
	Anoxigénica	43.4	5.8	Epilimnion		0.3	0.8
				Metalimnion		5.8	13.5
				Hipolimnion		36.7	84.6
				Monimolimnion		0.5	1.2
	Oscura	148.6	19.9	Epilimnion		1.1	0.8
				Metalimnion		9.0	6.0
				Hipolimnion		108.4	73.0
				Monimolimnion		30.1	20.2
	Total	745.2					
Enero 2007	Oxigénica	286.0	87.7	Mixolimnion	96.7	286.0	100
				Monimolimnion	3.3	0	0
	Anoxigénica	1.0	0.3	Mixolimnion		0.2	19.1
				Monimolimnion		0.8	80.9
	Oscura	39.3	12.0	Mixolimnion		3.7	9.5
Monimolimnion					35.5	90.5	
Total	326.2						

Las tasas de asimilación de carbono por quimiolitotrofia en la columna de agua fueron bajas durante el período de mezcla y particularmente al inicio de la estratificación (tabla 7.2); con valores integrados de toda la columna de agua

oscilando entre 20,8 y 39,3 mg C m⁻² día⁻¹, pero localizándose, principalmente (~90%), en el monimolimnion anóxico. Estas tasas aumentaron durante el período de estratificación otoñal, alcanzando valores de 148,6 mg C m⁻² día⁻¹, e incrementando (~30%), a su vez, su presencia en el metalimnion microaerófilo.

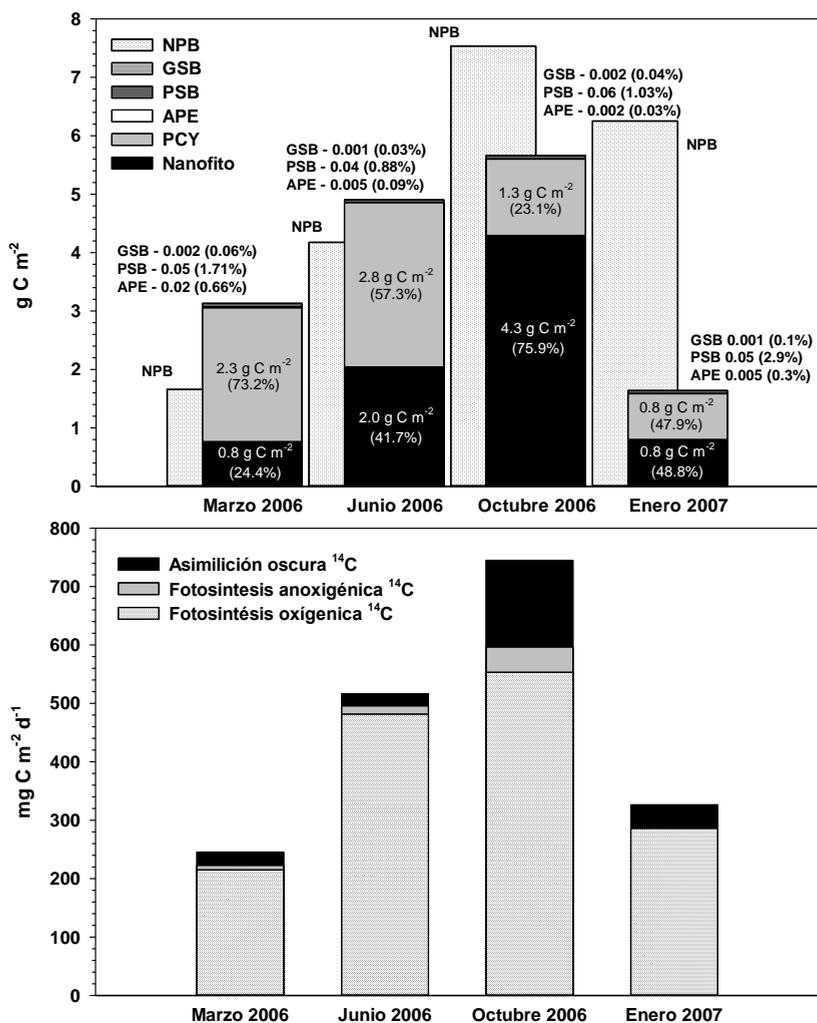


Figura 7.6 A) biomasa total (g m⁻² C) y % la contribución a la biomasa (con ponderación por volumen) para la columna de agua integrada, nanofitoplancton,

picoplancton procariota autótrofo (Pcy) picoplancton eucariótico autótrofo (Ape), bacteria púrpura del azufre (PSB), bacterias verdes de azufre (GSB) y bacterias no fotosintéticas (NPB) en el lago de la Cruz. B) asimilación de carbono inorgánico total (en la totalidad del lago, ponderado por el volumen asimilación real, $\text{mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) a través de la columna de agua, integrando la fotosíntesis oxigénica, la fotosíntesis anoxigénica y la asimilación de carbono inorgánico oscuro (quimiolitotrofia) en la Laguna de La Cruz.

Tasas de producción específica y ratios P/B

Las tasas fotosintéticas normalizadas por unidad de pigmento y la relación producción/biomasa (P/B), variaron estacionalmente a lo largo de la columna de agua (figura 7.7). Las tasas más elevadas de fotosíntesis oxigénica se midieron en superficie durante la estratificación térmica, con valores de 4,6 y 8,0 $\text{mg C (mg clorofila-}a\text{)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en junio y octubre respectivamente. Se detectó también, en junio, un máximo relativo metalimnético, a 12 m de profundidad, de aproximadamente 1 $\text{mg C (mg clorofila-}a\text{)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, asociado a la población de picocianobacterias. La relación P/B, en el caso de la fotosíntesis oxigénica, fue máxima en enero ($0,4 \text{ d}^{-1}$) a 2 m de profundidad, mostrando un ligero descenso tanto en magnitud ($\sim 0,3 \text{ d}^{-1}$), como en profundidad al inicio de la estratificación. Esta situación contrastó con lo observado en el período avanzado de estratificación (octubre), cuando los valores epilimnéticos del ratio estuvieron en torno a 1 d^{-1} , mientras que los valores máximos durante este período ($\sim 2 \text{ d}^{-1}$) se localizaron entre los 10 y 12 m de profundidad, coincidiendo también con la presencia de la población de picocianobacterias antes mencionada.

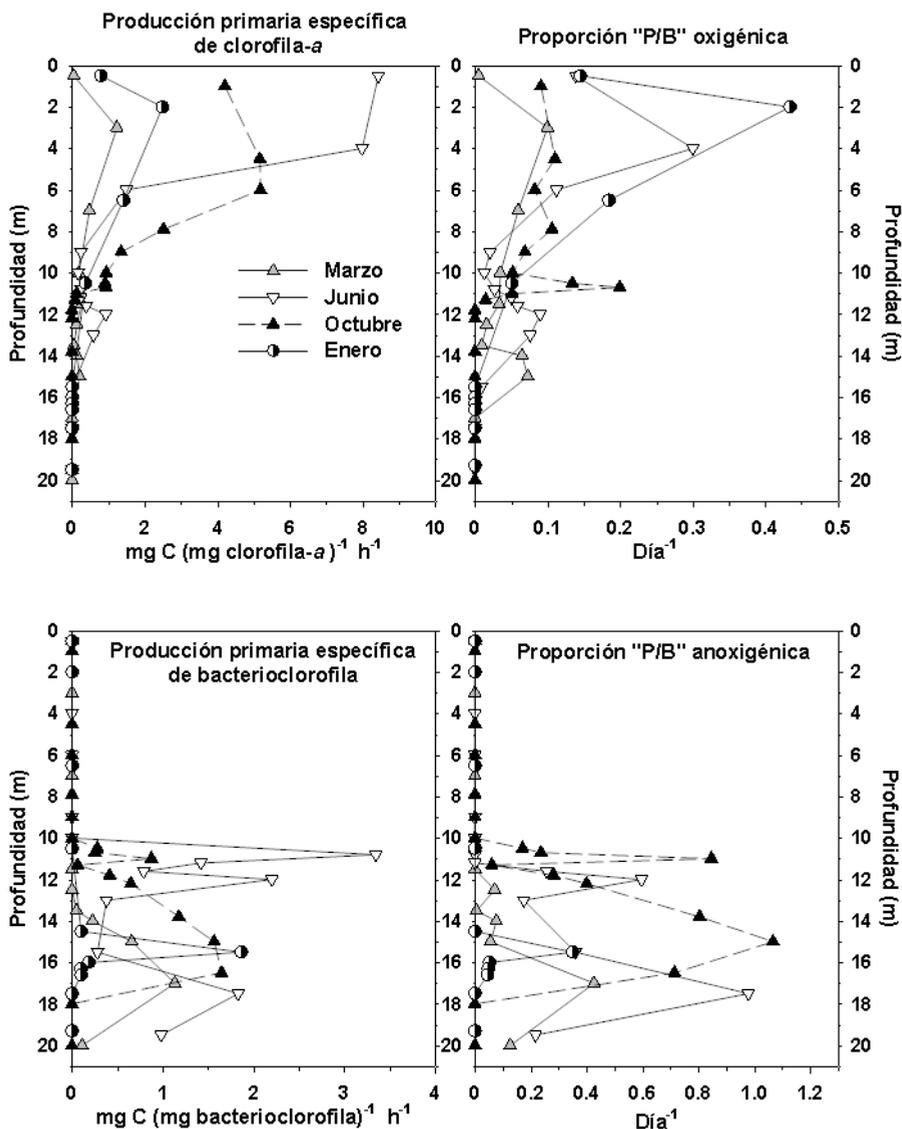


Figura 7.7. Producción específica de Clorofila-*a* y de Bacterioclorofila (números de asimilación) en relación con el “ratio P/B“ oxigénico y anoxigénico en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz.

Por lo que respecta a la fotosíntesis anoxigénica, las tasas durante el período de mezcla no superaron los valores de $1,2 \text{ mg C (mg Bacterioclorofila)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con

tasas máximas produciéndose en torno a la picnoclina. Por otra parte, al inicio de la estratificación fue posible distinguir la aparición de un pico localizado en la interfase óxico-anóxica, con una tasa de $3,5 \text{ mg C (mg bacterioclorofila)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y otro levemente más profundo, de $2 \text{ mg C (mg bacterioclorofila)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Los ratios P/B durante el período de mezcla variaron, en este caso, entre 0,3 y $0,4 \text{ d}^{-1}$, con valores máximos en la picnoclina, en correspondencia con las tasas anteriormente mencionadas. Por otra parte, siguiendo también el mismo patrón, durante el progreso de la estratificación térmica, estos ratios se hicieron máximos, $0,6-1,0 \text{ d}^{-1}$ y $0,9-1,1 \text{ d}^{-1}$ en junio y octubre, respectivamente, manteniendo su localización en el límite de la zona fótica de la columna de agua.

Correlaciones entre las tasas de fijación y parámetros poblacionales de la comunidad microbiana

Los coeficientes de correlación de Pearson, así como su significancia estadística, obtenidos entre las tasas de asimilación de carbono y distintos parámetros poblacionales de la comunidad microbiana se muestran en la tabla 7.3. Las únicas variables que mostraron una correlación significativa con las tasas de fotosíntesis oxigénica, al agrupar todos los muestreos en el análisis, fueron la clorofila-*a*, así como las poblaciones de nano y picofitoplancton. Sin embargo, en marzo y junio, las tasas de fotosíntesis oxigénica se correlacionaron positivamente sólo con la biomasa del picoplancton autótrofo, pero no, en cambio, con la concentración de la clorofila-*a* o con el resto de poblaciones fotosintéticas. Por el contrario, durante el muestreo de octubre, sí fue posible observar una correlación significativa, no sólo con la biomasa de picoplancton autótrofo, sino también con las concentraciones de clorofila-*a* y ficoeritrina. Por su parte, ni las tasas de fotosíntesis anoxigénica o quimiolitotróficas se correlacionaron significativamente con la biomasa de

ninguno de los grupos de bacterias del azufre, ni con el bacterioplancton no fotosintético. Sí fue posible, no obstante, observar una correlación positiva leve, aunque no significativa, entre las bacterias verdes del azufre y la asimilación oscura de carbono durante este período. Por el contrario, en enero, tanto las bacterias púrpura como las verdes del azufre se correlacionaron de forma significativa con tasas de asimilación oscura de carbono pero no, en cambio, con las de fotosíntesis anoxigénica.

Tabla 7.3. Correlaciones estadísticas (valores de significancia y Pearson) que se encuentran entre la diferente asimilación de carbono inorgánico (fotosíntesis oxigénica, anoxigénica y asimilación oscura) frente a la concentración de la clorofila-*a*, nanofitoplancton eucariota, picocianobacterias (*Pcy*) del picoplancton eucariótico (*Ape*), bacterias púrpuras de azufre (*PSB*) y bacterias verdes del azufre (*GSB*) en la Laguna de La Cruz, tanto estacionalmente como para todas las muestras.

Fecha	Asimilación de carbono		Clorofila- <i>a</i>	Nanofito	<i>Pcy</i>	<i>PE</i>	<i>PSB</i>	<i>GSB</i>
Marzo 2006	Oxigénica	Pearson	0.004	0.602	0,882**	0.374		
		p-valor	0.992	0.114	0.004	0.362		
	Anoxigénica	Pearson					0.488	
		p-valor					0.326	
	Oscura	Pearson					0.447	0.777
		p-valor					0.374	0.069
Junio 2006	Oxigénica	Pearson	0.730	-0.695	0,835*	0.515		
		p-valor	0.100	0.126	0.039	0.296		
	Anoxigénica	Pearson					0.602	0.340
		p-valor					0.206	0.510
	Oscura	Pearson					0.609	
		p-valor					0.199	
Octubre 2006	Oxigénica	Pearson	0,980**	0.537	0,940**	0,897**		
		p-valor	0.000	0.170	0.001	0.003		
	Anoxigénica	Pearson					0.462	-0.503
		p-valor					0.296	0.25
	Oscura	Pearson					-0.12	-0.15
		p-valor					0.797	0.749
Enero 2007	Oxigénica	Pearson	-0.781	-0.351	-0.839	0.426		
		p-valor	0.219	0.649	0.161	0.574		
	Anoxigénica	Pearson					-0.018	0.005
		p-valor					0.974	0.993
	Oscura	Pearson					0,915*	0,912*
		p-valor					0.011	0.011
Total	Oxigénica	Pearson	0.851**	0.544**	0.694**	0.046		
		p-valor	0.000	0.001	0.000	0.184		
	Anoxigénica	Pearson					0.055	-0.033
		p-valor					0.105	0.909
	Oscura	Pearson					-0.023	-0.008
		p-valor					0.584	0.401

** Correlacion es significativa al 0.01 (2-colas).

* Correlacion es significativa al 0.05 (2-colas).

Fluorescencia activa

Los datos obtenidos por fluorescencia activa del rendimiento fotosintético en la columna de agua, muestran valores bajos en el epilimnion, que aumentan a niveles de alta eficiencia (entre 0,4 y 0,6) en el metalimnion. En el hipolimnion los valores descienden por debajo de 0,2 (figura 7.8).

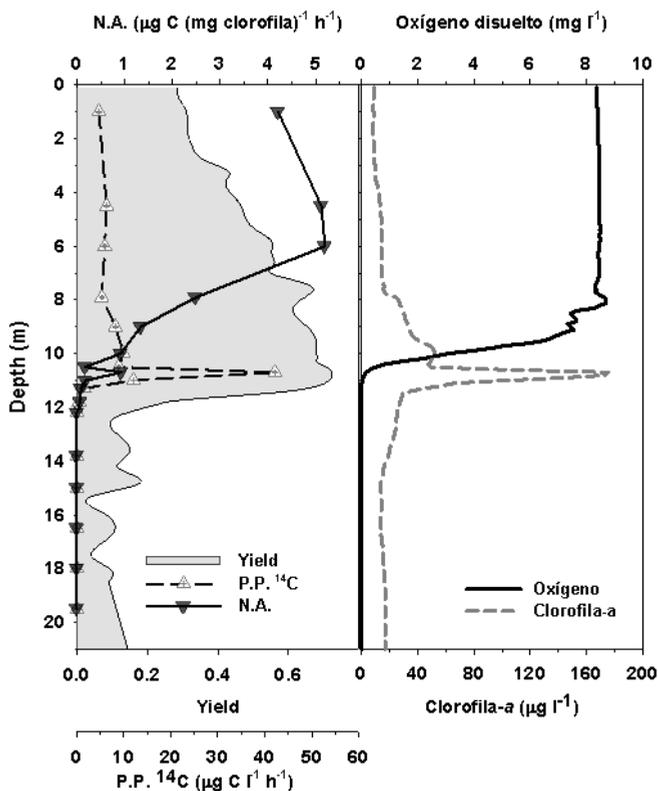


Figura 7.8. Perfiles verticales de diferentes parámetros físicos y químicos, en octubre de 2006, en la Laguna de La Cruz

Respecto a los datos de asimilación inorgánica de carbono ^{14}C , los datos de rendimiento fotosintético muestran que, donde se observa el máximo de asimilación DCM, también se localiza el máximo rendimiento fotosintético. Sin

embargo, este rendimiento se mantiene alto en todo el metalimnion, indicando la capacidad de las poblaciones metalimnéticas para tener un alto rendimiento fotosintético.

