



Ecología del fitoplancton de una laguna cárstica estratificada: distribución vertical, estacionalidad y limitación por nutrientes

Sara M^a Morata Felipe

Tesis Doctoral 2015



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

Programa de Doctorado: CONTAMINACIÓN AMBIENTAL –

INTERDEPARTAMENTAL

**Ecología del fitoplancton de una laguna cárstica estratificada:
distribución vertical, estacionalidad y limitación por nutrientes**

Phytoplankton ecology in a stratified karstic lake:
vertical distribution, seasonality and nutrient limitation

Sara María MORATA FELIPE

TESIS DOCTORAL

2015

Directores:

Dra. María Rosa MIRACLE SOLÉ
Dr. Antonio CAMACHO GONZÁLEZ

Tesis presentada por SARA MARÍA MORATA FELIPE para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, con el título

ECOLOGÍA DEL FITOPLANCTON DE UNA LAGUNA CÁRSTICA
ESTRATIFICADA: DISTRIBUCIÓN VERTICAL, ESTACIONALIDAD Y
LIMITACIÓN POR NUTRIENTES

PHYTOPLANKTON ECOLOGY IN A STRATIFIED KARSTIC LAKE: VERTICAL
DISTRIBUTION, SEASONALITY AND NUTRIENT LIMITATION

Firmado: Sara María Morata Felipe

Tesis dirigida por los Doctores en Ciencias Biológicas,
Dra. MARÍA ROSA MIRACLE SOLÉ
Dr. ANTONIO CAMACHO GONZÁLEZ

Firmado:
María Rosa Miracle Solé
Catedrática de Ecología
Universidad de Valencia

Firmado:
Antonio Camacho González
Prof. Titular en Ecología
Universidad de Valencia

While the relatively simple organizational state of many pelagic communities reflects their vulnerability to change and emphasizes the fragility of internal processes in the face of a physically dynamic, abiotic environment, the patterns are sufficiently clear for it to be possible to abstract some draft rules of emergence

Emergence in pelagic communities (C.S. Reynolds, 2001)

L'essentiel est invisible pour les yeux

Le Petit Prince (Antoine de Saint-Exupéry)

Agradecimientos / Acknowledgements

Empieza a despuntar el día...pero no es un día como muchos otros, implica el fin de un ciclo y el inicio de otro...aún no conozco el camino, aún no creo estar escribiendo estas palabras...sólo el sol incipiente reconforta esta inquietud...

He de empezar por agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD) del Gobierno de España por concederme una beca F.P.U. (2001-2005) para iniciar esta investigación.

Quiero agradecer a mis directores de tesis, M^a Rosa Miracle y Antonio Camacho el haber confiado en mí para poder realizar este trabajo, a pesar de tantas situaciones en las que las circunstancias me han impedido ser más resolutiva. Y a Eduardo Vicente, porque siempre albergó la esperanza de que lo conseguiría.

Toni, no puedo dejar de agradecerte esos momentos y conversaciones que en cierta medida me han conducido a terminar esta etapa de mi vida, y como me dices ‘más por ti que por mí’.

Antonio Picazo, gracias por haber compartido conmigo el gran trabajo que realizamos en la Laguna de El Tejo en los años 2003-04 para sacar una parte de esta tesis adelante. Y agradecer muy especialmente a Carlos Rochera, Yolanda Roa y Nieves Sánchez por ayudarnos en la mayoría de campañas de muestreo y en el laboratorio. Una tarea de tal envergadura pudo realizarse con la colaboración de muchas otras personas que en algún momento nos prestaron su ayuda: L. Romero, J. Marco, M.D. Sendra, C. Ferriol, M.J. Villena, Chuso, Katharina y familia de A. Picazo. Esto no hubiera sido posible sin todas vuestras manos. A Juan Carlos, por animarme a terminar este estudio en las lagunas de tu pueblo.

Agradecer la acogida y ayuda en todas las estancias que he realizado gracias a la beca FPU del MECD. Obrigada! Maria Leitão (Angers-Francia), por tus enseñanzas en el maravilloso mundo de las algas microscópicas y por tu amistad. Köszönöm! Keve T. Kiss, Éva Ács, Itsván Grigorszky y Gizella Fehér (Hungria) por ayudarme en la identificación de varias especies de algas de la Laguna de El Tejo. Thanks! Jane Reed (Hull-UK) por acercarme al mundo de las diatomeas en profundidad. Y a Isa por ser esa gran amiga que encontré en el universo ‘juliense’...¡lo he conseguido!

Paco Mezquita, Javier Armengol, Carmen Rojo, gracias por vuestras conversaciones tan constructivas ante mis desasosiegos. José A. Gil-Delgado, te agradeceré siempre haber hecho lo imposible para conseguir que terminase y por ser como un padre académico.

David, por esos grandes momentos vividos en el laboratorio...hay frases tuyas que no puedo olvidar. A Lidia, por escuchar siempre mis lamentos y buscar las palabras adecuadas. A Carmen, Dani, Juan, Loles, MJosé, MLoli, Rafa por esas charlas en mis inicios de colaboradora en la unidad. A María, por ser genial muestrear contigo. A Javi,

por alegrar siempre el día. A Edu, por ser mi compi en la lucha desde el principio. A Carmen ‘cloudy’, Cristina, Pepa y Raquel por estar, independientemente del tiempo y la distancia. A Olga por entenderme.

Carlos, he de agradecerte de corazón tu amistad y ayuda en cualquier momento y circunstancia (incluso con unas sardinas en la mano). Sigo creyendo que eres una mente privilegiada, pero sobretodo una maravillosa persona.

A mis madres, Nieves y Yoli, y a Esther, gracias por todas esas situaciones increíbles vividas en el laboratorio y fuera de él. Gracias por cuidarme y quererme.

Mini-pandi, os agradezco estar siempre ahí: Andrés, M^a Cruz, Merche, Pepe, Pilar, y en especial a ti Carol por ser mi incombustible compañera de batallas. A mis dos mosqueteros, Diego y Eugenio. Chicos, al fin llegó este momento.

Agradecer el apoyo y amistad de Alessandro, Álex, Ana, Ana Cristina, Ben, Carla, Carlos-Fernández, Charo, David, Diana, Elena, Fátima, Gabriela, Javi, Jota, Juan Antonio, Laia, Luis, Maikol, Mati, Maru, MyMary, Naye, Nese, Nohe, Nuri, Oli, Óscar, Pablo, Raquelita, Sergi, Serif, Vir, Xavi, Younes, Zamira, y por supuesto a la gran Raffaella que nunca nos falla.

A mis membrilleros, mi ‘otra pila’ Ángela y Limón, Ángela C., Benito, Carlos, Carmen, Eva, Gema e Isra, Leo, Mapi, Menchu, Olgy y Emilio, Quique, Rafa y Rubén. Ni os imagináis lo mucho que me habéis ayudado en estados de ánimo terribles. Alghata Bowie os lo agradece de corazón.

A mis señoras de Xátiva. Oli y Sergio, nadie como vosotros para subir el ánimo en nuestra mesa camilla. Gracias por todo el apoyo que me habéis dado para poder terminar esta tesis. Se les quiere muchísimo, muy señoras mías. Y a Guille y Vic, miembros suplentes del momento anisete.

Agradecer el apoyo logístico en esta recta final de la tesis a Antonio, Carla, Carlos, Dicky, Gabriela, Mary, Maru, Naye, Pablo, Oli, Vicente y Luis. Xavi, gracias por toda tu ayuda y esas risas compartidas en nuestro cubículo de locura. David, gracias chamaco por absolutamente todo lo que has hecho por Maru y por mí. Los cachitos nos esperan.

A mi Maru. Amiga mía, me parece increíble haber llegado hasta aquí juntas. Ha sido una catarsis, pero lo hemos logrado. Mil gracias por millones de cosas. Adiós gritesis. Te quiero un chingo.

Jean, Brigitte, Isabelle et Johanne, je vous remercie de votre soutien et de votre confiance.

En especial quiero dar las gracias a mi familia, por apoyarme en todo momento, aun pensando que esto era un túnel sin fin. Papá, mamá, hermanica, os quiero mucho...Algún día le contaré a Marta esta extraña coincidencia de su venida a este mundo cuando su tita estaba dilatando...

A mi abuela Ale, porque tus enseñanzas sobreviven a tu ausencia. Te pienso, siempre.

Oli quiero agradecer tu apoyo incondicional, esa confianza ciega depositada en mí, y esa emoción que me has transmitido estos días. Por estar. Por ser.