7.4. Discusión

Desde los primeros estudios relacionados con los ecosistemas acuáticos, la producción primaria es uno de los temas más discutidos en limnología y oceanografía (Hutchinson, 1967, Wetzel, 2001). Históricamente, el concepto de la producción primaria se ha relacionado particularmente con la fotosíntesis y, con exclusividad, a la fotosíntesis oxigénica. No obstante, la asimilación autótrofa de carbono no se limita a fotoautótrofos oxigénicos, sino que incluye también a los fotoautótrofos anoxigénicos y quimiolitotrofos. La relevancia de estos metabolismos alternativos en el ciclo biogeoquímico del carbono de los lagos, así como la importancia relativa de los procariotas en dichos procesos, merece ser evaluada con mayor precisión.

La Laguna de La Cruz representa un modelo adecuado en este sentido, en nuestro estudio observamos una notable dinámica en estos diferentes metabolismos autótrofos, tanto temporal como espacial. Estas variaciones responden, principalmente, a la distribución de las biomásas de las distintas poblaciones de microorganismos, la intensidad y características espectrales de la luz que reciben, y a la disponibilidad de donadores de electrones. En este sentido, existen estudios que muestran la relación positiva existente entre la presencia de microhábitats en la columna de agua y las tasas de fijación de carbono (Dokulil y Kaiblinger, 2009), lo que podría explicar, por ejemplo, las menores tasas observadas en el medio marítimo. La presencia de diversidad de microhábitats en la columna de agua parece ser una característica intrínseca también de la Laguna de La Cruz.

Nuestra estimación de la producción anual del lago, en buena parte originada de la fotosíntesis oxigénica, y que durante el ciclo estudiado se sitúa en torno a $184 \text{ g C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$, está obtenida a partir de las mediciones realizadas únicamente en la columna de agua, aunque constituyen, no obstante, una buena aproximación producción total debido al hecho de que la morfología del lago impide que la contribución del bentos sea importante. Estas estimaciones se encuentran dentro del rango observado en lagos mesotróficos (de $100\text{-}300 \text{ g C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$) de acuerdo con la clasificación de la Wetzel (2001), y están dentro de los rangos esperados para lagos de zonas templadas (Field et al., 1998; Dokulil y Kaiblinger, 2009). Incluso considerando la variabilidad estacional observada en nuestro estudio, con tasas de asimilación de carbono que oscilan entre 214 y 745 $\text{mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, siendo más elevadas durante el período de estratificación, estos valores seguirían estando dentro del rango establecido para sistemas mesotróficos, definido entre 250 y $1.000 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Dokulil y Kaiblinger, 2009), y a su vez estarían notablemente alejados de los valores considerados para sistemas hipertróficos ($10.000 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$; Falkowsky y Raven, 2007). No obstante, es cierto que el lago se encuentra algo más próximo al límite de la oligotrofia ($100 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) en el período de mezcla, aunque existen distintas circunstancias que alejan a la laguna de este estado trófico.

Tanto el fitoplancton eucariota como las picocianobacterias participan de la actividad fotosintética observada. Sin embargo, nuestros resultados muestran cómo la contribución de las últimas puede llegar a ser muy importante cuando se dan determinadas condiciones en la zona fótica, hecho observado también en otros lagos estratificados de características similares a La Cruz (Padisák et al., 1997; Dokulil y Teubner, 2000). Esta dominancia del picoplancton procariota en la producción de la laguna, y que nosotros observamos durante determinados períodos, respondería en parte, a la mayor eficiencia que presentan en la absorción de nutrientes, debido a su mayor relación superficie/volumen celular

(Stockner, 1988; Camacho et al., 2003b; Callieri, 2008) pero que sólo resulta una ventaja competitiva cuando las concentraciones de nutrientes resultan limitantes para el desarrollo del plancton, circunstancia que en La Cruz se da de forma más severa conforme avanza el período de estratificación.

La asimilación diaria de carbono inorgánico por fotosíntesis oxigénica, se sitúa en un rango estrecho ($215\text{-}286 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) en aguas no estratificadas como el mixolimnion en periodo de mezcla y el epilimnion durante la estratificación. En contraste, en el metalimnion se observa un aumento de la asimilación de carbono inorgánico en paralelo con el establecimiento y desarrollo del máximo profundo de clorofila-*a* (DCM), coincidiendo con el desarrollo y los máximos de abundancia de las Pcy. En la estratificación temprana, verano, el metalimnion representa el 50% del volumen del lago con una asimilación de carbono inorgánico por fotosíntesis oxigénica de $190 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, mientras que a finales de la estratificación, otoño, el metalimnion representa el 14% del volumen total con una tasa de asimilación de $282 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

En términos de abundancia y a lo largo de todo el ciclo limnológico, Pcy es el grupo dominante del fitoplancton en la Laguna de La Cruz, (ver capítulo 4). Sin embargo, en términos de biomasa el nanofitoplancton eucariota puede alcanzar valores similares a los de Pcy, mientras que el picoplancton eucariótico autótrofos (Ape) siempre se mantiene en densidades muy bajas. Los valores de asimilación encontrados a en las profundidades del máximo de profundo de clorofila-*a* son altas. Las poblaciones presentes en el DCM tienen una alta eficiencia en la captación de luz, y se localizan a profundidades donde llega entre el 1 y el 0,1 % de luz (PAR). Esto indica que la zona fótica de los lagos estratificados debería ampliarse respecto a la definición más aceptada que la sitúa por encima del 1% de la superficie PAR (Kirk, 2011). El volumen de agua comprendido entre el 1% y 0,1% de PAR muestra una contribución total a la fotosíntesis oxigénica que aumenta a medida que se desarrolla la estratificación,

un 0,1% en enero, un 4,6% en marzo, un 11,2% en junio y un 20,4% en octubre. En sistemas estratificados, las poblaciones adaptadas a bajas intensidades de luz, no solo tienen una importante contribución a la biomasa total de organismos fotosintéticos, sino que además tienen una importante contribución a la producción primaria del ecosistema. La calidad de la luz en estas profundidades es, además, un factor de selección en el proceso de exclusión competitiva de microorganismos fotosintéticos (Stomp et al., 2007); el rango espectral de la luz puede determinar la composición de las especies en la columna de agua y especialmente en el DCM (Vila et al., 1998).

La producción primaria específica presenta diferencias importantes en función de los diferentes grupos taxonómicos implicados, y en relación periodo estudiado, mostrando las cianobacterias valores más altos respecto a otros grupos (Yacobi y Zohary, 2010). Las ficobilinas juegan un papel muy importante en la recolección de la luz de baja intensidad, siendo además una buena forma de reserva de nitrógeno, por eso *Pcy* tiene, en general, un contenido específico de clorofila menor en comparación con otros grupos de nanofitoplancton. El incremento de la producción primaria específica, para poblaciones similares, implica un aumento en la eficiencia de esas poblaciones. El aumento de la producción primaria específica y los cocientes P/B en el DCM de la Laguna de La Cruz a medida que avanza la estratificación indica un aumento en la eficiencia de este grupo, Callieri et al., (2004) indica que bajo condiciones de depredación intensa se estimula la tasa de división y la actividad fotosintética.

Los datos obtenidos con el fluorímetro activo *PhytoFlash*, indican un alto rendimiento fotosintético en el máximo profundo de clorofila-a que se extiende a todo el metalimnion. Este tipo de metodología, pues sólo es capaz de medir la fotosíntesis oxigénica, y no la anoxigénica, ni oscura. Este modelo de fluorímetro, al ser del tipo MT, presenta problemas para calcular con precisión

el valor de parámetros como el “*functional absorption cross-section*”, necesario para la correcta estimación de la producción primaria. En cianobacterias es menor la cantidad de centros de reacción funcionales, ya que poseen una alternativa para la reducción de la plastoquinona, los ficobilisomas, variando además la importancia de ésta entre especies. Esto hace que en comunidades que tienen poblaciones con abundancias significativas, tanto de cianobacterias como de algas, el valor del rendimiento fotosintético sea confuso y difícil de interpretar. Por lo tanto, en sistemas con cianobacterias, los datos obtenidos con el modelo de led azul no tienen interpretaciones directas, es preciso complementar estos estudios, con datos más específicos y ensayos de laboratorio, para obtener resultados concluyentes.

Respecto a los valores anuales de asimilación de carbono por fotosíntesis anoxigénica, se observa una contribución relativamente baja, de un 2,8% ($5 \text{ g C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$). La fotosíntesis anoxigénica se debe exclusivamente a la actividad de las bacterias fotosintéticas. En los lagos estudiados con bacterias fotosintéticas del azufre la fotosíntesis anoxigénica contribuye de promedio con el 29% de la producción primaria total, llegando a valores máximos de 83%, como, por ejemplo, en el lago Mahoney (Overmann, 2008). Sin embargo, en lagos pequeños, con la corrección hipsográfica, esta contribución disminuye significativamente a valores entre 4-18 % (Steenbergen, 1982). En la Laguna de La Cruz coexisten principalmente *Lamprocystis purpurea*, que es una bacteria púrpura del azufre y *Chlorobium clathratofirme*, que es una bacteria verde del azufre, con poblaciones estables desde los primeros datos publicados de la laguna (Vicente y Miracle, 1988; Rodrigo et al., 2000). Los bajos valores de fijación por fotosíntesis anoxigénica, encontrados en esta laguna, están asociados a la limitación por luz, al desarrollarse justo bajo el DCM, y principalmente, a que la Laguna de la Cruz es un lago con poca concentración de sulfhídrico en sus aguas, que es esencial para este tipo de fotosíntesis.

Los valores anuales de asimilación de carbono inorgánico por quimiolitotrofia suponen un 7,5% ($14 \text{ g C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$). La quimiolitotrofia es un metabolismo exclusivo de procariotas (Kelly y Wood, 2006). En general, en los sistemas acuáticos se produce principalmente en la interfase óxico-anóxica o en las aguas totalmente anóxicas (hipolimnion y monimolimnion) donde se pueden utilizar donantes de electrones diferentes del de H_2O (Camacho et al., 2001; García-Cantizano et al., 2005; Casamayor et al., 2008; Enrich-Prast et al., 2009). La estratificación térmica y la presencia de sulfhídrico estimulan la asimilación de carbono por quimiolitotrofia (Enrich-Prast et al., 2009). Sin embargo, no se conoce muy bien que ocurre con este tipo de procesos quimiolitotrofos cuando la presencia de sulfhídrico está limitada. En la Laguna de La Cruz, las tasas de asimilación por quimiolitotrofia en la interfase óxico-anóxica son ligeramente superiores a las observadas de promedio en el mixolimnion. Sin embargo, estas actividades en la interfase óxico-anóxica representan menos del 10% de la actividad total en la laguna. La mayor parte de la actividad quimiolitotrofa se produce, principalmente, en el hipolimnion afótico y en el monimolimnion, siendo estas tasas relativamente bajas en comparación con las de otros lagos estratificados kársticos ricos en sulfhídrico situados en el noreste de España (Casamayor et al. 2012). Por otro lado, Casamayor et al., (2008) demostraron que las bacterias púrpuras del azufre son capaces de incorporar activamente carbono inorgánico durante incubaciones en oscuridad, principalmente, después de estar expuestas a la luz. Del mismo modo, nuestros resultados (tabla 7.3) indican una posible relación entre las bacterias púrpuras y verdes del azufre con la fijación de carbono inorgánico por quimiolitotrofia, mostrando una correlación significativa ($p\text{-valor} = 0,011$) entre la asimilación oscura inorgánico de carbono y la abundancia de PSB y GSB en el perfil vertical del periodo de mezcla (enero de 2007). Por otro lado, la quimiolitotrofia dependiente del amonio y/o el hierro podría ser importante en este tipo de lagos

(Walter et al., 2014), favorecido por la meromixis, actuando el monimolimnion como refugio para este tipo de bacterias anaerobias en los periodos de mezcla. Las bacterias heterótrofas pueden realizar una incorporación quimiolitotrófica de carbono inorgánico a través de reacciones de carboxilación, lo que podría sobreestimar las tasas reales de asimilación. Estas reacciones de carboxilación deberían ser más importante en el monimolimnion, donde se producen mayores densidades bacterianas y concentraciones de materia orgánica. Sin embargo, esto se ha demostrado que tienen una menor importancia en los ecosistemas acuáticos con entradas de materia orgánica relativamente bajas (Zopfi et al., 2001; Labrenz et al., 2005), lo que podría ser el caso la Laguna de La Cruz. En última instancia, nuestros resultados ponen de relieve la importancia que la quimiolitotrofia tiene en aguas profundas y anóxicas (hipolimnion y molimonimnion) en sistemas acuáticos pobres en sulfhídrico.

En resumen, en la Laguna de La Cruz, la asimilación de carbono inorgánico está asociada a diferentes metabolismos y microorganismos. De este estudio subyace el papel tan relevante que los procariotas tienen en el ciclo del carbono de esta laguna, siendo esta fracción la que más contribuye como base a la red trófica planctónica. Esto implica, por ejemplo, que para el fitoplancton la sucesión de especies y los patrones de producción primaria no se parecen a los ciclos anuales observados normalmente en lagos templados (Reynolds, 1984). En la Laguna de La Cruz, las poblaciones microbianas se distribuyen en la columna de agua a lo largo de diferentes gradientes físicos y químicos que también regulan los cambios temporales observados en la comunidad. Las Picocianobacterias son las principales responsables de la fotosíntesis en las capas fóticas del lago, mientras que tanto bacterias fotosintéticas anaerobias y como quimiolitotrófos representan hasta el 10% del carbono inorgánico total asimilado anualmente en la laguna.

7.5. Referencias

- Auer, M. T., & Canale, R. P. (1986). Mathematical modelling of primary production in Green Bay (Lake Michigan, USA), a phosphorus and light-limited system. *Hydrobiological Bulletin*, 20(1-2), 195-211.
- Banse, K. (2002). Should we continue to measure ¹⁴C-uptake by phytoplankton for another 50 years? *Limnology and Oceanography Bulletin*, 11(3), 45-46.
- Berg, I. A. (2011). Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Applied and environmental microbiology*, 77(6), 1925-1936.
- Callieri, C. (2008). Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*, 1(1), 1-28.
- Callieri, C., Balseiro, E., Bertoni, R., & Modenutti, B. (2004). Picocyanobacterial photosynthetic efficiency under *Daphnia* grazing pressure. *Journal of plankton research*, 26(12), 1471-1477.
- Callieri, C., Coci, M., Eckert, E. M., Salcher, M. M., & Bertoni, R. (2014). Archaea and Bacteria in deep lake hypolimnion: in situ dark inorganic carbon uptake. *Journal of Limnology*, 73(1), 31-38.
- Camacho, A., & Vicente, E. (1998). Carbon photoassimilation by sharply stratified phototrophic communities at the chemocline of Lake Arcas (Spain). *FEMS microbiology ecology*, 25(1), 11-22.
- Camacho, A., Erez, J., Chicote, A., Florín, M., Squires, M. M., Lehmann, C., & Backofen, R. (2001). Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web. *Aquatic sciences*, 63(1), 91-106.
- Camacho, A., Picazo, A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2003a). Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. *Algological Studies*, 109(1), 171-184.