With every mistake we must surely be learning

(While my guitar gently weeps, G. Harrison)

TABLA DE CONTENIDOS / TABLE OF CONTENTS

Abreviaturas / Abbreviations

Resumen / Abstract

Capítulos / Chapters:

1. Introducción.....	1
2. Lugar de estudio.....	13
3. Material y metodología analítica general.....	25
4. Caracterización física y química de la Laguna de El Tejo.....	53
5. Composición y dinámica poblacional del fitoplancton en la Laguna de El Tejo.....	81
<i>(Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado; Morata et al., 2003)</i>	
6. Evaluación experimental <i>in situ</i> de la limitación por nutrientes (I): Clorofila <i>a</i>	111
<i>(Empirical evidence of vertical and seasonal shifts in nutrient limitation of planktonic primary producers in a deep karst lake; Morata et al., submitted)</i>	
7. Evaluación experimental <i>in situ</i> de la limitación por nutrientes (II): Productores primarios planctónicos.....	133
8. Discusión general.....	185
Conclusiones / Conclusions.....	201
Referencias bibliográficas / References.....	213
Anexos / Annexes.....	231

Abreviaturas / Abbreviations

C = Control / Control

N = Nitrógeno inorgánico / Inorganic nitrogen

P = Fósforo inorgánico / Inorganic phosphorus

Si = Silicato / Silicate

TP = Fósforo total / Total phosphorus

S:V = Razón superficie:volume / surface:volume ratio

Zeu = Profundidad de la zona eufótica / Euphotic depth

Zm = Profundidad de mezcla / Mixing depth

Zmax = Profundidad máxima / Maximum depth

Chl-*a* = Clorofila *a* / Chlorophyll-*a*

APA = Actividad fosfatasa alcalina / Alkaline phosphatase activity

APC = Picocianobacterias autótrofas / Autotrophic picocyanobacteria

DCM = Máximo profundo de clorofila / Depth chlorophyll maximum

DIN = Nitrógeno inorgánico disuelto / Dissolved inorganic nitrogen

PAR = Radiación fotosintéticamente activa / Photosynthetic active radiation

PPP = Productores primarios planctónicos / Planktonic primary producers

SRP = Fósforo reactivo soluble / Soluble reactive phosphorus

SRSi = Silicato reactivo soluble / Soluble reactive silicate

FG = Grupo funcional / Functional group

MFG = Grupo morfo-funcional / Morpho-functional group

MB-FG = Grupo funcional basado en morfología / Morphology-based functional group

RESUMEN

La Laguna de El Tejo es un pequeño lago cárstico profundo de morfología circular cerrada enclavado en el complejo lagunar de Cañada del Hoyo (Cuenca, España). En las últimas décadas algunas de las lagunas de este especial sistema cárstico se han estudiado desde el punto de vista limnológico, existiendo bastantes trabajos referentes a la Laguna de La Cruz por su peculiar condición de lago meromíctico, si bien la presente tesis constituye el primer estudio de calado para la Laguna de El Tejo, la más profunda y oligotrófica dentro de este sistema. Además de caracterizar física y químicamente esta laguna, el estudio tenía como principales objetivos describir la composición y dinámica de la comunidad fitoplanctónica, así como una aproximación experimental para conocer los factores que limitan su crecimiento y desarrollo.

A lo largo de los dos periodos de estudio detallados en este trabajo (1997-98 y 2003-04) esta laguna de naturaleza alcalina-carbonatada presentó características de oligo-mesotrofia, así como fuertes gradientes térmicos a lo largo del año y en profundidad que determinan el establecimiento de una marcada estratificación en verano y una única mezcla invernal de la totalidad de la columna de agua (laguna monomíctica). Es la alternancia entre los periodos de estratificación térmica-mezcla invernal la que condiciona de manera notable a la comunidad pelágica. De esta manera, el marcado gradiente que se forma durante la estratificación estival determina que en el epilimnion no se produzca el reciclado completo de nutrientes, acumulándose por sedimentación en las aguas profundas. Es justo en la interfase óxica-anóxica donde se establece un máximo profundo de clorofila (DCM) debido a abundantes poblaciones de

picocianobacterias autótrofas (APC) capaces de aprovechar la escasa luz que alcanza dichas profundidades gracias a su contenido en pigmentos accesorios como la ficoeritrina.

Respecto al nanofitoplancton, la pequeña diatomea céntrica *Cyclotella delicatula* se encuentra en todas las épocas y profundidades (a excepción del hipolimnion durante la estratificación térmica), no obstante hay cambios en la composición algal a lo largo del año y en el perfil vertical inducidos por dichos gradientes en la estructura física de la masa de agua. Así, con el avance de la estratificación, en un epilimnion estable y agotado en nutrientes y en la parte superior del metalimnion, el ensamblado de especies viene definido por la secuencia *C. delicatula* – *Ceratium hirundinella* – *Peridinium* spp. y *Parvodinium umbonatum*, y al mismo tiempo *C. delicatula* y *P. umbonatum* se desarrollan en el metalimnion más profundo. Es singular en esta laguna la regresión en la sucesión ecológica dinofíceas-zygnematofíceas desmidiales que se da a finales del periodo de estratificación, confinándose grandes poblaciones de varias especies del género *Cosmarium* en el metalimnion en paralelo a la profundización de la termoclina. No obstante dichas proliferaciones presentan una acusada variación interanual, como por ejemplo el intenso crecimiento de *Cosmarium* cf. *bioculatum* en el metalimnion a finales de la estratificación de 1998, con abundancias superiores en más de un orden de magnitud respecto a las demás algas, y que se relacionan con condicionantes ambientales como una situación de precipitaciones diferentes respecto al año anterior. Para el periodo de estudio 1997-98 el análisis de componentes principales (PCA) puso de manifiesto las variaciones mencionadas, con una primera componente que contrapone el inicio y el final de la estratificación (*Peridinium* spp.-*Cosmarium* spp.), así como las variaciones en el perfil vertical, y una segunda componente que destaca las características diferenciales de mediados de verano–otoño de 1998, asociadas sobre todo al crecimiento masivo de *Cosmarium* cf.

bioculatum, contrastándolo especialmente con las condiciones del mismo periodo en 1997.

Por otra parte, tanto en aguas profundas como durante la mezcla invernal la comunidad fitoplanctónica está dominada por las APC y por varias especies de criptofíceas de los géneros *Cryptomonas* y *Plagioselmis*, grupo de algas que es eficiente en la explotación de los recursos debido a que su contenido en ficoeritrina le permite aprovechar el mismo rango de luz que las APC, además de su capacidad para alternar metabolismo autótrofo y heterótrofo. Es por ello que tanto su similar capacidad de captar la luz que llega a esas profundidades como la condición de mixotrofia podría explicar esta asociación de las APC y criptofíceas en condiciones de restricción lumínica. En referencia a esto, el PCA también señaló la existencia de esta similitud para la comunidad fitoplanctónica del periodo de mezcla y del hipolimnion durante la estratificación estival.

A finales de la estratificación de 1997 se realizaron experiencias de fertilización en laboratorio que evidenciaron que posiblemente en esa época la limitación para el crecimiento algal era debida al nitrógeno inorgánico (N), siendo este resultado de interés dado que en lagos de latitudes templadas se ha considerado tradicionalmente que es la disponibilidad de fósforo inorgánico (P) la que limita el crecimiento de los productores primarios planctónicos (PPP). Con objeto de conocer en profundidad la dinámica de la limitación por nutrientes para los PPP en la Laguna de El Tejo, se llevaron a cabo una serie de experiencias de enriquecimiento de nutrientes *in situ* a lo largo del periodo 2003-04, que además de N y P incluían silicato (Si). Sus resultados demuestran que, a pesar de la habitual co-limitación de N y P, existen cambios significativos en la limitación por nutrientes para el crecimiento del fitoplancton tanto a escala temporal como espacial: al inicio de la estratificación la limitación es debida al P en las aguas superficiales, mientras que durante la estratificación marcada se debe al N, tanto

en aguas epilimnéticas como metalimnéticas. La adición de Si cambia la abundancia relativa de las especies al favorecer a las diatomeas frente al resto de algas. En aguas profundas, es primeramente la disponibilidad lumínica el factor clave que limita el crecimiento de los PPP. En cualquier caso, nutrientes y luz son los factores que más intensamente gobiernan el desarrollo y crecimiento de los organismos fitoplanctónicos, y que dependen del equilibrio entre la demanda por parte de los PPP y los aportes. En este sentido, las entradas principales de nutrientes en esta laguna, dado su origen y funcionamiento hidrogeológico, dependen del acuífero que alimenta la misma y de la deposición atmosférica. Nuestros resultados sugieren que en esta región con bajo impacto por deposición atmosférica de N, la deposición de P atmosférico principalmente de origen sahariano puede ser importante en el balance de nutrientes en este ecosistema, unido a la entrada subterránea de N procedente del acuífero cuya frecuencia e intensidad dependen de los cambios hidrológicos estacionales característicos del clima mediterráneo.

En síntesis, este estudio revela que las comunidades fitoplanctónicas que se establecen en diferentes épocas y en el eje vertical en la Laguna de El Tejo suelen ser complejas y fuertemente restringidas a condicionantes ambientales pero de carácter predecible, y que dependen no sólo de sus rasgos taxonómicos sino también de sus características funcionales. A grandes rasgos, el ensamblado de especies descrito en el tiempo y en el perfil vertical se repite en ambos periodos de estudio (1997-98 y 2003-04) y por tanto esta dinámica presenta un alto grado de periodicidad. Por lo general, los rasgos propios del fitoplancton (tamaño, forma, uso de los nutrientes) varían de forma predecible ante las restricciones del medio (luz, nutrientes) y, a pesar de la vulnerabilidad de los organismos frente a los cambios de los factores abióticos, la comunidad pelágica responde de manera similar ante los cambios estacionales.

Trabajos integrativos como la presente tesis que tienen en cuenta diversas variables ecológicas en las escalas espacial y temporal podrían aportar luz al conocimiento de los complejos mecanismos que subyacen en el establecimiento, estructuración y cambio de las poblaciones fitoplanctónicas. Es así que esta tesis abre nuevos caminos para continuar el estudio de dichos mecanismos, como por ejemplo introducir otros niveles de análisis como son evaluar a fondo el impacto de la deposición atmosférica y el cambio climático, o determinar el efecto de otros componentes de las comunidades biológicas como la presión de pastoreo por parte del zooplancton, con objeto de conocer y entender las interacciones de la red trófica. Estos estudios constituirán sin duda aportaciones útiles para la comprensión de los efectos que pueda tener la contaminación y/o el cambio climático en los lagos naturales y los mecanismos que puedan ayudar a la conservación y/o restauración de estos ecosistemas.

ABSTRACT

Lake El Tejo is a small deep karstic lake with a closed circular morphology located in the Cañada del Hoyo lake complex (Cuenca, Spain). Within the last decades, several lakes of this karst system have been studied using a limnological approach, producing many works centred in Lake La Cruz that deserved particular attention due to its peculiar condition as meromictic lake. However, the current thesis is the first in depth study of Lake El Tejo, the deepest and more oligotrophic within this system. This work provides not only the physical and chemical characterization of Lake El Tejo, but also describes the composition and the dynamics of the phytoplankton community. It also includes an experimental approach to understand the factors that limit phytoplankton growth and development, one of the main subjects in this study.

Through the two study periods detailed in this work (1997-98 and 2003-04) this alkaline-carbonated lake displayed oligo-mesotrophic characteristics, as well as intense seasonal thermal gradients determining the establishment of a strong summer stratification and a single winter mixing period of the entire water column (monomictic lake). The alternation between thermal stratification and winter mixing periods largely determines the dynamics of the pelagic community. Therefore, the strong gradient established along the summer stratification avoids nutrient recycling, which are accumulated in deep waters and settling of planktonic organisms. It is at the oxic-anoxic interface where a deep chlorophyll maxima (DCM) establishes, mostly dominated by dense populations of autotrophic picocyanobacteria (APC), which take advantage of

the scarce light reaching these deep strata thanks to their content of accessory pigments like phycoerythrin.

Regarding nanophytoplankton, the small centric diatom *Cyclotella delicatula* occurs in all seasons and within the entire water column, except in hypolimnion during the thermal stratification. However the formation of the above-mentioned gradients in the physical structure of this water body promote changes in algal composition along the year and within the vertical profile. In this way, as the stratification period advances in the stable and nutrient-exhausted epilimnion and in the upper metalimnion, the species assemblage shows the sequence *C. delicatula* – *Ceratium hirundinella* – *Peridinium* spp. and *Parvodinium umbonatum*, and at the same time *C. delicatula* and *P. umbonatum* develop in the lower metalimnion. In this lake the regression Dinophyceae-Zygnematophyceae in the ecological succession, which occurs at the end of stratification period, is quite singular, with large populations of several species of *Cosmarium* in the metalimnion following the progressive thermocline deepening. Nevertheless, these algal proliferations show a marked variation from year to year, such as the intense metalimnetic bloom of *Cosmarium* cf. *bioculatum* appearing in the late summer stratification of 1998, with abundances higher than one order of magnitude compared to other algae. This is probably related with variations of environmental conditions in comparison with the same period of the previous year, like those promoted by different rainfall events. A principal component analysis (PCA) performed with nanophytoplankton and physical and chemical data from 1997-98 study period revealed these variations, with the outcome of a first component contrasting the beginning versus the end of the stratification period (*Peridinium* spp. - *Cosmarium* spp.), as well as the differences in the phytoplankton assemblages through the vertical profile. The second component highlighted the differential characteristics of the second half of the stratification period of 1998, i.e. the

bloom of *C. cf. bioculatum*, contrasting with the situation during the same period in 1997.

On the other hand, the phytoplankton community in deep waters during stratification, as well as during winter mixing, is dominated by APC and several Cryptophyceae species of the genera *Cryptomonas* and *Plagioselmis*. This group of algae, like APC, is quite efficient in the use of nutrients with the scarce light available at these depth, as they also hold accessory pigments such as phycoerythrin, together with their capacity to alternate autotrophic and mixotrophic metabolisms. Therefore, their similar abilities in capturing light and the mixotrophy could explain the spatial and temporal association APC-Cryptophyceae in an environment with relatively low light availability. This is consistent with the PCA, pointing out the high similarity between the phytoplankton communities in the mixing period and in the hypolimnion during summer stratification.

At the end of summer stratification in 1997, nutrient enrichment experiments were performed in the laboratory and revealed that the algal growth was probably limited by inorganic nitrogen (N). This is interesting because in temperate lakes the availability of inorganic phosphorus (P) has traditionally been considered as the main limiting factor for the growth of planktonic primary producers (PPP). Aiming to clarify the nutrient limitation dynamics in Lake El Tejo, seasonal *in situ* bioassays were performed in 2003-04, including also silicate (Si). The results revealed that there were significant seasonal and spatial changes in the nutrient limitation of phytoplankton growth. Even though there is a strong co-limitation of P and N, we could ascertain some of these changes. P-limitation resulted to be more important in subsurface waters in early stratification, whereas N-limitation was more important in both epilimnetic and metalimnetic layers when stratification was markedly established. Addition of Si

changed the relative abundance of the species favouring diatoms against other algal groups. Although nutrient limitation seems to be the main force controlling the growth of primary producers, our results also support a relative significance of light availability in deep layers. Thereby, nutrients and light availability are the main forces that govern phytoplankton growth in Lake El Tejo, which finally depends on the balance between PPP demand and inputs. It is noteworthy that the main nutrients inputs in the lake, due to its origin and hydrogeological characteristics, are groundwater supply and atmospheric deposition. Our results suggest that atmospheric P-deposition (mainly from Saharan dust), in low impacted lakes with low N-deposition might be a relevant process for the nutrient balances of these ecosystems. P-deposition, together with the hydrological seasonal changes characteristic of the Mediterranean climate that may govern in frequency and intensity N inputs through groundwater, can thus modulate the nutrient limitation in these lakes.

Summarizing, the current thesis points out that, in Lake El Tejo, phytoplankton communities from different seasons and vertical strata are complex and strongly restricted to environmental conditions, though predictable, depending not only on taxonomic traits but also on functional characteristics. Roughly, the species assemblages described are repeated in both study periods (1997-98 and 2003-04), and hence, this dynamic shows a high periodicity. In general, phytoplankton traits (size, shape, use of nutrients) change predictably in response to environmental restrictions (light, nutrients), and despite the vulnerability of the organisms to the changes of the abiotic factors, the pelagic community responds similarly to the more or less regular seasonal changes.

Integrative approaches, as the current thesis, considering different ecological variables at spatial and temporal scales may shed light on the complex mechanisms underlying the establishment, structuring and change of phytoplankton populations. In this context, this thesis is the base for further

studies on these mechanisms, which should include for instance the impact of atmospheric deposition and climate change, or other components of the biological communities like the grazing pressure of the zooplankton, in order to eventually combine food web interactions in a more comprehensive way. Such studies will undoubtedly constitute useful contributions to understand the possible effects of pollution and/or climate change on natural lakes and the mechanisms that can support the conservation and/or restoration of these ecosystems.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las lagunas cársticas son unos ecosistemas de elevada fragilidad, pobres en nutrientes y con unas peculiaridades hidrogeológicas que las hacen únicas al configurar unos bellos y singulares paisajes, y es así que la conservación de estos parajes se torna un hecho primordial (Cirujano & Medina, 2002). En la Península Ibérica existen pocos sistemas de este tipo, siendo uno de ellos el objeto de estudio de la presente tesis: el complejo lagunar de Cañada del Hoyo en la provincia de Cuenca (España), y en concreto la Laguna de El Tejo. En este sistema existen varias lagunas de naturaleza alcalina-carbonatada con características particulares que les confiere un carácter sin par, siendo así que no sólo presentan una gran importancia paisajística sino también desde el punto de vista de la Limnología. En este sentido, el presente estudio se centró en la Laguna de El Tejo, despertando el interés por ella el hecho de ser la laguna más oligotrófica y profunda del sistema cárstico de Cañada del Hoyo y que no había sido estudiada en profundidad hasta el inicio de la presente investigación, dado que es la cercana Laguna de La Cruz la que cuenta con multitud de trabajos limnológicos y paleolimnológicos al tratarse de un excepcional sistema meromíctico (Sendra, 2009). Es por ello que esta tesis supone la primera contribución formal al estudio limnológico de la Laguna de El Tejo.