- Camacho, A., Miracle, M. R., & Vicente, E. (2003b). Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. *Archiv für Hydrobiologie*, 157(3), 321-338.
- Casamayor, E. O., García-Cantizano, J., & Pedrós-Alió, C. (2008). Carbon dioxide fixation in the dark by photosynthetic bacteria in sulfide-rich stratified lakes with oxic-anoxic interfaces. *Limnology and Oceanography*, 53(4), 1193-1203.
- Casamayor, E. O., Llorós, M., Picazo, A., Barberán, A., Borrego, C. M., & Camacho, A. (2012). Contribution of deep dark fixation processes to overall CO₂ incorporation and large vertical changes of microbial populations in stratified karstic lakes. *Aquatic sciences*, 74(1), 61-75.
- Dokulil, M. T., & Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438(1-3), 1-12.
- Dokulil, M.T., & Kaiblinger, C. (2009). Phytoplankton Productivity. In: Gene E. Likens, (Editor). *Encyclopedia of Inland Waters*. Vol 1, pp. 210-218, Elsevier, Oxford
- Enrich-Prast, A., Bastviken, D., & Crill, P. (2009). Chemosynthesis. In Gene E. Likens. (Org.). *Encyclopedia of Inland Waters*. Oxford: Elsevier. vol. 1, p. 211-225.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., & Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281(5374), 237-240.
- García-Cantizano, J., Casamayor, E. O., Gasol, J. M., Guerrero, R., & Pedrós-Alió, C. (2005). Partitioning of CO₂ incorporation among planktonic microbial guilds and estimation of in situ specific growth rates. *Microbial ecology*, 50(2), 230-241.
- Guerrero, R., Montesinos, E., Pedrh-AM, C., Esteve, I., Mas, J., Van Gemerden, H., & Bakker, J. F. (1985). *Limnology*, 30(5), 919-931.
- Hamasaki, K., Satoh, F., Kikuchi, T., Toda, T., & Taguchi, S. (1999). Biomass and production of cyanobacteria in a coastal water of Sagami Bay, Japan. *Journal of plankton research*, 21(8), 1583-1591.

- Hanson, T. E., Alber, B. E., & Tabita, F. R. (2012). Phototrophic CO₂ fixation: Recent insights into ancient metabolisms. In *Functional Genomics and Evolution of Photosynthetic Systems* (pp. 225-251). Springer Netherlands.
- Hügler, M., & Sievert, S. M. (2011). Beyond the Calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. *Marine Science*, 3.
- Hutchinson, G. E. (1967). *A Treatise on Limnology*. Vol. 2: Introduction to lake biology and the limnoplankton. J. New York, John Wiley & Sons.
- Kelly, D., & Wood, A. (2006). The Chemolithotrophic Prokaryotes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt, *The prokaryotes, Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry* pp. 441-456. New York, Springer
- Kirk, J. T. O. (2011). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*, 3rd ed. Cambridge University Press.
- Labrenz, M., Jost, G., Pohl, C., Beckmann, S., Martens-Habbena, W., & Jürgens, K. (2005). Impact of different in vitro electron donor/acceptor conditions on potential chemolithoautotrophic communities from marine pelagic redoxclines. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 6664-6672.
- Marra, J. (2009). Net and gross productivity: weighing in with ¹⁴C. *Aquat. Microbial Ecology* 56, 123-131.
- Nielsen, E. S. (1952). The use of radio-active carbon (C¹⁴) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil*, 18(2), 117-140.
- Overmann, J. (2008). Ecology of phototrophic sulfur bacteria. In *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*, eds Hell R, Dahl C, Knaff DB, Leustek T, editors. (Dordrecht: Springer) 375–396
- Oxborough, K., Moore, C. M., Suggett, D. J., Lawson, T., Chan, H. G., & Geider, R. J. (2012). Direct estimation of functional PSII reaction center concentration and PSII electron flux on a volume basis: a new approach to the analysis of Fast Repetition Rate fluorometry (FRRf) data. *Limnology and Oceanography: Methods*, 10(3), 142-154.

- Padisák, J., Krienitz, L., Koschel, R., & Nedoma, J. (1997). Deep-layer autotrophic picoplankton maximum in the oligotrophic Lake Stechlin, Germany: origin, activity, development and erosion. *European Journal of Phycology*, 32(4), 403-416.
- Peterson, B. J. (1980). Aquatic Primary Productivity and the ^{14}C - CO_2 Method: A History of the Productivity Problem. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 11, 359-385.
- Reynolds, C. S. (1984). *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge Studies in Ecology. Cambridge University Press, 384 pp.
- Rodier, J. (1996). *L'analyse de l'eau naturelle, eaux résiduaires, eau de mer*. 8ème Edition, Dénod, Paris, 1383 pp.
- Rodrigo, M. A., Vicente, E., & Miracle, M. R. (2000). The role of light and concentration gradients in the vertical stratification and seasonal development of phototrophic bacteria in a meromictic lake. *Archiv für Hydrobiologie*, 148(4), 533-548.
- Steenbergen, C. L. M. (1982). Contribution of photosynthetic sulphur bacteria to primary production in Lake Vechten. In *Studies on Lake Vechten and Tjeukemeer, The Netherlands* (pp. 59-64). Springer Netherlands.
- Stockner, J. G. (1988). Phototrophic picoplankton: an overview from marine and freshwater ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 33(4part2), 765-775.
- Stomp, M., Huisman, J., Vörös, L., Pick, F. R., Laamanen, M., Haverkamp, T., & Stal, L. J. (2007). Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecology Letters*, 10(4), 290-298.
- Van Gernerden, H., & Mas, J. (1995). Ecology of phototrophic sulfur bacteria. In *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (pp. 49-85). Springer Netherlands.
- Vicente, E., & Miracle, M. R. (1988). Physicochemical and microbial stratification in a meromictic karstic lake of Spain. *Verh. Internat. Verein. Limnol*, 23, 522-529.
- Vila, X., Abella, C. A., Figueras, J. B., & Hurley, J. P. (1998). Vertical models of phototrophic bacterial distribution in the metalimnetic microbial communities of

- several freshwater North-American kettle lakes. *FEMS microbiology ecology*, 25(3), 287-299.
- Walter, X. A., Picazo, A., Miracle, M. R., Vicente, E., Camacho, A., Aragno, M., & Zopfi, J. (2014). Phototrophic Fe (II)-oxidation in the chemocline of a ferruginous meromictic lake. *Frontiers in microbiology*, 5,713.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology. Lake and River Ecosystems*. Third Edition Academic Press, San Diego.
- Williams, P. J. L. B., Thomas, D. N., & Reynolds, C. S. (Eds.). (2008). *Phytoplankton productivity: carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*. John Wiley & Sons.
- Yacobi, Y. Z., & Zohary, T. (2010). Carbon: chlorophyll a ratio, assimilation numbers and turnover times of Lake Kinneret phytoplankton. *Hydrobiologia*, 639(1), 185-196.
- Zopfi, J., Ferdelman, T. G., Jørgensen, B. B., Teske, A., & Thamdrup, B. (2001). Influence of water column dynamics on sulfide oxidation and other major biogeochemical processes in the chemocline of Mariager Fjord (Denmark). *Marine Chemistry*, 74(1), 29-51.

Capítulo 8

Estudio experimental de la interacción de factores bióticos y abióticos en la abundancia, diversidad y dinámica de las poblaciones de picoplancton

8.1. Introducción

Existen múltiples factores que influyen en el desarrollo, abundancia y dinámica de las diferentes poblaciones de microorganismos que viven en ecosistemas acuáticos. En este capítulo se pretende determinar la relevancia de los nutrientes inorgánicos (fósforo y nitrógeno), la depredación y la luz, en el control de las poblaciones de las picocianobacterias presentes en el perfil vertical de la Laguna de La Cruz. El flujo relativo de nitrógeno y fósforo, en sistemas acuáticos, depende de las entradas de nutrientes, la geología de la cuenca, las aportaciones atmosféricas y la fijación “*in situ*” de nitrógeno. El fósforo es, generalmente, el principal nutriente limitante, en el desarrollo de microorganismos acuáticos, en los lagos del hemisferio norte templado (Schindler, 1977; Hecky y Kilham, 1988); mientras que la limitación por nitrógeno es más común en los lagos tropicales y subtropicales (Wurtsbaugh et al., 1985; Pollinger et al., 1988), que son, generalmente, menos afectados por factores como la deposición atmosférica de nitrógeno (Galloway, 1998). Además, la co-limitación de diferentes factores, principalmente nutrientes, también ha sido ampliamente revisada y tiene que tenerse en cuenta (Harpole et al., 2011; Marleau et al., 2015; Raven 2015).

Las picocianobacterias (Pcy) son depredadas por diferentes niveles tróficos: nanoflagelados, ciliados, rotíferos y crustáceos (Jürgens et al., 1999; Pernthaler, 2005). Sin embargo, existen estudios contradictorios de hasta qué punto esta depredación es capaz de controlar la abundancia y dinámica de las poblaciones de Pcy (Callieri et al., 2012). Sherr et al., (1991) estimaron que, en el Lago Kinneret, las poblaciones de ciliados no podrían vivir únicamente de la depredación sobre Pcy. Sin embargo, Šimek et al., (1995) muestran que, algunas de las especies comunes de ciliados de agua dulce, pueden sobrevivir únicamente en una dieta de Pcy. De hecho se estima que, en un balance anual,

entre el 83% y el 97% del carbono producido por Pcy es absorbido por protozoos y se canaliza al metazooplancton (Callieri et al., 1999).

Los nanoflagelados heterotróficos y mixotróficos y los pequeños ciliados son importantes consumidores de de Pcy (Stockner y Antia, 1986; Bird y Kalf, 1987; Weisse, 1990; Šimek et al., 1995; Sanders et al., 2000). Entre los ciliados, diferentes *oligotrichia* y algunos *scuticociliates*, que a veces están en el límite entre el nano y microplancton (<30 mm), puede ser importantes consumidores de Pcy (Šimek et al., 1995; Callieri et al., 1999). A pesar de la importancia de la depredación por ciliados, en algunos sistemas, se establece que nanoflagelados, tanto heterótrofos y mixotróficos, son responsables de 90% de la depredación sobre Pcy y bacterias heterótrofas; mientras que los ciliados representan sólo el 10% de esta depredación (Pernthaler, 1996).

Con el fin de entender mejor los factores que controlan la producción en estos ecosistemas acuáticos es necesario el estudio experimental, y poder así determinar la interacción de factores bióticos y abióticos en la abundancia, diversidad y dinámica de las poblaciones de microorganismos acuáticos. Los ecólogos se sienten, a menudo, atraídos por la experimentación con microcosmos o mesocosmos por razones totalmente prácticas. Con numerosas ventajas que pueden resumirse en el pequeño tamaño, y el control de los factores que se pretende estudiar (Mehner et al., 2002). Por definición son pequeños hábitats que permiten una alta replicación de los experimentos, obteniendo así, suficientes estudios observacionales para eliminar efectos de covarianza estadística.

Se puede argumentar que las mismas características que hacen mesocosmos y microcosmos manejables y reproducibles, como su pequeño tamaño y los límites experimentales discretos, también los hacen artificiales, y por lo tanto,

esto podría limitar la capacidad de generalizar a otros sistemas, en particular los sistemas más grandes, o en nuestro caso toda la laguna (Nogueira et al., 2014). Por ejemplo, se podría argumentar que el pequeño tamaño de los microcosmos y mesocosmos podría hacerlos particularmente propensos o sensibles a las perturbaciones. Los organismos a menudo no pueden huir de estas perturbaciones a causa de los límites discretos. En este sentido, la mayoría las poblaciones estudiadas en microcosmos y mesocosmos suelen tener tiempos de generación cortos. Una vez que la dispersión y las perturbaciones se escalan en función del tiempo de generación, puede haber poca diferencia en la frecuencia o intensidad de esa perturbación entre el microcosmos, o mesocosmos y cualquier otro sistema, incluyendo los sistemas más grandes, como toda la laguna (Petersen et al., 2003).

8.2. Material y métodos específicos

Bioensayo general (nutrientes depredación)

En junio de 2006, se realizó un bioensayo (figura 8.1) “*in situ*” para determinar la importancia de los nutrientes y la depredación en las comunidades de microorganismos de la laguna, en diferentes profundidades del perfil vertical, especialmente, en la abundancia de picocianobacterias.

Se seleccionaron tres profundidades, 6 y 10 y 12 metros, en función de los perfiles físicos y químicos, y de la distribución de los pigmentos fotosintéticos en la laguna. Para cada profundidad se ensayaron dos niveles de nutrientes, fósforo (ortofosfato soluble) y nitrógeno (nitrato amónico), con un total de 4 tratamientos: control, N (sólo nitrógeno), P (sólo fosforo) y NP (con adición tanto de fósforo como de nitrógeno), por triplicado, en total 12 mesocosmos de 5 litros por profundidad.



Figura 8.1. Esquema metodológico del bioensayo realizado en junio de 2006, en la Laguna de La Cruz.

En cada uno de los mesocosmos control y NP se introdujeron 2 bolsas de diálisis (servapor® 29 mm ref44146.04) de 260 ml, con agua de la misma profundidad, una filtrada por 30 µm para retirar el zooplancton de gran tamaño y otra filtrada por 10 µm para retirar todo el zooplancton; esto deja un total de 72 tratamientos. Se recogieron diferentes muestras de tiempo cero, tanto para el agua filtrada como para el agua sin filtrar, de cada profundidad.

Perfil de producción bacteriana

A lo largo del cuarto día de incubación del bioensayo general, se realizó el perfil vertical de producción bacteriana con ³H-Timidina. La metodología, basada en Wetzel y Likens (2000), se puede resumir en la recogida de 60 ml de agua (por triplicado) de cada profundidad (seleccionada del perfil) en viales, más una muestra control fijada con formaldehído al 1% de concentración final. Se añade 200µl de 3H-Timidina, de molaridad conocida, incluidos los controles

fijados con formaldehído. Los viales se incuban, aproximadamente, una hora a su profundidad. Tras la incubación, todos los viales (excepto los ya fijados) se fijan con formaldehído al 1% de concentración final. Ya en el laboratorio, se sigue el protocolo de Wetzel y Likens (2000) sin modificaciones relevantes.

Producción primaria y bacteriana del interior de los mesocosmos

El día 5 de incubación del bioensayo general, se realizó la producción primaria y bacteriana de una réplica de los diferentes tratamientos de cada profundidad. La metodología para determinar la producción primaria se detalla en el capítulo 7. La metodología para el cálculo de la producción bacteriana se encuentra detallada en la sección anterior.

Bioensayo potencial (luz, nutrientes)

En paralelo al bioensayo general, se realizó un ensayo potencial para determinar el efecto de la luz, en combinación con la adición de nutrientes, sobre las poblaciones de Pcy. Este ensayo se realiza sin replicados por motivos logísticos, por lo que los resultados tienen un valor estadístico limitado. Sin embargo, puede ofrecer pistas muy relevantes para una mayor comprensión de los resultados obtenidos en el bioensayo general.

De cada una de las tres profundidades en las que se realizó el bioensayo general (6, 10 y 12 metros) se obtuvieron 10 mesocosmos: 5 de control y 5 con adición de N y P en las mismas concentraciones que en el bioensayo general. De cada profundidad y mesocosmos, un control y otro NP se incubaron a 5 profundidades diferentes. Estas profundidades cubrían un amplio rango de intensidades de luz: a 0,5 metros el 75% del PAR, a 4 metros el 50 % del PAR, a 6 metros el 10 % del PAR, a 10 metros el 1% del PAR y a 12 metros el 0,1% del PAR. El período de incubación fue de 6 días.

Ensayo de asimilación de fósforo soluble

Para determinar la tasa de asimilación de fósforo soluble, a las diferentes profundidades de los bioensayos realizados, se realizó en el laboratorio un experimento de asimilación. El agua de los mesocosmos (5 litros) de las diferentes profundidades (0,5, 4, 6, 9, 10 y 12 metros) fue fertilizada con 30 μM de ortofosfato soluble e incubadas en cámaras bioclimáticas, a las temperaturas aproximadas de la profundidad a la que se encontraba en la laguna, con un fotoperíodo 14/10, día y noche, respectivamente. En paralelo, también se realizó un ensayo de precipitación química, con agua de las mismas profundidades en matraces Erlenmeyer de 250 ml, filtrada por filtros de fibra de vidrio (GF/F). Las incubaciones fueron de 6 días, aunque el primer día se tomaron submuestras para el análisis de fósforo, cada media hora, hasta la saturación de la curva de asimilación.

8.3. Resultados

A continuación se detallan los resultados obtenidos del bioensayo general, realizado en junio de 2006, para determinar la relevancia de los nutrientes y la depredación en el control de las poblaciones de picoplancton, en el perfil vertical de la laguna; el bioensayo potencial para determinar la importancia de la luz en función de la disponibilidad de nutrientes y el ensayo de laboratorio para determinar las tasas de asimilación de fósforo en el perfil vertical de la laguna.

Bioensayo Junio 2006

La selección de las profundidades de ensayo se realizó en función del perfil vertical (figura 8.2).