Este tipo de complejos cársticos alimentados por un acuífero profundo normalmente son muy estables, si bien cualquier perturbación del mismo puede afectar a todo el sistema dada la conexión dentro del *karst*, y por lo tanto es necesario conservarlos limitando su sobreexplotación y los aportes de

contaminantes sobre el acuífero que se extiende a un área más amplia respecto al propio enclave lagunar, en este caso el Río Guadazaón. Por otra parte, estas zonas de *karst* son importantes al tratarse de sumideros de CO₂, dados los intercambios de carbono entre la atmósfera, el agua superficial y subterránea y los minerales carbonatados, y por tanto formando parte del ciclo global del carbono. Además, por su origen y activo funcionamiento del fenómeno de karstificación se generan complejas interacciones entre los efectos geológicos, los procesos físicos, químicos y los biológicos condicionando la presencia de especies características asociadas a dichos sistemas acuáticos (Casado & Montes, 1995).

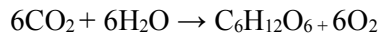
En estos sistemas con una morfología circular cerrada y enclavada en una dolina de altas paredes verticales y una relativamente baja relación superficie:volumen, se favorece el establecimiento de una marcada estratificación térmica estival en sus aguas y que condiciona el establecimiento y dinámica de las comunidades pelágicas, de modo que se produce una distribución heterogénea de las mismas tanto a lo largo del eje vertical como a escala temporal. Estas discontinuidades al generar fronteras entre las distintas capas constituyen la causa de una mayor heterogeneidad y diversificación de las poblaciones, aumentando así la complejidad de la dinámica del propio sistema. Dentro de dichas comunidades, la presente tesis se centra en el estudio particular de los productores primarios planctónicos (PPP) o fitoplancton, que sustentan la producción primaria de estos ecosistemas.

PRODUCTORES PRIMARIOS PLANCTÓNICOS (PPP): FITOPLANCTON

Etimológicamente *fitoplancton* proviene de los términos griegos *φύτον* - *phyton* (planta) y *πλαγκτος* - *planktos* (errante, vagabundo), siendo el conjunto de microorganismos productores primarios que se encuentran dispersos en el

ambiente pelágico de los sistemas acuáticos (Reynolds, 1997), con una enorme diversificación de grupos (y especies), combustible de las redes tróficas y conductor de los ciclos biogeoquímicos (Salmaso et al., 2015).

Entre estos organismos hay procariotas y eucariotas, cuya actividad fotosintética mantiene la producción primaria en la masa de agua además de ser una de las fuentes de oxígeno atmosférico. Este proceso de la fotosíntesis se resume en la siguiente ecuación:



La capacidad de realizar la fotosíntesis es un rasgo básico de los PPP, y por tanto la luz o radiación fotosintéticamente activa (PAR) es el factor que primeramente los condiciona al incidir directamente en su fisiología. Es así que algunos de estos organismos presentan adaptaciones morfológicas o estrategias (e.g. algas flageladas) para realizar la fotosíntesis cuando las condiciones de luz son desfavorables.

En cuanto a la clasificación de dichos organismos, en función de su tamaño se pueden separar en cinco grupos (Padisák, 2004):

- Picoplancton (0.2-2 μm): cianobacterias tipo *Synechococcus* y pequeñas clorofíceas chlorococcales (e.g. *Nanochloris*).
- Nanoplancton (2-20 μm): Mayoría de clorofíceas chlorococcales, pequeñas crisofíceas y pequeñas criptofíceas (e.g. *Plagioselmis*).
- Microplancton (20-200 μm): Algunas diatomeas coloniales (e.g. *Asterionella*), grandes dinofíceas (e.g. *Ceratium*), clorofíceas chlorococcales coloniales (e.g. *Sphaerocystis*), y algunas cianobacterias filamentosas (e.g. *Pseudanabaena*) y coloniales (e.g. *Snowella*).

- Mesoplancton (200µm-2mm): Largas cadenas de diatomeas (e.g. *Aulacoseira*), y algunas cianobacterias filamentosas (e.g. *Aphanizomenon*) y coloniales (e.g. *Gleotrichia*).
- Macroplancton (2mm-2cm): Grandes colonias de cianobacterias (e.g. *Microcystis*).

Respecto al tamaño del fitoplancton en la Laguna de El Tejo, su comunidad fitoplanctónica se distribuye principalmente entre el picoplancton, nanoplancton y en menor abundancia algunos organismos del microplancton. De este modo, en la presente tesis, y con objeto de facilitar los análisis e interpretaciones, se tienen en cuenta la fracción del **picoplancton** para las pequeñas picocianobacterias autótrofas (**APC**) y el **nanofitoplancton** para el resto del fitoplancton.

La forma clásica de categorizar el fitoplancton es a nivel de la clasificación taxonómica que tiene en cuenta los distintos grupos fitoplanctónicos. Este tipo de clasificación requiere de un gran conocimiento taxonómico de estos diferentes grupos, lo que muchas veces es difícil e implica un gran esfuerzo, pero no obstante aporta una valiosa información para el conocimiento de la autoecología, morfología y composición específica del fitoplancton en el ecosistema (Reynolds, 1997). Por otra parte, actualmente los avances en el campo de la filogenia molecular están permitiendo redefinir todos estos grupos y han revolucionado la visión de las relaciones entre los distintos taxa (Komárek, 2010; Krienitz & Bock, 2012; Guiry, 2013; Komárek et al., 2014). En referencia a esto, aunque aún resta gran cantidad de terreno por explorar, nos encontramos en un momento de transición en cuanto a la taxonomía del fitoplancton a la espera de las adecuadas combinaciones entre la tradicional nomenclatura linneana y las secuencias de ADN (Clerck et al., 2013).

En los últimos años se han establecido otra serie de categorizaciones para los PPP y que incluyen rasgos morfológicos y funcionales. A la espera de futuras aportaciones al conocimiento de la taxonomía y ecología del fitoplancton con los avances en estudios de genética molecular y fisiología para estos organismos (Salmaso et al., 2015), este tipo de clasificaciones en la actualidad son:

- **Grupos funcionales (FG):** Reynolds et al. (2002) iniciaron este tipo de categorizaciones estableciendo una serie de codones, siendo cada uno de ellos una especie (o grupo) que se establece en un determinado hábitat con unas características concretas. Esta clasificación fue redefinida por Padisák et al. (2009) puesto que su aplicación ha llevado a multitud de errores al requerir de un conocimiento preciso de la taxonomía de las especies y de sus hábitats. Además, no todas las especies están clasificadas en este tipo de categorías, con lo que incluso fitoplanctólogos expertos han asociado erróneamente determinadas especies a un codon de forma más bien subjetiva o en base a conocimientos preconcebidos (Salmaso et al., 2015).
- **Grupos morfo-funcionales (MFG):** Salmaso & Padisák (2007) establecieron una serie de categorías basadas en rasgos morfológicos (tamaño, forma, organización celular, presencia de flagelos, etc.) que precisan de un menor conocimiento taxonómico y que se relacionan con determinadas características funcionales de los organismos (e.g. habilidad en la obtención de recursos).
- **Grupos funcionales basados en rasgos morfológicos (MB-FG):** Kruk et al. (2010) determinan una serie de categorías que implican únicamente características morfológicas (forma y estructura), y es por ello que se trata de la clasificación más sencilla al no necesitar conocimientos

específicos de la taxonomía y fisiología de los organismos (Kruk & Segura, 2012).

Todas estas categorizaciones en ningún caso son excluyentes entre sí, al contrario, el uso de cualquiera de ellas supone una forma de complementar las clasificaciones a nivel taxonómico y/o una simplificación a la hora de describir la composición y/o la dinámica del fitoplancton en los sistemas acuáticos (Salmaso et al., 2015).