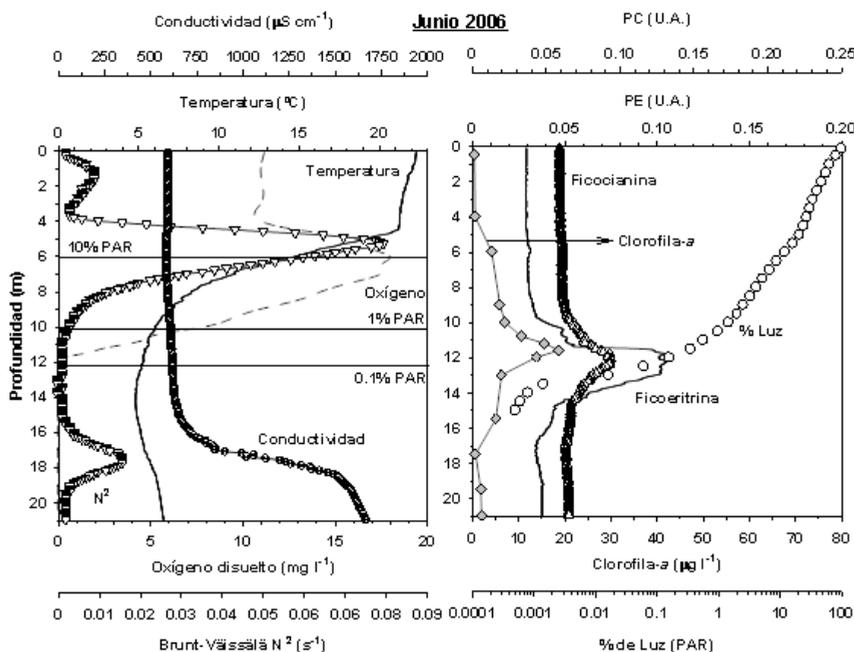


Figura 8.2. Perfiles verticales de: (A) temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, frecuencia de Brunt Väissälä, y (B) clorofila-*a*, ficoeritrina, ficocianina y % de luz incidente en la Laguna de La Cruz, en junio de 2006, en relación a las profundidades de incubación.

La primera incubación del bioensayo general (epilimnion) fue realizada con agua de 6 metros e incubada, a esta profundidad, en el inicio de la termoclina y en el máximo de concentración de oxígeno disuelto, con una temperatura de 20°C y donde recibe el 10% del PAR incidente.

La segunda incubación del bioensayo general fue realizada a 10 metros de profundidad (metalimnion superior), en la parte inferior de la termoclina y a una temperatura de 7°C, donde recibe el 1% del PAR incidente en superficie y

presentando las tasas mínimas, tanto de fotosíntesis oxigénica como de producción bacteriana.

La tercera incubación del bioensayo general fue realizada a 12 metros de profundidad (hipolimnion superior), en el fondo de la termoclina y a 5°C, es donde se localizan el máximo profundo de clorofila-*a* y ficoeritrina, el máximo de fotosíntesis oxigénica y el máximo profundo de producción bacteriana (acoplado al máximo profundo de clorofila-*a*), siendo además la profundidad a la que llega, aproximadamente, el 0,1% del PAR incidente.

El fósforo soluble se agota en todos los tratamientos adicionados, sólo se observan diferencias significativas, en la concentración final, a 6 metros de profundidad, estableciéndose 3 grupos: los controles, los tratamientos con zooplancton, y los tratamientos filtrados, por 10 y 30 μm , con adición de nutrientes (figura 8.3). La concentración de amonio a tiempo final del experimento sólo muestra que únicamente ha habido asimilación de este nutriente, significativamente, en los tres tratamientos NP, a 6 metros de profundidad, y en el tratamiento N, a 10 y 12 metros de profundidad (figura 8.4). No se ha observado asimilación de nitrato, en ningún tratamiento, para ninguna profundidad (figura 8.5).

Tanto la abundancia absoluta (figura 8.6) de Pcy como la variación de abundancia respecto al tiempo inicial (figura 8.7), muestran que, a 6 metros de profundidad, los tratamientos NP10, NP30 y P30 aumentan, significativamente, su abundancia. A 10 metros de profundidad, son los tratamientos control filtrados, C10 y C30, los que aumentan su abundancia de manera significativa. A 12 metros de profundidad, todos los tratamientos filtrados muestran aumentos significativos de abundancia. Respecto a la abundancia de bacterias no

fotosintéticas “NPB” (figura 8.8), los únicos aumentos de abundancia significativos se producen a 6 metros (C10 y C30) y a 10 metros (NP30).

El perfil vertical de producción bacteriana (figura 8.9A) muestra un máximo epilimnético de producción a 4 m de profundidad y un máximo profundo a 11,6 m, acoplado al máximo de producción primaria observado a 12 m. La fotosíntesis oxigénica, en los diferentes tratamientos del ensayo para las profundidades seleccionadas (figura 8.9B), muestra (salvo a 6 m) poco efecto por nutrientes, observándose los valores máximos en los tratamientos sin zooplancton.

La producción bacteriana, estimada como incorporación de ^3H -Timidina, en los diferentes tratamientos del ensayo para las profundidades seleccionadas (figura 8.9C), se muestra muy acoplada a la fotosintética a 6 metros de profundidad, y un efecto más claro de limitación por nutrientes que el observado en la fotosíntesis oxigénica.

En general, las concentraciones de clorofila-*a*, ficoeritrina y la proporción clorofila-*a*/ficoeritrina no muestran diferencias muy importantes entre tratamientos a tiempo final. A 6 metros de profundidad (figura 8.10A), se observa un aumento significativo de clorofila-*a* en los tratamientos filtrados por 30 μm y de ficoeritrina en el tratamiento NZ. En los tratamientos a 10 metros (figura 8.11) y a 12 metros de profundidad (figura 8.12) no se observan diferencias significativas.

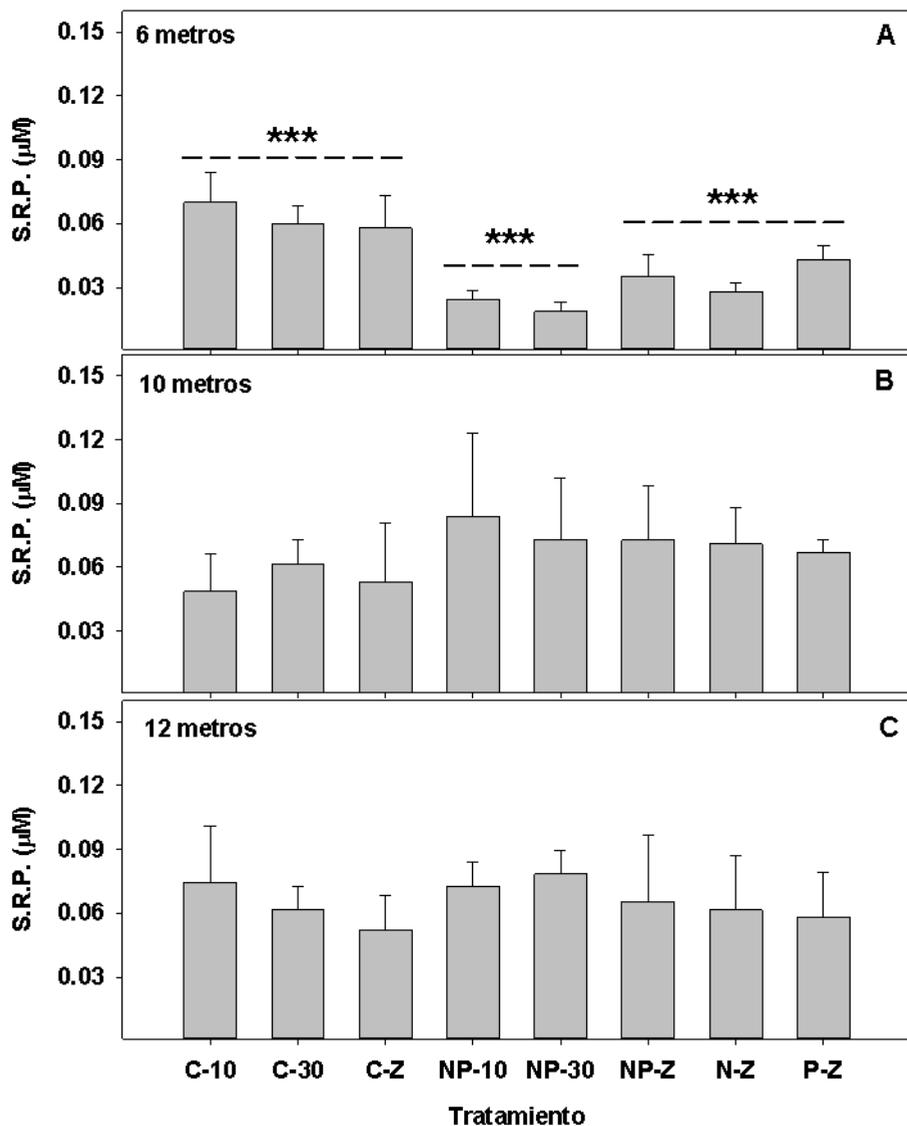


Figura 8.3. Concentración final de fósforo soluble (S.R.P. en μM), para los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006, (A) en el epilimnion a 6 metros de profundidad, (B) en el metalimnion a 10 metros de profundidad y (C) en el hipolimnion superior a 12 metros de profundidad, en la Laguna de La Cruz. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un $p < 0.001$.

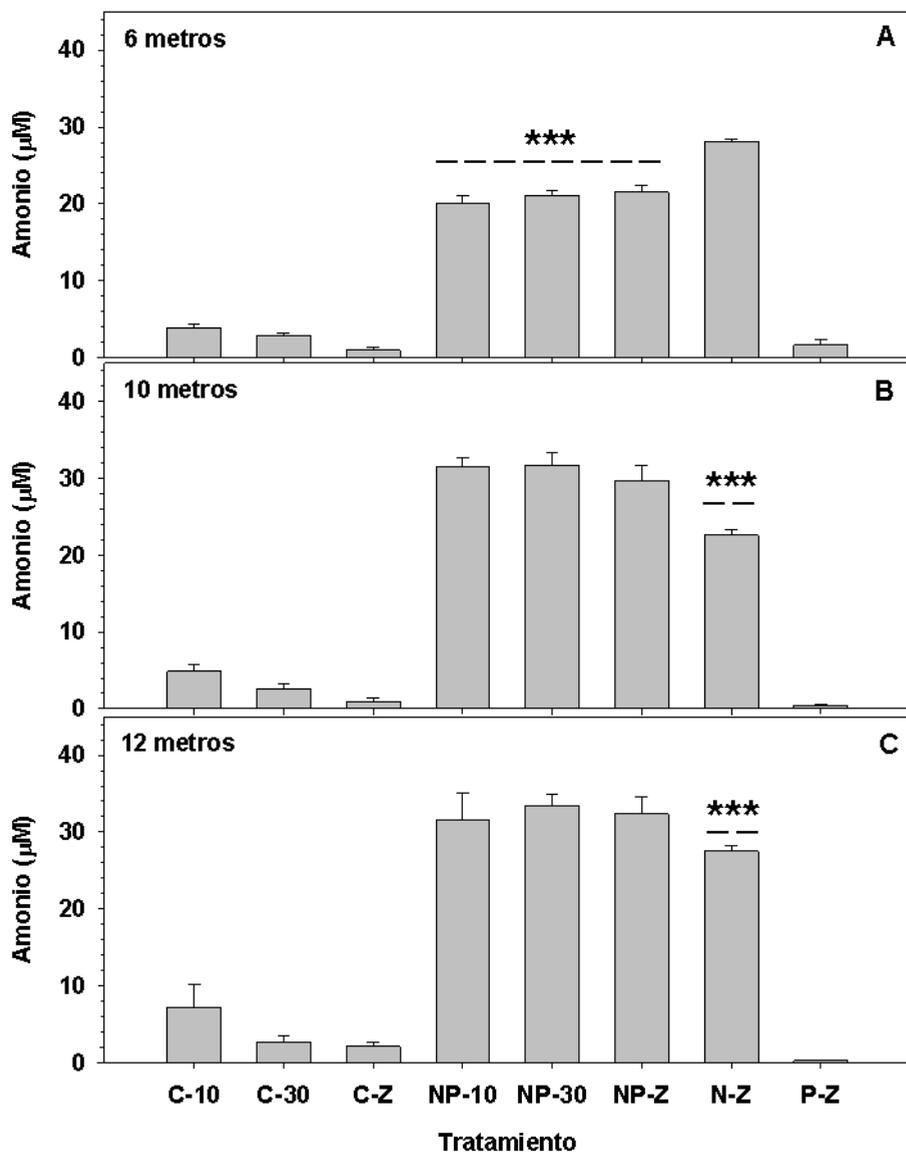


Figura 8.4. Concentración final de amonio (μM), para los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006, (A) en el epilimnion a 6 metros de profundidad, (B) en el metalimnion a 10 metros de profundidad y (C) en el hipolimnion superior a 12 metros de profundidad, en la Laguna de La Cruz. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un $p < 0.001$.

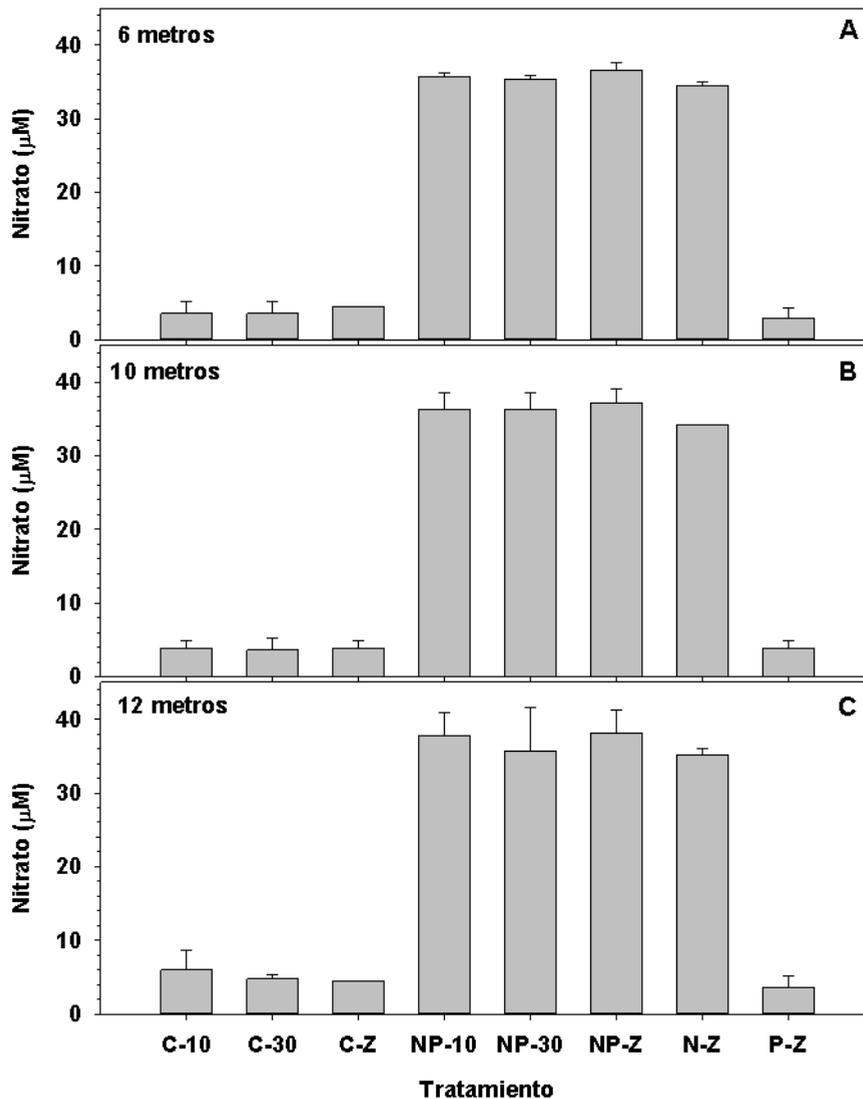


Figura 8.5. Concentración final de nitrato (μM), para los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006, (A) en el epilimnion a 6 metros de profundidad, (B) en el metalimnion a 10 metros de profundidad y (C) en el hipolimnion superior a 12 metros de profundidad, en la Laguna de La Cruz. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un $p < 0.001$.