Otra aproximación a la descripción de los PPP es la que tiene en cuenta distintos efectos sobre los rasgos propios de los organismos. Los rasgos de los organismos (tamaño, forma, uso de nutrientes, etc.) están condicionados principalmente por los siguientes efectos (Litchman & Klausmeier, 2008; Litchman et al., 2010):

- La luz: La eficiencia en la explotación de la PAR es distinta dependiendo de cada grupo fitoplanctónico, así como pueden diferir en su contenido en clorofila *a* (*chl-a*) y otros pigmentos accesorios. Además, la PAR determina las estrategias de algunos organismos para optimizar su captación, como son elementos que aumenten la movilidad (e.g. flagelos) o la flotabilidad (e.g. colonias, vacuolas).
- Los nutrientes inorgánicos: Principalmente fósforo (P) y nitrógeno (N), además de silicato (Si) en el caso de diatomeas y crisofíceas. La respuesta ante la presencia/ausencia de nutrientes también puede diferir entre los distintos grupos fitoplanctónicos, y con diferencias en cuanto a sus tasas de captación (*nutrient uptake*) y de procesado (*luxury uptake*), que también pueden variar en cada especie en función de su estado o de los condicionantes ambientales. Así mismo, existen estrategias particulares que en algunos grupos favorecen la explotación del recurso, como el caso

de las cianobacterias fijadoras de N atmosférico y el caso de los organismos mixotróficos (dinofíceas, criptofíceas, crisofíceas, euglenófitas) capaces de alternar su metabolismo entre autótrofo-heterótrofo (mixotrofia) en función de los recursos en el medio.

- Presencia de herbívoros y parásitos: El pastoreo por parte del zooplancton (*grazing*), la ingesta por organismos fagotróficos (microzooplancton, rotíferos, protistas) y la posible presencia de parásitos suponen una presión negativa sobre el crecimiento del fitoplancton.

Al respecto de estos efectos, la disponibilidad de los nutrientes inorgánicos para el crecimiento de los PPP en los sistemas acuáticos se ha estudiado con interés a lo largo de las tres décadas pasadas, considerándose el P como la principal fuerza que limita el crecimiento del fitoplancton en lagos de latitudes templadas (Schindler, 1978; Sterner, 2008). Sin embargo, existen multitud de estudios basados en experiencias de adición de nutrientes que señalan que la limitación por N también podría tener su importancia (e.g. Elser et al., 2007). En relación con la limitación por nutrientes para los PPP en la Laguna de El Tejo, es en los lagos más oligotróficos que las comunidades planctónicas presentan un mayor grado de simplicidad, siendo interesante para el estudio de sus interacciones la realización de bioensayos en microcosmos (Neill, 1988). Si bien este tipo de experiencias cuenta con detractores dentro de la comunidad científica (e.g. DeMelo et al., 1992; Carpenter, 1996; Schindler, 1998) debido a la complejidad en su realización y por tratar con agua natural que contiene organismos que presentan múltiples interacciones difíciles de controlar, el conocimiento ecológico de las dinámicas del plancton ha avanzado gracias a multitud de trabajos basados en este tipo de bioensayos (e.g. Hecky & Kilham, 1988; Elser et al., 1990; Dodds et al., 1993; Drenner & Mazumber, 1999; Reynolds, 2001;

Spivak et al., 2011). En cualquier caso, en los complejos sistemas ecológicos es necesario tener en cuenta multitud de factores que interactúan, e incluso con efectos sinérgicos y/o antagónicos (e.g. Harpole et al., 2011), y que en último término dificultan el conocimiento sobre el funcionamiento del sistema así como la posibilidad de establecer predicciones. En referencia a esto, en la laguna de estudio las comunidades planctónicas se encuentran condicionadas por el medio abiótico, principalmente por la alternancia de los momentos de estratificación y mezcla, y por entradas y salidas al sistema controladas debido a su origen y funcionamiento hidrogeológico, y por tanto esta laguna constituye un modelo de estudio perfecto al reducirse las variables que pueden condicionar la composición y dinámica del fitoplancton. En lagos profundos los eventos estratificación-mezcla son los que primeramente determinan la distribución de los PPP (Viner, 1985; Lindenschmidt & Chorus, 1998; Salmaso, 2003), conduciendo la dinámica de la comunidad fitoplanctónica en las escalas vertical y temporal.

En los sistemas acuáticos las comunidades pelágicas son vulnerables al cambio frente a la dinámica física (medio abiótico), pero los patrones de estas comunidades suelen estar bastante claros puesto que hay mecanismos de auto-organización a nivel de cada una de las especies, de modo que en ciertos casos las dinámicas se vuelven predecibles (Reynolds, 2001). En este sentido, las perturbaciones que pueden incidir en dichas dinámicas son las que mantienen las comunidades alejadas del equilibrio (*steady-state*), en algunos casos aumentando la diversidad y en otros tornando la comunidad a un estado estructural inmaduro emergente (Margalef, 1997; Reynolds, 2001; Naselli-Flores et al., 2003; Rojo et al., 2010). Dichas perturbaciones pueden ser en intensidad, en frecuencia, y/o persistencia, determinando así la composición y dinámica de los PPP, y que permiten explicar la presencia de multitud de especies en la comunidad a pesar de la existencia de mecanismos de exclusión competitiva (*Paradoja del plancton* de Hutchinson, 1961). En relación a la diversidad, Connell (1978) señaló que

hipotéticamente la máxima diversidad sería el resultado de unas perturbaciones intermedias en cuanto a frecuencia (*Intermediate Disturbance Hypothesis-IDH*), siendo ésta una de las hipótesis de no-equilibrio que explica la coexistencia de especies. De hecho, Reynolds (1997) señala que en la naturaleza el equilibrio es más bien la excepción que la regla (*'equilibrium is more the exception than the rule'*).

Por último, en cuanto a su aplicabilidad, el fitoplancton se considera clave en la evaluación del estado ecológico de los ecosistemas acuáticos, siendo de gran utilidad como primer indicador del calentamiento global y de la calidad de las aguas (Trackeray et al., 2013). Esto es debido a la rápida respuesta ante cambios en el ambiente dadas sus altas tasas de replicación (Reynolds, 2006). Es así que el fitoplancton constituye una parte fundamental en la Directiva Marco del Agua (EC, 2000) para evaluar los impactos antropogénicos en las aguas superficiales de la Unión Europea.

OBJETIVOS

Los objetivos concretos de la presente tesis son los siguientes:

- Caracterizar física y químicamente la laguna cárstica profunda de El Tejo.
- Describir la composición de las especies del nanofitoplancton.
- Detallar la dinámica del fitoplancton en cuanto a su distribución vertical y estacional.

- Determinar la posible variación interanual entre las dinámicas de la comunidad fitoplanctónica.
- Estudiar en profundidad los mecanismos de control del fitoplancton por la disponibilidad de los nutrientes inorgánicos y la luz.

La consecución de dichos objetivos fue posible gracias a los estudios llevados a cabo en la Laguna de El Tejo, los cuales se dividen en dos periodos:

- 1) Muestreos mensuales a lo largo de 1997-98, con objeto de caracterizar física y químicamente la laguna, y describir la composición y dinámica del nanofitoplancton (capítulos 4 y 5).
- 2) Realización de experiencias de enriquecimiento de nutrientes en el periodo 2003-04, para determinar las limitaciones por nutrientes y luz en el crecimiento y desarrollo del fitoplancton, así como sus posibles cambios a escala temporal y vertical (capítulos 6 y 7), basándonos en los resultados previos obtenidos por Camacho et al. (2003c) con bioensayos en laboratorio en septiembre de 1997.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Capítulo 1. Introducción. Es el presente capítulo, donde se ha introducido a los peculiares sistemas cársticos, se han descrito las características generales del fitoplancton, así como se han enumerado los objetivos principales de este trabajo.

Capítulo 2. Lugar de estudio. Ubicación y características de la Laguna de El Tejo, una breve aproximación a la geología y procesos de karstificación que la

originan, y detalles limnológicos de los que se tiene constancia previos a la realización de esta investigación.

Capítulo 3. Material y metodología analítica general. Descripción de los muestreos, material utilizado y metodología analítica, recuentos de fitoplancton y otros descriptores. La metodología específica respecto a las experiencias de adición de nutrientes llevadas a cabo en el periodo 2003-04 se encuentra al inicio del capítulo 6.

Capítulo 4. Caracterización física y química de la Laguna de El Tejo. Resultados para las diferentes variables físicas y químicas en los perfiles mensuales realizados a lo largo del periodo 1997-98, así como registros meteorológicos y datos batimétricos.

Capítulo 5. Composición y dinámica poblacional del fitoplancton en la Laguna de El Tejo. Resultados referidos a la composición y dinámica del fitoplancton para los muestreos mensuales de 1997-98, en los que se basa Morata et al. (2003).