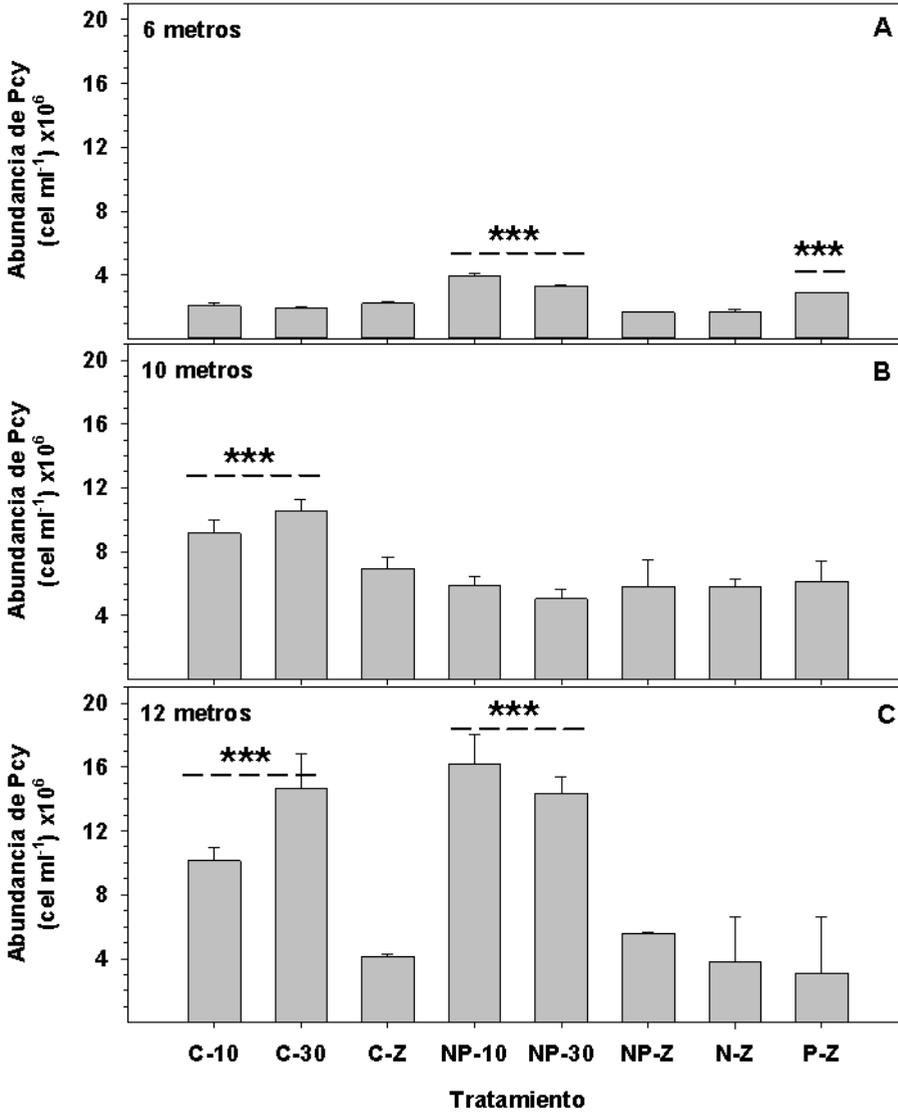


Figura 8.6. Abundancia (células ml⁻¹ x 10⁶) de Pcy, a tiempo final, de los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006, (A) en el epilimnion a 6 metros de profundidad, (B) en el metalimnion a 10 metros de profundidad y (C) en el hipolimnion superior a 12 metros de profundidad, en la Laguna de La Cruz. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un p<0.001.

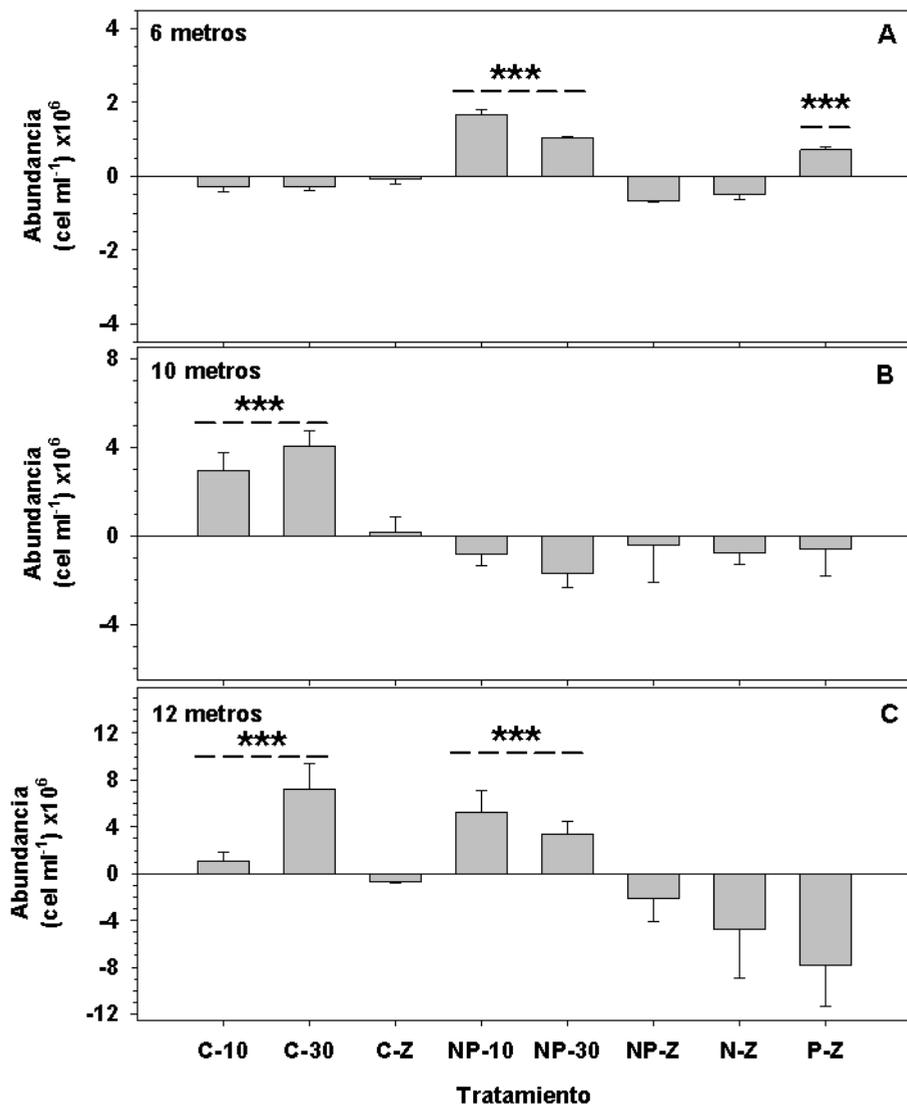


Figura 8.7. Variación de la abundancia de Pcy (células ml⁻¹ x 10⁶) respecto al tiempo inicial del experimento, para los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006, (A) en el epilimnion a 6 metros de profundidad, (B) en el metalimnion a 10 metros de profundidad y (C) en el hipolimnion superior a 12 metros de profundidad, en la Laguna de La Cruz. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un p<0.001.

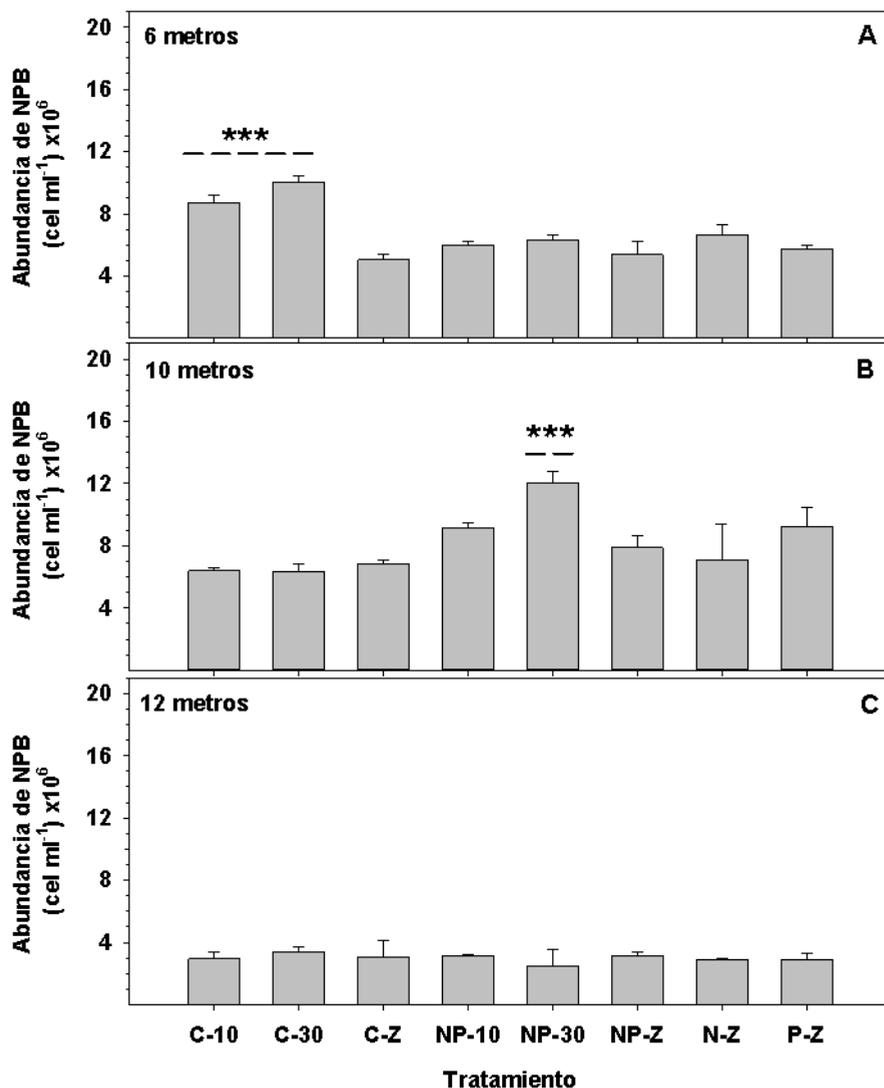


Figura 8.8. Abundancia (células ml⁻¹ x 10⁶) de NPB (“non photosynthetic bacteria”), a tiempo final, de los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006, (A) en el epilimnion a 6 metros de profundidad, (B) en el metalimnion a 10 metros de profundidad y (C) en el hipolimnion superior a 12 metros de profundidad, en la Laguna de La Cruz. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un p<0.001.

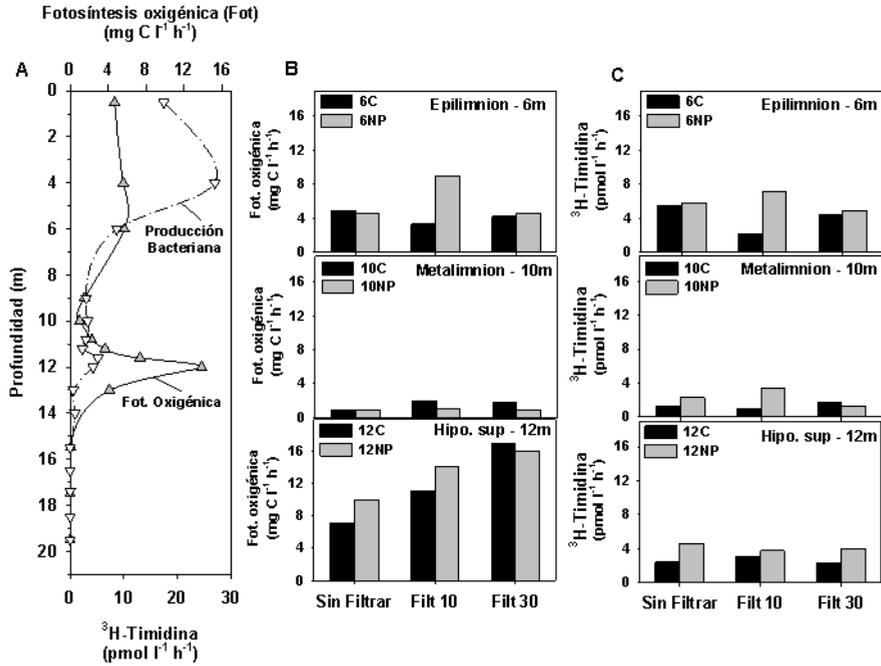


Figura 8.9. (A) Perfil vertical de producción primaria y producción bacteriana, previo a la fecha de incubación, junio de 2006. (B) Fotosíntesis oxigénica, en los diferentes tratamientos del ensayo para las profundidades seleccionadas. (C) Producción bacteriana estimada como incorporación de ³H-Timidina, en los diferentes tratamientos del ensayo para las profundidades seleccionadas.

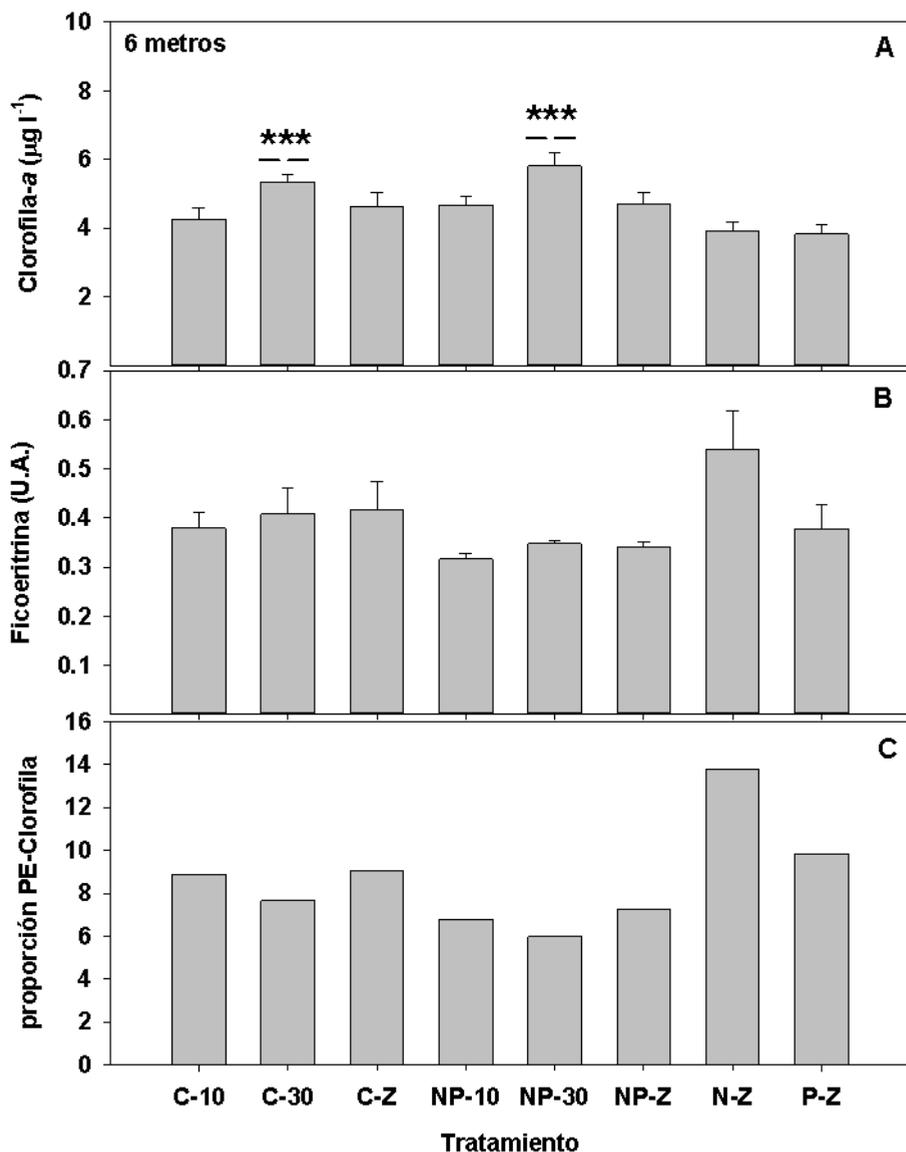


Figura 8.10. (A) Concentración de clorofila-*a* (mg m^{-3}), a tiempo final, en los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006. (B) Estimación en unidades arbitrarias de ficoeritrina y (C) estimación en unidades arbitrarias de ficocianina, en la Laguna de La Cruz, para las incubaciones realizadas a 6 metros de profundidad. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un $p < 0.001$.

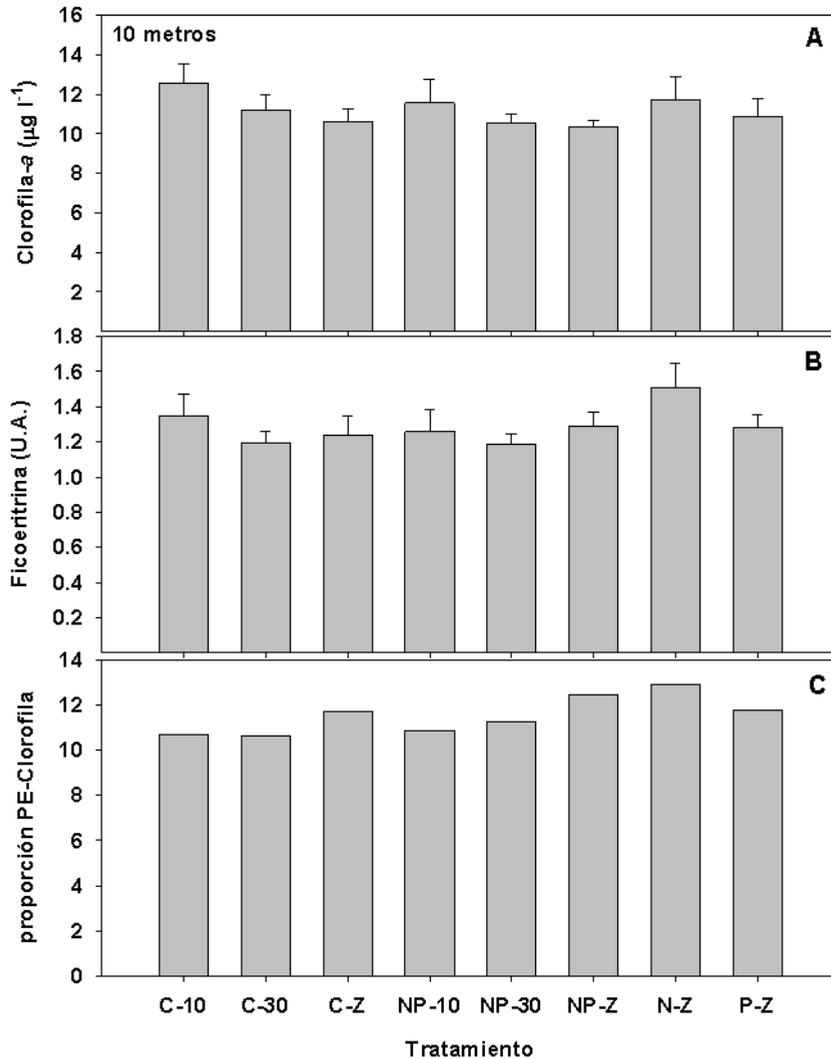


Figura 8.11. (A) Concentración de clorofila-a (mg m^{-3}), a tiempo final, en los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006. (B) Estimación en unidades arbitrarias de ficoeritrina y (C) estimación en unidades arbitrarias de ficocianina, en la Laguna de La Cruz, para las incubaciones realizadas a 10 metros de profundidad. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un $p < 0.001$.

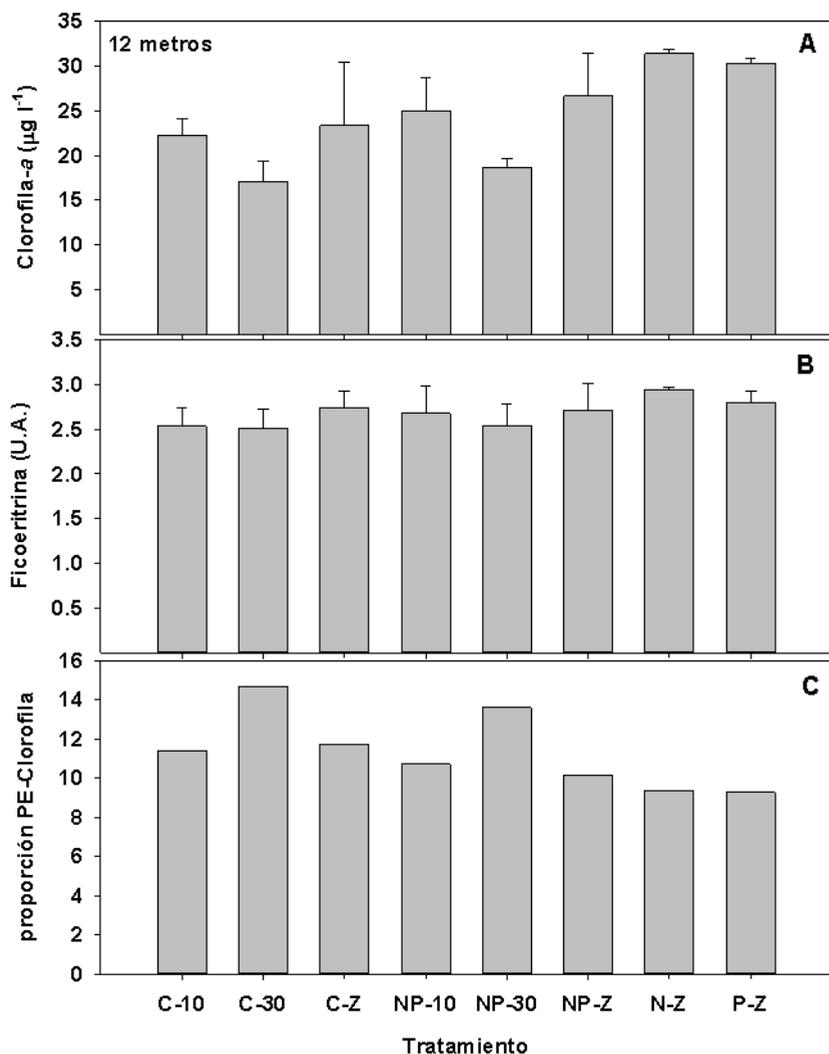


Figura 8.12. (A) Concentración de clorofila-*a* (mg m^{-3}), a tiempo final, en los distintos tratamientos del bioensayo realizado en junio de 2006. (B) Estimación en unidades arbitrarias de ficocitrina y (C) estimación en unidades arbitrarias de ficocianina, en la Laguna de La Cruz, para las incubaciones realizadas a 12 metros de profundidad. La significatividad estadística entre los diferentes tratamientos se estableció usando una One-way ANOVA con un test post-hoc de Bonferroni, indicando con (***) un $p < 0.001$.

Los resultados del bioensayo potencial muestran que las poblaciones de organismos fotosintéticos en el agua de 6 metros de profundidad (figura 8.13), incubadas a mayores intensidades de luz están limitadas por luz, mientras que al incubarlas a menor intensidad acumulan ficoeritrina.

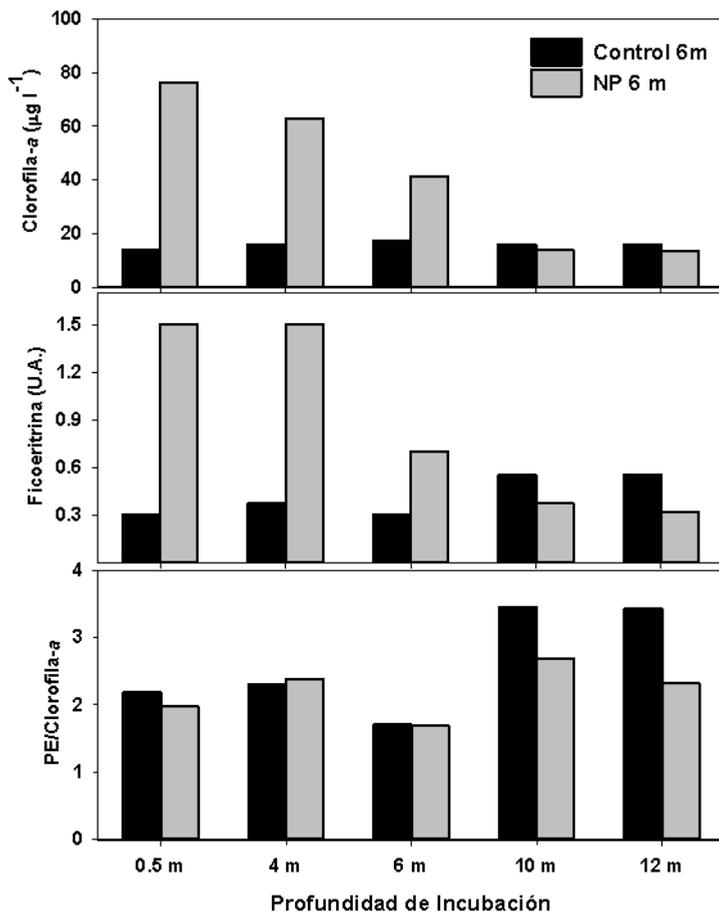


Figura 8.13. (A) Concentración de clorofila-*a* ($\mu\text{g l}^{-1}$). (B) Estimación, en unidades arbitrarias, de la ficoeritrina. (C) Proporción entre la ficoeritrina y la clorofila-*a* a tiempo final, en los distintos tratamientos del ensayo potencial realizado en junio de 2006, en la Laguna de La Cruz, con agua de 6 metros de profundidad incubada a 0.5, 4, 6, 10 y 12 metros de profundidad.

Los resultados del bioensayo potencial muestran que las poblaciones de organismos fotosintéticos, en el agua de 10 metros de profundidad (figura 8.14), incubadas a mayores intensidades de luz, están limitadas por luz y fotoinhibidas en superficie.

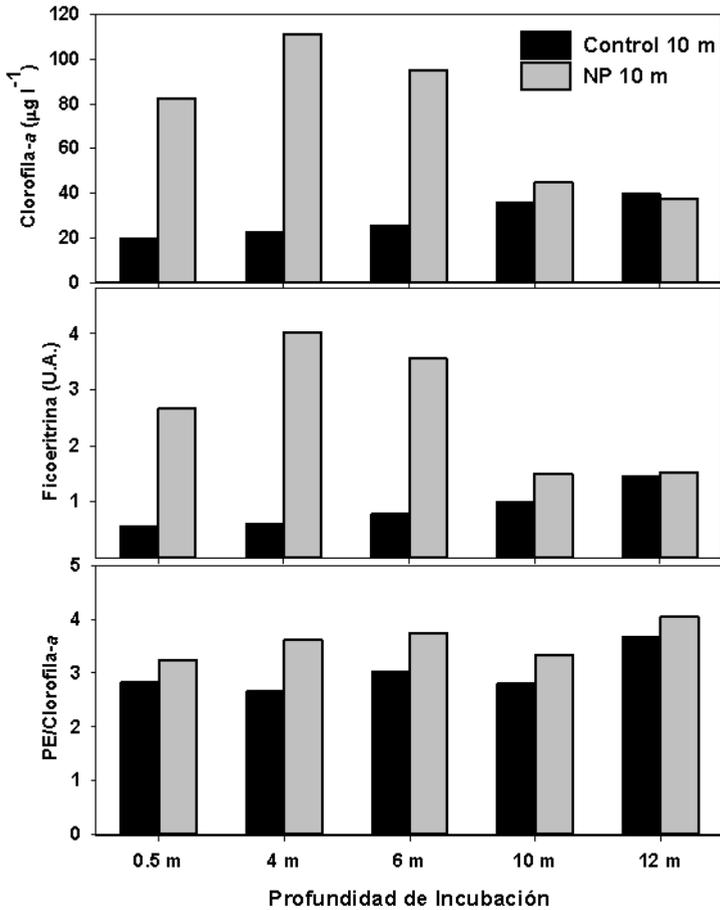


Figura 8.14. (A) Concentración de clorofila-*a* ($\mu\text{g l}^{-1}$). (B) Estimación, en unidades arbitrarias, de la ficoeritrina. (C) Proporción entre la ficoeritrina y la clorofila-*a*, a tiempo final, en los distintos tratamientos del ensayo potencial realizado en junio de 2006, en la Laguna de La Cruz, con agua de 10 metros de profundidad, incubada a 0.5, 4, 6, 10 y 12 metros de profundidad.

Los resultados del bioensayo potencial muestran que las poblaciones de organismos fotosintéticos, en el agua de 12 metros de profundidad (figura 8.14), incubadas a mayores intensidades de luz, están limitadas por luz y foto-inhibidas en superficie, además pierden gran parte de su ficoeritrina.

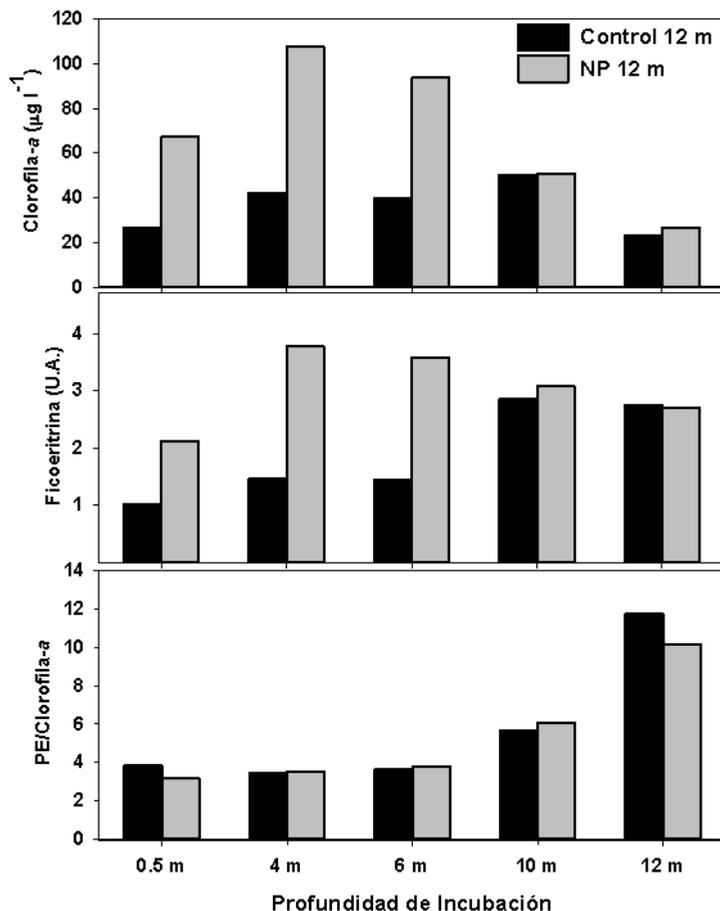


Figura 8.15. (A) Concentración de clorofila-a ($\mu\text{g l}^{-1}$). (B) Estimación, en unidades arbitrarias de la ficoeritrina. (C) Proporción entre la ficoeritrina y la clorofila-a, a tiempo final, en los distintos tratamientos del ensayo potencial realizado en junio de 2006, en la Laguna de La Cruz, con agua de 12 metros de profundidad, incubada a 0.5, 4, 6, 10 y 12 metros de profundidad.

Experimento de adición de fósforo soluble

El agua de diferentes profundidades presenta tasas de asimilación de fósforo soluble muy diferentes; las máximas tasas de asimilación se observan a 9 y 10 metros de profundidad (figura 8.16), mientras que las mínimas se observan en el epilimnion, en superficie y a 3,7 metros de profundidad.

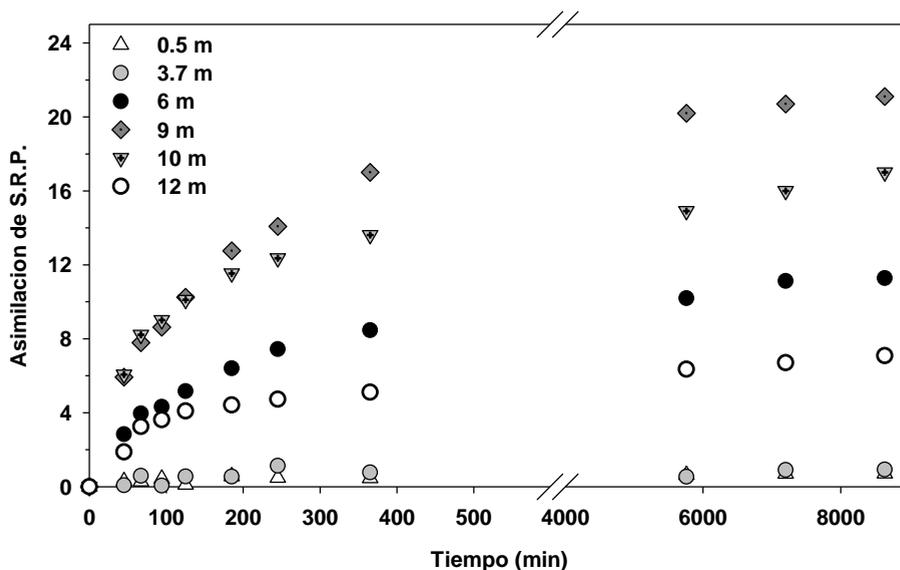


Figura 8.16. Evolución de la asimilación de fósforo soluble, en agua de diferentes profundidades de la Laguna de La Cruz, tras la adición de 30 μM de P.

Para establecer si las diferencias en el fósforo soluble, observado en el experimento anterior, se deben a la asimilación biológica y no a la precipitación química, se ha realizado en paralelo un experimento con la adición de la misma concentración de fósforo a agua filtrada de las diferentes profundidades estudiadas. Los resultados (tabla 8.1) muestran que la precipitación química es muy baja en todas las profundidades.