Capítulos 6 y 7. Evaluación experimental *in situ* de la limitación por nutrientes. Estos dos capítulos son los referentes a las experiencias de fertilización realizadas *in situ* en el periodo 2003-04. Los métodos específicos referentes al diseño experimental con microcosmos se detallan en el capítulo 6. Por la gran cantidad de resultados obtenidos en estas experiencias, se han dividido en dos partes en función del nivel de análisis (chl-*a* y fitoplancton):

Capítulo 6. Evaluación experimental *in situ* de la limitación por nutrientes (I): Clorofila *a*. Resultados extraídos de Morata et al. (remitido)

Capítulo 7. Evaluación experimental *in situ* de la limitación por nutrientes (II): Productores primarios planctónicos.

Capítulo 8. Discusión general. A modo de síntesis se discuten todos los resultados obtenidos a lo largo de los dos periodos de estudio en la Laguna de El Tejo, aportando futuros enfoques para continuar caracterizando ecológicamente este sistema.

CAPÍTULO 2

LUGAR DE ESTUDIO

INTRODUCCIÓN

La Laguna de El Tejo es una de las lagunas pertenecientes al complejo cárstico de Cañada del Hoyo, el cual se encuentra enclavado en el término municipal de Cañada del Hoyo, provincia de Cuenca (Castilla-La Mancha, España), a unos 30 km de la ciudad de Cuenca (Fig. 2.1). Dicho sistema lagunar se localiza en el paraje calizo de Los Oteros, en el tercio nororiental de esta provincia, a una altitud aproximada de unos 1000 m sobre el nivel del mar. Esta zona está situada en las primeras estribaciones y por la vertiente suroeste de la Serranía de Cuenca (Sistema Ibérico), y en la margen derecha del río Guadazaón, subcuenca de la cuenca hidrográfica del río Júcar.



Figura 2.1. Localización esquemática del término municipal de Cañada del Hoyo en la provincia de Cuenca, perteneciente a la comunidad autónoma de Castilla-La Mancha (CLM), España.

Figure 2.1. Schematic location of Cañada del Hoyo in the province of Cuenca, at Castilla-La Mancha region (CLM), Spain.

El sistema lagunar de Cañada del Hoyo está constituido en la actualidad por un total de 34 dolinas (*torcas* en el lenguaje local) de las cuales siete presentan agua de forma permanente, tres con carácter estacional-temporal y el resto son dolinas sin agua (Rodrigo, 1997; Vicente et al., 1998). Las dolinas con agua permanente son las lagunas de El Tejo, de La Cruz, de La Parra, La Llana y de Las Cardenillas, y los lagunillos de El Tejo y de Las Cardenillas (Fig. 2.2). Desde principios de los años ochenta este complejo lagunar ha sido objeto de estudio desde el punto de vista limnológico, dado que cada una de las lagunas presentan unas características que las hacen únicas y especiales.

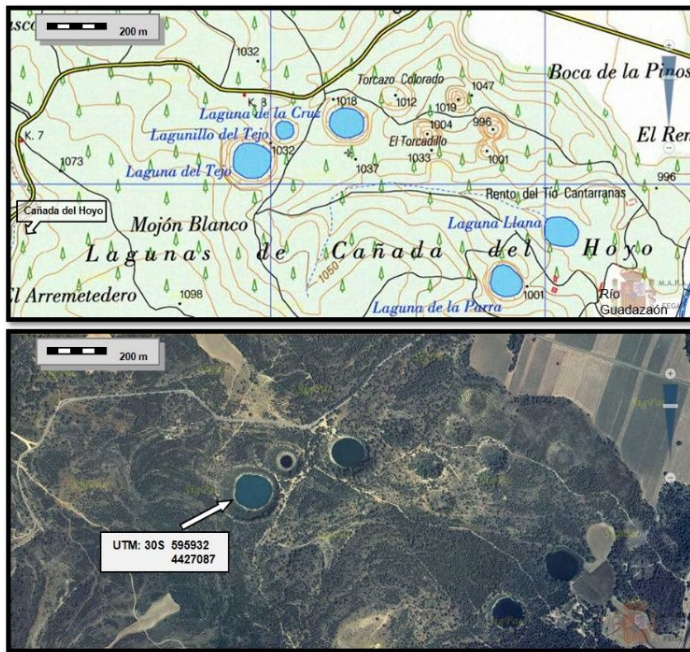


Figura 2.2. Mapa topográfico (superior) y ortofoto (inferior) de la mayor parte del área de las Lagunas de Cañada del Hoyo. La flecha indica la laguna de estudio, Laguna de El Tejo. (Fuente: Visor SIGPAC del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España: <http://sigpac.jccm.es/visorsigpac/>)

Figure 2.2. Topographical map (upper) and aerial photograph (lower) of Lagunas de Cañada del Hoyo main area. Arrow indicates the studied lake, Lake El Tejo (From: SIGPAC, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España: <http://sigpac.jccm.es/visorsigpac/>)

La Laguna de El Tejo es la más grande de este sistema de lagunas, cuyas transparentes aguas han pasado de un llamativo color turquesa a mediados de los años ochenta y noventa al profundo color azul que presenta en la actualidad (Fig. 2.3). Esta laguna de cubeta simple se encuentra encajada en una dolina de paredes abruptas de unos 30 m por encima de la superficie del agua, muy protegida así del viento. Así mismo, en las últimas décadas ha sufrido un llamativo descenso de nivel, si bien durante el periodo de estudio las aguas dibujaban un perímetro prácticamente circular de unos 140 m de diámetro medio y alcanzaban una profundidad máxima de 28 m (véase capítulo 4).

En cuanto a las propiedades físicas y químicas, es destacable que sus aguas son dulces (oligohalinas), del tipo bicarbonato-magnésico-cálcico y con conductividades próximas a los $500 \mu\text{S cm}^{-1}$. Dicha laguna está referenciada con sus principales características limnológicas en varios trabajos sobre la limnología de los lagos cársticos (Miracle et al., 1992; Armengol, 1997; Rodrigo, 1997) y figura en catálogos sobre los macrófitos de las lagunas de Castilla-La Mancha (Cirujano, 1995; Cirujano & Medina, 2002).



Figura 2.3. Laguna de El Tejo.
Figure 2.3. Lake El Tejo.

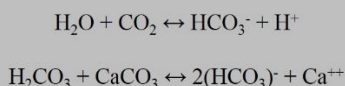
APROXIMACIÓN GEOLÓGICA DE LA ZONA DE ESTUDIO

Eraso et al. (1979) señalaron en un innovador y magnífico tratado de geología que el sustrato donde se asienta el complejo lagunar de Cañada del Hoyo es fundamentalmente cretácico. De un modo más detallado, podemos indicar que la mayor parte de las lagunas situadas en la margen derecha del río Guadazaón se encuentran emplazadas en el piso Cenomanense medio-superior (90-130 m de potencia), constituido por la Formación Dolomías de Alatoz y por la Formación Dolomías de Villa de Ves (Gutiérrez-Elorza & Valverde, 1994). Por tanto, se trata de materiales calizos solubles y permeables que permiten la karstificación^(*) profunda por acción de la cuenca de drenaje del río Guadazaón (Eraso et al., 1979). Además, la karstificación de esta zona se encuentra condicionada por la tectónica: las diaclasas que fracturan este sustrato cretácico han dirigido estructuralmente los colapsos producidos por la karstificación (Casado & Montes, 1995). Otra peculiaridad de esta zona de *karst* es su asentamiento en la Formación Margas de Chera (Cenomanense arcilloso-margoso), de una potencia variable entre 20-80 m (IGME, 1979; Gil et al., 2004) y cuyos materiales impermeables favorecen la retención de agua en aquellas dolinas donde afloran, originado así las lagunas de este especial enclave (Santiesteban, 1994; Julià et al., 1998).

En síntesis, la Laguna de El Tejo tiene su origen en un fenómeno de modelaje cárstico en la margen derecha del río Guadazaón unido a la singularidad del asentamiento sobre un sustrato arcilloso-margoso (impermeabilizando el área de descarga del vaso y reteniendo el agua del acuífero local). La laguna está encajada en una dolina, presentando una morfología de contorno prácticamente circular y de perfil tronco-cónico, con orillas muy abruptas y paredes escarpadas, y con un volumen de agua en la cubeta en equilibrio con el nivel del acuífero que la circunda.

(*) En general, la **karstificación** comprende el conjunto de transformaciones producidas en determinada región como consecuencia de la acción erosiva y disolución de aguas subterráneas y/o superficiales sobre un sustrato soluble (calizas y/o yesos). Se trata pues de unos fenómenos dinámicos que pueden producir cambios constatables en una reducida escala de tiempo desde el punto de vista geológico (Llopis, 1970).