Tabla 8.1. Pérdida de fósforo soluble (μM), por precipitación química, respecto a la adición de $30 \mu\text{M}$ de P, a lo largo de 6 días de incubación de agua filtrada a diferentes profundidades, en la Laguna de La Cruz.

Profundidad (m)	1 h	3 días	6 días
0.5	0.3	0.1	0.7
3.7	0.4	0.1	0.4
6	0.8	0.8	0.8
9	0.6	0.3	0.2
10	0.2	0.2	0.6
12	0.9	0.6	0.5

La figura 8.17 muestra el aspecto de las poblaciones de Pcy tras los 6 días de incubación, confirmando visualmente la presencia de gránulos de polifosfato en el interior de Pcy.

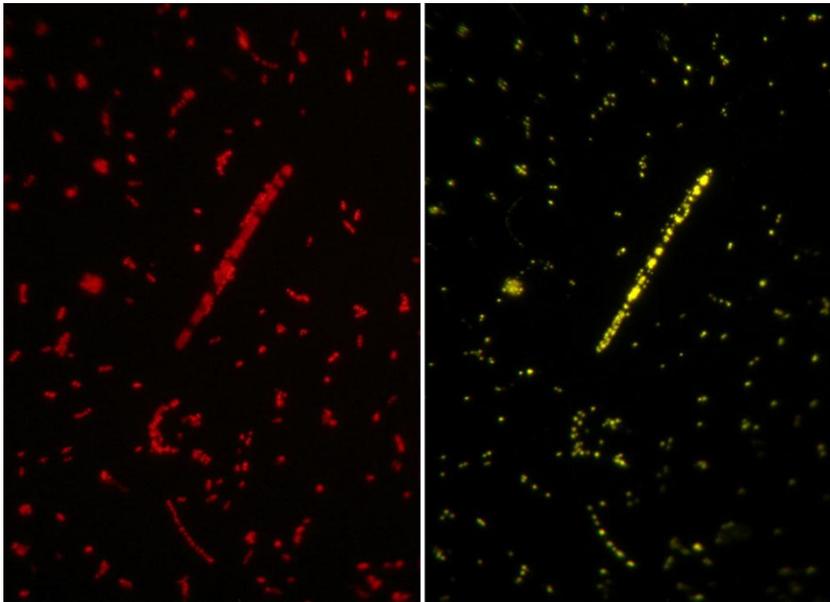


Figura 8.17. (A) Microfotografía de epifluorescencia, en rojo autofluorescencia de la ficocianina (B) Microfotografía de epifluorescencia, en amarillo fluorescencia de los gránulos de polifosfato teñidos con DAPI. Tiempo final, tras 6 días de incubación con $30\mu\text{M}$ de P en la Laguna de La Cruz, con agua de 10 metros de profundidad.

8.4. Discusión

La discusión del presente capítulo engloba la experimentación, tanto de campo como de laboratorio, que nos ayude a explicar los resultados obtenidos en éste y en capítulos anteriores. En general, los ensayos se pueden dividir en dos grupos: los ensayos específicos, para dar respuesta a preguntas sencillas y concretas; y un ensayo general, para intentar resolver aspectos más complejos del desarrollo y dinámica de Pcy, en relación a la profundidad a la que se desarrolla, y en su interacción con los recursos y el resto de organismos con los que convive (Auer et al., 2004).

La primera incubación (epilimnion) fue realizada con agua de 6 metros e incubada a su profundidad, en el inicio de la termoclina y en el máximo de concentración de oxígeno disuelto, con una temperatura de 20 °C y recibiendo el 10% del PAR incidente. Las poblaciones de Pcy, en esta profundidad, están limitadas por fósforo disuelto, lo que es muy común en este tipo de ecosistemas (Beardall et al., 2001; Sterner, 2008). De los cuatro tratamientos con adición de fósforo, tres de ellos han aumentado, significativamente, la abundancia de Pcy respecto al tiempo inicial: NP10, NP30 y PZ; únicamente el tratamiento NPZ no ha tenido como respuesta un incremento en la abundancia, debido al zooplancton. El incremento más importante de abundancia se ha observado en el tratamiento NP10, lo que indica un importante efecto de la depredación. El efecto combinado de NP con la retirada de diferentes fracciones de zooplancton en NP10 y NP30 coincide, además, con un descenso significativo en la concentración final de fósforo disponible en esos tratamientos, lo que indica una capacidad mayor de agotar este nutriente, que es característico de poblaciones picoplanctónicas como Pcy. Este agotamiento tan exhaustivo no ocurre en tratamientos con zooplancton como PZ, aunque aumente la población de Pcy.

En cuanto al nitrógeno, de las dos formas inorgánicas adicionadas, nitrato y amonio, sólo se ha observado un consumo significativo de amonio (alrededor de un 20% del adicionado) en tratamientos con co-adición de fósforo (NP), y ninguna asimilación apreciable de nitrato en ningún tratamiento. Esta preferencia por el amonio, como forma de asimilación prioritaria, es perfectamente coherente con lo esperado, ya que implica un menor gasto de energía incorporar un compuesto reducido como el amonio que uno oxidado, que hay que reducir posteriormente, con el consiguiente gasto extra de energía. No obstante, el amonio en el epilimnion sólo es incorporado en presencia de fósforo, lo que corrobora el carácter limitante de este último en la Laguna de la Cruz. Cuando es el nitrógeno el que está en exceso se acumula, principalmente como ficoeritrina, mostrando un tipo de adaptación muy común en este tipo de poblaciones picoplantónicas, que utilizan este pigmento, además de como adaptación cromática, como un reservorio de nitrógeno.

Los datos de clorofila-*a* muestran un incremento significativo en los tratamientos filtrados por 30µm (C30 y NP30), incremento probablemente debido al desarrollo de fitoplancton, que se ve libre de depredadores. Sin embargo, en las incubaciones potenciales, es decir, con agua de 6 metros de profundidad, incubada a 4 metros y en superficie, se observa un importante incremento de clorofila-*a* y ficoeritrina (PE) en los tratamientos con nutrientes. La luz y nutrientes parecen ser un factor de limitación importante para estas poblaciones que no presentan problemas de fotoinhibición en superficie. Sin embargo, en las incubaciones a 10 y 12 m de profundidad, el ratio PE/clorofila-*a* aumenta, al iniciar el proceso de aclimatación a bajas intensidades de luz, y lo hace de manera más importante en los controles sin adición de nutrientes, indicando que este proceso puede estar ligado a concentraciones bajas de nutrientes, principalmente al fósforo soluble.

Como se observa en los experimentos, tras la adición de fósforo soluble, la concentración de este descende, a las pocas horas, a niveles incluso inferiores a los iniciales, como consecuencia de la captación por parte de la fracción picoplanctónica, tanto Pcy como NPB. En presencia de fósforo, la abundancia de Pcy aumenta cuando la presión de depredación se relaja, tanto de ciliados, rotíferos y crustáceos (NP30) como de nanoflagelados (NP10). Sin embargo, la población de NPB, también favorecida por la ausencia de depredadores, muestra incluso una respuesta positiva en los tratamientos control sin adición de nutrientes en los que se han eliminado los depredadores. Esto indica que a esta profundidad, a diferencia de Pcy, estas bacterias (NPB) no estarían limitadas por la disponibilidad de nutrientes inorgánicos, sino que sería la presión de depredación la que controla sus abundancias. La retirada experimental de la fracción superior a 10 μm produce también un incremento notable de las tasas de fotosíntesis oxigénica, debido al relajamiento de la depredación sobre Pcy, al igual que ocurre con la producción bacteriana, lo que señala el posible acoplamiento existente entre ambos metabolismos (Langenheder y Jürgens, 2001).

Esta presión de depredación se refleja también en las relaciones pigmentarias observadas en la columna de agua, en particular, en la relación clorofilida-*a*/clorofila-*a*. Este ratio es un buen indicador de la presión de depredación existente sobre el fitoplancton, ya que es necesaria la actividad clorofilasa para separar el grupo fitol de la clorofila-*a* y rendir con ello clorofilida-*a*. Este ratio a 6 metros de profundidad, a pesar de ser inferior al los observados a 10 y 12 metros, indica que casi una cuarta parte de la clorofila presente se encuentra en forma de clorofilida-*a* sugiriendo, con ello, una mayor presión de depredación, que probablemente, sea efectuada, mayoritariamente, por pequeños nanoflagelados presentes a estas profundidades.

Una segunda incubación se realizó a 10 metros de profundidad (metalimnion superior), en la parte inferior de la termoclina y a una temperatura de 7°C. En esta profundidad que recibe, aproximadamente, el 1% del PAR incidente en superficie, se observan las mínimas tasas, tanto de fotosíntesis oxigénica como de producción bacteriana. Por su parte, las incubaciones realizadas a esta profundidad muestran una población de Pcy aparentemente no limitada por la disponibilidad de nutrientes. En este caso, el fósforo, en forma soluble, desaparece totalmente al final de las incubaciones, mientras que el nitrógeno inorgánico (nitrato y amonio) no es asimilado de manera significativa. Así, en los tratamientos sin adición de nutrientes, pero privados de zooplancton (C10 y C30), es donde las abundancias de Pcy muestran un incremento, particularmente en el tratamiento con agua previamente filtrada por 30 μm (C30), lo que sugiere que la presión de depredación en el metalimnion obedecería, más particularmente, a los ciliados, rotíferos y crustáceos.

A esta profundidad, la adición de nutrientes produce los descensos más notables en las abundancias de Pcy. Es posible, en este caso, que la presencia en exceso de nutrientes elimine la ventaja competitiva de estas poblaciones sobre otros grupos del plancton. Por el contrario, la población de NPB aumenta, significativamente, su abundancia en estos tratamientos suplementados con nutrientes, aunque lo hacen principalmente en los tratamientos prefiltrados por 10 μm y 30 μm , revelando, también a esta profundidad, la existencia de un control de la población de NPB por parte de los depredadores. Las tasas fotosintéticas resultan muy bajas en ambos tratamientos pre-filtrados, pero también en los tratamientos con agua sin filtrar. No obstante, sí se observa un incremento, en los controles de ambos tratamientos filtrados, que coincide con el aumento de biomasa observado. En este sentido, cabe recordar que es en esta profundidad donde se observan las relaciones *clorofilida-a/clorofila-a* más

elevadas. Por su parte, la producción bacteriana aumenta en el tratamiento adicionado con nutrientes y pre-filtrado por 30 μm .

Las concentraciones de clorofila-*a* y ficoeritrina no muestran cambios significativos en los diferentes tratamientos; el incremento de abundancia de Pcy no está asociado a un incremento en la clorofila-*a* ni en la ficoeritrina, probablemente porque no implique un aumento en su biomasa. Los diferentes tratamientos tampoco afectan al resto de organismos fotosintéticos de la laguna. Sin embargo, las incubaciones potenciales, a diferentes profundidades, muestran que hay muchas poblaciones fotosintéticas que están limitadas por luz, con un óptimo a 4 m de profundidad y fotoinhibición en superficie. Las Pcy son una fracción muy importante de estas poblaciones, ya que la ficoeritrina presenta un patrón idéntico al de la clorofila-*a*, con una acumulación importante de este pigmento en los tratamientos con adición de nutrientes.

En la tercera incubación, realizada a 12 metros de profundidad (hipolimnion superior), en el fondo de la termoclina y a 5 °C, es donde se localiza el máximo profundo de clorofila-*a*, el máximo de actividad de fijación de carbono como fotosíntesis oxigénica y el máximo profundo de producción bacteriana acoplado al máximo profundo de clorofila-*a*, siendo además la profundidad donde llega, aproximadamente, el 0,1% del PAR incidente. La biomasa de Pcy, en esta profundidad, aumenta en todos los tratamientos donde se ha eliminado la biomasa de depredadores, mostrando que estos ejercen un fuerte control sobre la población de Pcy. Además de la biomasa, la asimilación de carbono por fotosíntesis oxigénica también está limitada por depredación, aumentando la fotosíntesis oxigénica en los tratamientos donde se han retirado las fracciones de 10 μm y, principalmente, de 30 μm , independientemente de la adición de nutrientes. Sin embargo, la abundancia y biomasa del resto del picoplancton heterótrofo no parece estar controlada, ni por la disponibilidad de nutrientes, ni

por la depredación, ya que no responde a ninguno de los tratamientos ensayados. La producción bacteriana, no obstante, aunque responde a la adición de nutrientes, mantiene tasas relativamente bajas; es muy probable que a 12 metros de profundidad, y debido a factores como la temperatura, el período de incubación no sea suficiente para observar cambios en la biomasa de esta fracción picoplanctónica.

No existe pues, una limitación por nutrientes evidente en el máximo profundo de clorofila-*a*, aunque el fósforo soluble adicionado es totalmente consumido de nuevo, como en las profundidades anteriores, esta asimilación no está relacionada con el incremento en biomasa. Con respecto al nitrógeno adicionado, no se observa asimilación en ninguno de los tratamientos. En los tratamientos filtrados por 30 μm , tanto control como NP, se observa una importante acumulación de ficoeritrina, con un descenso importante de la concentración de clorofila-*a* en estos tratamientos, lo que sugiere que la retirada de los depredadores de mayor tamaño induce a la acumulación de nitrógeno por parte de las poblaciones de Pcy. Al igual que ocurre a 10 metros de profundidad, el alto valor de la proporción clorofilasa-*a*/clorofila-*a* (de nuevo la mitad de la clorofila está en forma de clorofilida-*a*), apoya la existencia de una fuerte presión por depredación sobre estas poblaciones fotosintéticas. Muchas de ellas están limitadas por luz (Karlsson et al., 2009), ya que las incubaciones potenciales realizadas muestran un patrón muy similar al observado a 10 metros. Sin embargo, las poblaciones del máximo profundo de clorofila, incubadas a intensidades de luz más altas del 0,1%, muestran una pérdida muy importante de ficoeritrina y de su proporción respecto a la clorofila-*a*, en un proceso de adaptación de las poblaciones de Pcy a regímenes de luz mayores.

En la Laguna de la Cruz, durante el período de máxima estratificación y estabilidad a nivel global, y en el momento en el que la biomasa de Pcy es más

importante, tanto en valor absoluto como en valor relativo, se puede concluir que el control de las poblaciones de Pcy es por depredación, principalmente en la DCM. Existen diferentes metodologías para estimar la depredación y las tasas de depredación, y se han acumulado multitud de trabajos acerca de la depredación sobre Pcy (Jürgens et al, 1994; 1999; Zöllner et al., 2003; Pernthaler, 1996; 2005), tanto de protozoos y nanoflagelados como de metazooplancton. Pese al importante número de trabajos, existen importantes discrepancias sobre el impacto de los diferentes depredadores sobre las poblaciones de Pcy. En general, el mayor impacto se identifica con nanoflagelados y pequeños ciliados (Stockner y Antia, 1986; Simek, 1995; Sanders et al., 2000) y se conocen con detalle tasas de ingestión sobre Pcy en muchos sistemas acuáticos, sin embargo, es más problemático el establecer en qué medida esta depredación afecta al desarrollo y abundancia de Pcy. En la Laguna de la Cruz, la abundancia de Pcy está limitada por la depredación pero mantiene valores de abundancia un orden de magnitud por encima de lo esperado para sistemas acuáticos similares (Callieri et al., 2012). El fósforo soluble y su dinámica sirven para comprender el dominio de Pcy sobre el resto de organismos fotosintéticos (Currie y Kalf, 1984). Estas poblaciones presentan una tasa de captación y acumulación de este nutriente (en forma de pirofosfato) tan alta que las concentraciones en la laguna siempre son, en relación a las Pcy, limitantes para el resto de microorganismos. Esta estrategia permite que tengan fósforo disponible (y nitrógeno en forma de ficoeritrina), proporcionando una ventaja muy importante respecto al resto de grupos fotosintéticos, lo que permite mantener abundancias de Pcy muy altas respecto a sistemas acuáticos similares.