En el caso particular de los sustratos calizos, el agua los ataca químicamente gracias al dióxido de carbono (CO₂) que se encuentra disuelto en forma de ácido carbónico (H₂CO₃), siendo este ácido débil el que reacciona directamente con el carbonato cálcico (CaCO₃, sal insoluble) que compone la roca, dando lugar a bicarbonatos que son solubles y pueden ser arrastrados. Estas reacciones químicas se expresan a continuación:



De este modo, las infiltraciones de agua en superficie van produciendo suaves depresiones del terreno (sumideros), mientras que por el interior la percolación-circulación de agua subterránea disuelve el sustrato favoreciendo la subsidencia del terreno hasta causar colapsos gravitacionales (Casado & Montes, 1995). En esta zona de Cañada del Hoyo los hundimientos dirigidos por la tectónica han constituido las manifestaciones externas de esta karstificación (*exokarst*): grandes socavones en el terreno llamados dolinas u hoyas de contorno prácticamente circular y perfil cónico y/o troncocónico (Alonso et al., 1987; Cirujano & Medina, 2002), que si son suficientemente profundos permiten que aflore el nivel freático, constituyendo así un área de descarga del acuífero cárstico. La capacidad de retención de agua tanto del nivel freático como de escorrentía depende del espesor del afloramiento de materiales geológicos impermeables así como de la acumulación en el fondo de la laguna de arcillas de decalcificación como residuo tras la disolución de las calizas.

PRIMERAS APROXIMACIONES A LA CARACTERIZACIÓN LIMNOLÓGICA

La peculiar morfología de la Laguna de El Tejo donde la cubeta es muy profunda en relación con la superficie y las paredes que la rodean limitan la acción del viento, favorece el establecimiento de una termoclina estival y por tanto de una marcada estratificación térmica vertical que debe tenerse en cuenta desde el punto de vista del estudio ecológico de las comunidades pelágicas, tal y como se ha observado en algunas lagunas vecinas pertenecientes al mismo sistema lagunar (e.g. Vicente & Miracle, 1988; Dasí & Miracle, 1991; Rodrigo, 1997). En el caso particular de la Laguna de El Tejo, todos los registros llevados a cabo indican que

esta laguna es monomíctica, esto es, sus aguas se mezclan hasta el fondo en el periodo de finales de otoño-principios de primavera tras la estratificación térmica vertical que comprende el intervalo de mayo a octubre.

Por otra parte, el régimen hídrico que se establece sobre esta zona de *karst* determina la naturaleza química del agua de la laguna: se trata de una laguna del tipo bicarbonato-cálcico, con aguas muy mineralizadas por efecto de la disolución del sustrato calcáreo, lo que explica su alcalinidad y pH básico. Son aguas duras con concentraciones considerables de carbonatos, calcio y magnesio, pero bajas concentraciones de cloruros, sulfatos y sodio. En sistemas de este tipo la actividad fotosintética por parte del fitoplancton y/o macrófitos reduce la concentración de anhídrido carbónico en el agua, desplazando el equilibrio de bicarbonatos a carbonatos (CO_3^{2-}), aumentando el pH y favoreciendo la aparición de cristales de calcita (CaCO_3). Por tanto, la acción biótica es capaz de modificar los equilibrios químicos establecidos en estos sistemas cársticos.

En determinadas condiciones (actividad fotosintética intensa, mayores fotoperiodos) los cristales se generan de forma masiva y es posible ver a simple vista como el color de las aguas se torna lechoso, lo que se conoce como fenómeno de blanqueado (*whiting*). Este suceso ocurre cada año en la cercana Laguna de La Cruz (Rodrigo et al., 1993; Miracle et al., 1998, 2000; Sendra, 2009) y tenemos constancia que también se produce en la Laguna de El Tejo, si bien no es conspicua todos los años. Este acontecimiento afecta principalmente a las comunidades fitoplanctónicas, puesto que los cristales reducen la transparencia de las aguas, impidiendo la entrada efectiva del espectro lumínico, reduciendo así su actividad fotosintética y provocando de este modo un declive del fitoplancton.

En cuanto a las entradas y salidas de agua en la laguna, la entrada más importante es la alimentación de agua subterránea procedente del acuífero local que drena hacia el río Guadazaón y que se encuentra directamente influenciado por la climatología. De igual modo, la citada morfología de la dolina favorece la ausencia de afluentes y efluentes superficiales, si bien otras entradas de agua menores son las correspondientes a fenómenos de escorrentía en la dolina y a lluvias. En cuanto a las principales pérdidas de masa de agua podemos señalar las causadas por la evaporación del agua de la propia cubeta y por la explotación del acuífero. Por tanto, se trata de un sistema bastante estanco, característica que unida a la particular química de estas aguas condiciona las comunidades biológicas que se establecen. Respecto a esas comunidades, la presente tesis se centró en las comunidades fitoplanctónicas pelágicas, dado que son las que básicamente sustentan la red trófica de este sistema acuático. Esto es debido a la comentada verticalidad de las orillas de la laguna que impide el desarrollo de un espesor de sedimentos idóneo para el establecimiento de una considerable vegetación litoral así como de macrófitos sumergidos, y por tanto las posibles comunidades asociadas al litoral son de escasa importancia.

En referencia al estado trófico de la Laguna de El Tejo, los resultados obtenidos hasta el momento indican que la laguna es la más oligotrófica dentro del sistema lagunar de Cañada del Hoyo, por su mayor visibilidad del disco de Secchi y por unas concentraciones de fósforo soluble y clorofila en superficie dentro de los límites indicados por la OCDE para los lagos oligotróficos (Padisák, 2004). La escasez de nutrientes como el fósforo se explica en parte a los escasos aportes, unido a que en sistemas alcalinos el fósforo soluble precipita por las altas concentraciones de calcio disuelto (e.g. Dittrich & Koschel, 2002). Además, el aporte exógeno de nutrientes y otro tipo de perturbaciones tanto de origen antrópico (uso recreativo, ganado) como natural (e.g. acceso de fauna salvaje) se encuentran limitados por la difícil accesibilidad a la laguna y su ubicación en un

entorno rural. Este conjunto de circunstancias implica que las densidades de organismos fitoplanctónicos encontradas en este sistema sean bajas, si bien nuestro trabajo ha revelado que las comunidades biológicas que se establecen en función del espacio y del tiempo suelen ser complejas y de un carácter bastante predecible.

CLIMA, FLORA Y FAUNA

El clima de la zona donde se encuentran estas lagunas es de tipo mediterráneo continentalizado, con una estación seca bien marcada (verano) y unas precipitaciones anuales de unos 500-600 mm (AEMET: www.aemet.es). En el capítulo 4 se detallan los datos recogidos de las estaciones meteorológicas cercanas a la zona de estudio durante el periodo 1997-98.

La vegetación que corresponde a este clima es el dominio bioclimático del bosque supra-mediterráneo seco-subhúmedo superior continental, consistente en un bosque mixto de pinos (*Pinus nigra* spp. *salzmanii*) y sabinas (*Juniperus thuriferae*) con algunas encinas (Peinado & Martínez-Parras, 1985; Escudero & Regato, 1992). En el caso particular del entorno de la Laguna de El Tejo, es interesante mencionar la presencia de algunos tejos (*Taxus baccata*) en las paredes verticales de la dolina en la zona de umbría de la laguna y que presumiblemente dieron nombre a esta laguna, lo que hace suponer que su presencia pudo ser mayor o bien existió un ejemplar de dimensiones singulares.

Respecto a la vegetación acuática y marginal, Cirujano y Medina (2002) señalaron que es poco abundante debido a lo abrupto de sus orillas. Como planta helofítica marginal únicamente se detalla la esporádica presencia del junco

Scirpus lacustris subsp. *lacustris*, y las plantas acuáticas son *Chara aspera* var. *aspera* y *Myriophyllum spicatum*, aunque se encuentran de forma dispersa.

Por último, en cuanto a la ictiofauna mencionar que a pesar de la supuesta ausencia de peces en estos sistemas se han encontrado especies introducidas como las bermejuelas (*Chondrostoma arcasii*) y los barbos (*Barbus guiraonis*) (Fernando Alonso y Antonio Camacho, comunicación personal).

OTRAS CONSIDERACIONES: USOS

Este sistema lagunar presenta características bastante naturales o poco alteradas por el impacto antrópico debido a dos causas: (1) entorno rural con bajas densidades poblacionales y (2) una topografía bastante abrupta para acceso y explotación. Sin embargo, estas lagunas han sido utilizadas tradicionalmente por los habitantes de la zona como abrevadero para el ganado (no en el caso de la Laguna de El Tejo), para la pesca y con fines recreativos (baño).