8.5. Referencias

- Auer, B., Elzer, U., & Arndt, H. (2004). Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resource and predation. *Journal of Plankton Research*, 26(6), 697-709.
- Beardall, J., Young, E., & Roberts, S. (2001). Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic sciences*, 63(1), 44-69.
- Bird, D. F., & Kalff, J. (1987). Algal phagotrophy: regulating factors and importance relative to photosynthesis in Dinobryon (*Chrysophyceae*). *Limnology and Oceanography*, 32(2), 277-284.
- Callieri, C., Pugnetti, A., & Manca, M. (1999). Carbon partitioning in the food web of a high mountain lake: from bacteria to zooplankton. *Journal of Limnology*, 58(2), 144-151.
- Callieri, C., Coci, M., Corno, G., Macek, M., Modenutti, B., Balseiro, E., & Bertoni, R. (2012). Phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria. *FEMS microbiology ecology*, 85(2), 293-301.
- Currie, D. J., & Kalff, J. (1984). A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 29, 298-310.
- Galloway, J. N. (1998). The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environmental pollution*, 102(1), 15-24.
- Harpole, W. S., Ngai, J. T., Cleland, E. E., Seabloom, E. W., Borer, E. T., Bracken, M. E., & Smith, J. E. (2011). Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecology Letters*, 14(9), 852-862.

Hecky, R. E., & Kilham, P. (1988). Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography*, 33, 796-822.

Jürgens, K., Arndt, H., & Rothhaupt, K. O. (1994). Zooplankton-mediated changes of bacterial community structure. *Microbial Ecology*, 27(1), 27-42.

Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., & Amann, R. (1999). Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1241-1250.

Karlsson, J., Byström, P., Ask, J., Ask, P., Persson, L., & Jansson, M. (2009). Light limitation of nutrient-poor lake ecosystems. *Nature*, 460(7254), 506-509.

Langenheder, S., & Jürgens, K. (2001). Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnology and Oceanography*, 46(1), 121-134.

Marleau, J. N., Guichard, F., & Loreau, M. (2015). Emergence of nutrient co-limitation through movement in stoichiometric meta-ecosystems. *Ecology letters*.

Mehner, T., Benndorf, J., Kasprzak, P., & Koschel, R. (2002). Biomanipulation of lake ecosystems: successful applications and expanding complexity in the underlying science. *Freshwater Biology*, 47(12), 2453-2465.

Nogueira, P., Domingues, R. B., & Barbosa, A. B. (2014). Are microcosm volume and sample pre-filtration relevant to evaluate phytoplankton growth?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461, 323-330.

Pernthaler, P. (1996). Short-term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligo-mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 18(3), 443-462.

- Pernthaler, J. (2005). Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(7), 537-546.
- Petersen, J. E., Kemp, W. M., Bartleson, R., Boynton, W. R., Chen, C. C., Cornwell, J. C., & Suttles, S. E. (2003). Multiscale experiments in coastal ecology: improving realism and advancing theory. *BioScience*, 53(12), 1181-1197.
- Pollingher, U., Berman, T., Kaplan, B., & Scharf, D. (1988). Lake Kinneret phytoplankton: response to N and P enrichments in experiments and in nature. *Hydrobiologia*, 166(1), 65-75.
- Raven, J. A. (2015). Interactions between Nitrogen and Phosphorus metabolism. *Annual Plant Reviews Volume 48: Phosphorus Metabolism in Plants*, 187-214.
- Sanders, R. W., Berninger, U. G., Lim, E. L., Kemp, P. F., & Caron, D. A. (2000). Heterotrophic and mixotrophic nanoplankton predation on picoplankton in the Sargasso Sea and on Georges Bank. *Marine Ecology Progress Series*, 192(1), 103-118.
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, 195(4275), 260-262.
- Sherr, E. B., Sherr, B. F., Berman, T., & Hadas, O. (1991). High abundance of picoplankton-ingesting ciliates during late fall in Lake Kinneret, Israel. *Journal of plankton research*, 13(4), 789-799.
- Šimek, K., Bobkova, J., Macek, M., Nedoma, J., & Psenner, R. (1995). Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: A study at the species and community level. *Limnology and Oceanography*, 40(6), 1077-1090.
- Sterner, R. W. (2008). On the phosphorus limitation paradigm for lakes. *International Review of Hydrobiology*, 93(4-5), 433-445.

- Stockner, J. G., & Antia, N. J. (1986). Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 43(12), 2472-2503.
- Weisse, T. (1990). Trophic interactions among heterotrophic microplankton, nanoplankton, and bacteria in Lake Constance. In *Trophic Relationships in Inland Waters* (pp. 111-122). Springer Netherlands.
- Wetzel, R. G., & Likens, G. E. (2000). *Limnological analysis*. WB Saunders Co. Philadelphia. 357p. Prancha.
- Wurtsbaugh, W. A., Vincent R., W., Tapia, R. A., Vincent, C. L., & Richerson, P. J. (1985). Nutrient limitation of algal growth and nitrogen fixation in a tropical alpine lake, Lake Titicaca (Peru/Bolivia). *Freshwater Biology*, 15(2), 185-195.
- Zöllner, E., Santer, B., Boersma, M., Hoppe, H. G., & Jürgens, K. (2003). Cascading predation effects of *Daphnia* and copepods on microbial food web components. *Freshwater Biology*, 48(12), 2174-2193.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La Laguna meromítica de La Cruz, localizada en la serranía de Cuenca (1032 m.s.n.m.), está situada en el fondo de una dolina de hundimiento, de forma circular, con 116 m. de diámetro, 21 metros de profundidad y 10.000 m² de área superficial. La laguna presenta una fuerte estratificación térmica estival, con gradientes verticales físicos y químicos muy marcados. Estos gradientes permiten una gran diversidad de microambientes o nichos donde se pueden desarrollar diferentes poblaciones de microorganismos con una gran variedad de metabolismos, tanto autótrofos como heterótrofos.
2. La marcada termoclina estacional y su carácter meromítico permite que se formen dos máximos de estabilidad, que estimados como frecuencia de Brunt Väissälä muestran un máximo permanente en la pycnoclina, a 16 metros de profundidad, y otro en la termoclina, de profundidad variable a medida que avanza la estratificación. Esto aísla durante todo el período de estratificación al metalimnion e hipolimnion, permitiendo la microestratificación estable de las poblaciones microbianas y limitando la difusión de materia y energía en el perfil vertical como, por ejemplo, la difusión de nutrientes desde el monimolimnion.
3. En la Laguna de La Cruz se han identificado 5 morfologías diferentes de picocianobacterias. El tipo dominante, a lo largo de todo el ciclo limnológico, es un bacilo pequeño, de 1,4 x 0,8 μm de promedio y un volumen de 0,6 μm³. El resto de tipos de Pcy presentan distribuciones muy variables, con variaciones importantes respecto al tipo del dominante.
4. Los valores de abundancia promedio de Pcy en el perfil vertical se encuentran en el orden de magnitud de 10⁶, con valores máximos de abundancia, en el máximo profundo de clorofila (DCM), en torno a 14 x 10⁶ células ml⁻¹. Estos son valores relativamente altos para este tipo de sistemas

Conclusiones

acuáticos que, en general, presentan rangos de abundancia con magnitudes entre 10^3 y 10^5 células ml^{-1} .

5. La dinámica estacional de las Pcy muestra que, tras la mezcla invernal, las poblaciones aumentan su abundancia en primavera, distribuyéndose homogéneamente por el epilimnion y el metalimnion de la laguna. Sin embargo, a medida que avanza la estratificación, y como consecuencia de la disponibilidad de nutrientes, presión por depredación y gradiente de luz, las poblaciones de Pcy se concentran formando un máximo profundo (DCM) en torno a la oxiclina. Con los máximos profundos bien establecidos, a mediados del verano se produce la pérdida de más de la mitad de la biomasa de Pcy por el fenómeno de precipitación cálcica tumultuosa (“*whiting*”). A partir de septiembre se observa un incremento de biomasa de Pcy en el máximo profundo de clorofila-*a*, entre 10 y 12 metros de profundidad, que no afecta significativamente a los valores integrados de Pcy en la laguna.

6. En la Laguna de la Cruz, las abundancias de picoeucariotas (Ape) observadas son relativamente bajas, en torno a 3 órdenes de magnitud inferiores a la abundancia de Pcy, y con un patrón estacional muy definido. Durante el período de mezcla estos picoeucariotas se encuentran en todo el mixolimnion y presentan sus valores de abundancia máximos anuales. A medida que avanza el proceso de estratificación, se acumulan en el máximo profundo de clorofila, siguiendo un patrón paralelo al observado con Pcy.

7. La dinámica anual de biomasa de los principales organismos fotosintéticos de la laguna, Pcy y nanofitoplancton, sigue un patrón complejo; mientras que las Pcy aumenta su biomasa integrada en la columna de agua a partir de primavera, llegando a representar el 73% de la biomasa fotosintética, el nanofitoplancton lo hace a partir del verano, alcanzando sus máximos valores

integrados en otoño, tras la drástica pérdida de biomasa de Pcy en el fenómeno de precipitación cálcica, y llegando a representar el 76% de la biomasa del total de organismos fotosintéticos. Este máximo de nanofitoplacton es debido, principalmente, a la formación de densas comunidades epilimnéticas de Desmidiaceas (*Cosmarium sp.*) y al aumento de dinoflagelados que, en términos de biomasa, dominan sobre *Cryptomonas* y Clorófitas. Tras la mezcla, la mayor parte de la biomasa que se retira de la columna de agua es de algas eucariotas, pasando las diatomeas (*Cyclotella sp.*) a co-dominar junto con Pcy la biomasa de organismos fotosintéticos en la laguna.

8. La Laguna de La Cruz presenta comunidades estables de bacterias fotosintéticas, principalmente, la bacteria púrpura del azufre (PSB), *Lamprocystis purpurea*, y la bacteria verde del azufre (GSB), *Chlorobium chlatratiforme*. En general, su contribución a la biomasa global integrada de organismos fotosintéticos es relativamente pequeña, entre 1-3% del total de biomasa para *Lamprocystis purpurea* y entorno al 0,1% para *Chlorobium chlatratiforme*. *Lamprocystis purpurea* se desarrolla principalmente, en el monimolimnion durante el período de mezcla invernal y en la interfase óxico-anóxica, justo bajo la DCM, y en el hipolimnion superior durante el período de estratificación. *Chlorobium chlatratiforme* se desarrolla, principalmente en primavera, manteniendo poblaciones estables durante el resto del período de estratificación por debajo de *Lamprocystis*. Pese a lo limitado de su contribución a la biomasa global, sus poblaciones se localizan en capas relativamente densas, donde pueden alcanzar tasas netas de asimilación de carbono, en primavera, equiparables a las de la fotosíntesis oxigénica, pero localizadas en capas muy finas.

9. La abundancia y biomasa de “NPB” (“non photosynthetic bacteria”), que comprende, tanto bacterias heterótrofas como quimiolitotrofas, muestra los

Conclusiones

mayores valores de abundancia en las aguas anóxicas del hipolimnion y, sobretodo, del monimolimnion, donde se pueden alcanzar valores de 80×10^6 células ml^{-1} . Las células de mayor tamaño se localizan en el metalimnion e hipolimnion superior, mientras que las células de menor tamaño se encuentran en el monimolimnion y en el epilimnion, donde se observa una importante pérdida de tamaño a medida que avanza la estratificación.

10. La biomasa integrada de todos los productores primarios (Pcy, Ape, GSB, PSB y nanofitoplacton) aumenta a medida que se desarrolla la estratificación, desde 3 g C m^{-2} en primavera a $5,5 \text{ g C m}^{-2}$ en otoño. La biomasa de “NPB” está acoplada a la producción primaria, subiendo desde $1,5 \text{ g C m}^{-2}$ en primavera a $7,5 \text{ g C m}^{-2}$ en otoño. Sin embargo, la mezcla vertical produce un desfase muy significativo en este acoplamiento; la biomasa fotosintética, principalmente debido al nanofitoplacton, desciende a $1,5 \text{ g C m}^{-2}$, parte de esta biomasa sedimenta en el monimolimnion y otra parte es mineralizada en el mixolimnion, que además ha sido fertilizado con los nutrientes del hipolimnion. Esto permite mantener la biomasa bacteriana de “NPB” en más de 6 g C m^{-2} , sin depender de la producción primaria contemporánea, que es muy baja en ese período. La demanda de oxígeno disuelto se eleva, mostrando concentraciones mixolimnéticas inferiores a 4 mg l^{-1} . Este proceso de mineralización invernal, junto con el proceso de mezcla, son responsables de la mayor disponibilidad de nutrientes, principalmente de fósforo, que las Pcy acumulan eficientemente, permitiendo su rápido desarrollo primaveral.

11. La Laguna de la Cruz presenta unas características intrínsecas que permiten sea un buen sistema modelo para diferentes tipos de estudios, tanto metodológicos, relacionados con la distribución espacial en el perfil vertical de las diferentes poblaciones de organismos fotosintéticos, como funcionales, tanto a nivel metabólico como, por ejemplo, estudios de asimilación inorgánica de

carbono, o de funcionamiento de la red trófica, mediante experimentación, “*in situ*” (microcosmos) o en el laboratorio.

12. En relación al análisis de los diferentes pigmentos fotosintéticos presentes, en primer lugar, se ha desarrollado un protocolo específico para sistemas estratificados que permite la identificación y cuantificación de la mayor parte de los pigmentos fotosintéticos en una única carrera cromatográfica. Por otro lado, se ha comprobado la adecuación, de las diferentes ecuaciones espectrofotométricas más usadas en la bibliografía, a este tipo de ecosistemas, mostrando que es posible el uso de técnicas espectroscópicas para el estudio de mezclas complejas de pigmentos fotosintéticos en sistemas estratificados, recomendándose el uso de ecuaciones tricromáticas para la determinación de clorofila-*a* y de las ecuaciones de Overman y Tilzer para la determinación de pigmentos bacterianos.

13. En relación a la viabilidad de la citometría de flujo para la identificación y cuantificación de las poblaciones de organismos fotosintéticos en la laguna, se ha observado que la citometría de flujo nos ofrece menos información, principalmente en la identificación de morfotipos y en el cálculo de biovolúmenes, que los recuentos clásicos por microscopía. Sin embargo, en sistemas con una calibración adecuada, como en la Laguna de La Cruz, podemos identificar los grupos de organismos fotosintéticos más importantes y realizar cuantificaciones significativamente similares a las realizados por microscopio, con una única muestra y en una fracción de tiempo mucho menor. Esto, en nuestro caso, permite el diseño de experimentos más complejos, con una limitación menor de tiempo y coste.

14. La producción anual integrada en la columna de agua de la Laguna de La Cruz, durante el ciclo limnológico 2006, fue de $183,6 \text{ g C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ dentro del

Conclusiones

rango observado en lagos mesotróficos. La mayor parte de esta producción es debida a procesos dependientes de la luz (92,4%), particularmente a la fotosíntesis oxigénica (89,7%), mientras que la fotosíntesis anoxigénica constituyó un 2,7% y la quimiolitotrofia el 7,6% restante.

15. La inhibición específica de la actividad eucariota mostró que el 80,5% de la actividad fotosintética durante el período de mezcla invernal, y en el epilimnion y metalimnion superior en el período de estratificación otoñal, era atribuible a las Pcy. Sin embargo, la contribución fue más equilibrada en el máximo profundo otoñal de clorofila-*a*, con una contribución eucariota de hasta el 52%, debido principalmente a la presencia de nanoflagelados fotosintéticos (*Cryptomonas sp.*).

16. En la Laguna de la Cruz, la asimilación de carbono se realiza por parte de diferentes grupos de organismos con diversos metabolismos implicados. Se observa un papel muy importante de la fracción procariota en el ciclo global de carbono de la laguna, representando la base de la red trófica del sistema, lo que implica que la sucesión del fitoplancton y los patrones de producción primaria sean diferentes a los observados en otras tipologías de lagos.

17. Los ensayos “*in situ*” y de laboratorio realizados para establecer la importancia de diferentes factores, nutrientes, depredación y luz, en la abundancia de las Pcy muestran que, durante el período de estratificación sólo existe limitación por nutrientes, fósforo soluble, en el epilimnion, aunque con un importante efecto de la depredación, principalmente por organismos de tamaño inferior a 10µm, como nanoflagelados, sobre las Pcy. En el metalimnion y en el hipolimnion superior, el principal factor que controla las poblaciones de Pcy es la depredación, tanto de protozoos y nanoflagelados como de metazooplancton.

18. Pese a la presión por depredación, las Pcy presentan valores de abundancia un orden de magnitud por encima de lo esperado para sistemas acuáticos similares. El fósforo soluble, y su dinámica, es un factor clave para comprender el dominio de Pcy sobre el resto de organismos fotosintéticos. Sus altas tasas de captación y acumulación (en forma de pirofosfato) mantienen este nutriente en concentraciones limitantes para el resto de microorganismos. Esta estrategia permite a las Pcy aumentar la acumulación de fósforo y nitrógeno (este último en forma de ficoeritrina), proporcionando una ventaja muy importante respecto al resto de grupos fotosintéticos, lo que permite alcanzar abundancias de Pcy muy altas respecto a sistemas acuáticos similares.