Debe tenerse en cuenta que en estos sistemas cársticos cualquier cambio en el acuífero (entre otros sobreexplotación y/o contaminación por vertidos) puede afectar rápidamente a las lagunas puesto que dentro del *karst* la conexión de todo el sistema es alta y por tanto la velocidad de circulación de sus aguas puede llegar a ser relativamente elevada. Dichos efectos no son sólo físicos (e.g. cambios de nivel) sino que pueden modificar las comunidades biológicas que presentan un frágil equilibrio con su entorno.

Conocida su vulnerabilidad, la Junta de Castilla-La Mancha declaró en el año 2007 este complejo lagunar como Monumento Natural dentro del Parque Natural Serranía de Cuenca (BOE-A-2007-10024). Dicha figura de protección ha

permitido reducir los impactos negativos a los que se encontraban sometidas las lagunas (carga ganadera, introducción de especies, presión recreativa, alteración de la vegetación, sobreexplotación del acuífero), suponiendo un notable impulso para salvaguardar un enclave tan peculiar.

BREVE RESEÑA HISTÓRICA

Al parecer, las primeras referencias sobre las lagunas de Cañada del Hoyo son geológicas y datan del último tercio del s. XIX. Es a lo largo de este siglo cuando se consolida la geología como ciencia en España (Vernet, 1975), época en la cual ingenieros de minas, geógrafos y naturalistas empezaron a elaborar mapas geológicos-cartográficos de España al tiempo que iban normalizando terminologías, metodologías de observación en el campo y la representación cartográfica (Frochoso & Sierra, 2004).

Daniel Francisco de Paula Cortázar y Larrubia (1844-1927) escribió una pequeña reseña en 1871 donde refiere las torcas de la Serranía de Cuenca (Cortázar-Larrubia, 1871). Por su parte, Federico de Botella y de Hornos (1822-1899) en una obra de 1875 (Fig. 2.4) realizó una descripción del paraje donde se hallan estas lagunas, razonando acerca de los fenómenos geológicos que a su parecer dieron lugar a las dolinas: consecuencia de la acción del agua en la formación cretácea. A lo largo de su escrito se indica la presencia de fallas y de hundimientos gravitatorios circulares en la zona de los Oteros, conocidos como *torcas* en la zona, y como algunas de ellas presentaban una laguna en el fondo. Con un lenguaje que en la actualidad puede resultar muy novelístico, Federico de Botella y de Hornos (1875) inició su relato del siguiente modo:

'A legua y media de Reylo, y camino de los Oteros, preséntanse sobre la mesa cretácea que se va atravesando, unos enormes hundimientos enteramente circulares...; suelen tener, por lo común, una pequeña laguna en su fondo...Digno es seguramente este fenómeno de fijar la atención...'

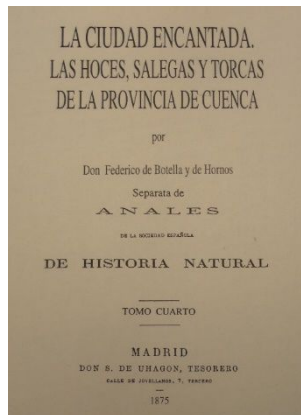


Figura 2.4. Portada del facsímil de la separata de Federico de Botella y de Hornos (1875).

Figure 2.4. Cover of Federico de Botella y de Hornos' facsimile reprint (1875).

No es hasta bien entrado el s. XX cuando el geólogo Adolfo Eraso aportó un concienzudo estudio geológico de esta región (Eraso et al., 1979), basándose en los trabajos llevados a cabo por Fernando Meléndez Hevia (1971) sobre la geología de la Serranía de Cuenca.

Ya en los años 80 aparecen varias publicaciones relacionadas con el cretácico superior en Castilla-La Mancha (e.g. Fernández-Calvo, 1982a,b), así como de los procesos de karstificación en la Serranía de Cuenca (Alonso et al., 1987). En los años 90 existen aportaciones específicas referidas a la geología de Cañada del Hoyo y sus lagunas (e.g. Santiesteban, 1994). Y los últimos estudios sobre el sistema cárstico de Cañada del Hoyo son los de Carmona y Bitzer (2001). Todas

estas disertaciones evidencian que Cañada del Hoyo y su entorno constituyen una zona a conservar dentro del rico patrimonio geológico de España (Durán, 2004), impulsado además por su reciente reconocimiento como Monumento Nacional dentro del Parque Natural Serranía de Cuenca.

CAPÍTULO 3

MATERIAL Y METODOLOGÍA ANALÍTICA

GENERAL

ESQUEMA DE MUESTREOS Y MATERIAL DE TOMA DE MUESTRAS

En la Laguna de El Tejo se llevaron a cabo una serie de campañas de muestreo mensuales desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998. Estos muestreos constituyen los primeros registros limnológicos formales obtenidos para la Laguna de El Tejo, puesto que tradicionalmente los estudios de esta unidad de investigación se han centrado en la Laguna de La Cruz y en el Lagunillo de El Tejo. En la tabla 3.1 se representa de modo esquemático el calendario de muestreos de la Laguna del Tejo en el periodo 1997-98, así como las profundidades a las cuales se tomaron muestras para su posterior análisis.

Tras el procesamiento de todas las muestras del periodo 1997-98 (en especial los recuentos de nanofitoplancton) los resultados obtenidos despertaron el interés por una aproximación al funcionamiento de este sistema, de modo que se diseñaron y realizaron unas experiencias de enriquecimiento de nutrientes durante 2003-04 (cuya metodología específica se detalla en el capítulo 6). Por tanto, podemos distinguir dos fases en cuanto al trabajo de campo realizado en esta laguna:

- 1) Campañas de muestreo mensuales en el periodo 1997-98 (capítulos 4 y 5).
- 2) Muestreos puntuales junto a experiencias de enriquecimiento de nutrientes coincidiendo con las distintas estaciones del periodo 2003-04: primavera, verano y otoño de 2003 e invierno de 2004 (capítulos 6 y 7).

En todos los casos los muestreos siempre se llevaban a cabo desde una barca en la zona central de la laguna, sobre el punto de máxima profundidad. Con objeto de trabajar en condiciones de estabilidad durante la realización del muestreo y además evitar perturbaciones tanto en la columna de agua como en el sedimento del fondo, la barca no era anclada sino fijada en el cruce de cuerdas que se situaban siguiendo dos diámetros perpendiculares de la laguna. Una vez colocados en el bote se procedía en primer lugar a la toma de las variables físicas y químicas (normalmente los perfiles se realizaban a mediodía) y en función de los distintos perfiles verticales obtenidos se seccionaban las profundidades para proceder a la posterior toma de muestras.

Los principales aparatos de muestreo utilizados en estas campañas fueron la botella hidrográfica Ruttner y el muestreador de doble cono. La botella hidrográfica Ruttner (Fig. 3.1a) es un cilindro de metacrilato de 2.7 litros de capacidad, que baja con sus dos extremos abiertos a la profundidad de interés; una vez se lanza el testigo que cierra la botella se procede a su ascenso y a tomar a través de un tubo de goma las muestras de agua de esa profundidad concreta.

Para una toma de muestras más fina, durante el experimento de enriquecimiento de nutrientes de 2003-04 se utilizó el muestreador de doble cono (Fig. 3.1b),

descrito en García-Gil & Camacho (2001). Este muestreador de capa fina presenta dos conos de metacrilato separados en sus bases por un centímetro de distancia, estando el cono inferior relleno de perdigones con objeto de ejercer un adecuado contrapeso. A su vez, dicho muestreador está conectado a un tubo, el cual se encuentra acoplado a una bomba peristáltica situada en la barca. Una vez se coloca el muestreador a la profundidad seleccionada se acciona la bomba y a través de la ranura del muestreador entra una fina lámina de agua que llega a superficie a través del tubo y el agua es recogida en los recipientes adecuados en función de su posterior procesado.

El número de muestras que se recogía en cada campaña dependía de los perfiles de la laguna, de modo que durante las épocas de estratificación al establecerse más zonas de gradiente se tomaban un mayor número de muestras para englobar todas las posibles condiciones físicas, químicas y/o biológicas de la columna de agua.

Tabla 3.1. Calendario de muestreos en la Laguna de El Tejo en el periodo 1997-98. Se indica mediante un código la asignación de muestra como E (epilimnion), M (metalimnion), H (hipolimnion), O (oxiclina) y F (fondo).

Table 3.1. Lake El Tejo sampling schedule during 1997-98. A code indicates each sample as E (epilimnion), M (metalimnion), H (hypolimnion), O (oxycline) and F (bottom).

YEAR	97	97	97	97	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98		
MONTH	9	10	10	11	12	1	2	3	5	6	7	8	9	11	12		
DAY	17	2	15	13	10	20	25	31	6	9	7	18	30	2	16		
DEPTH (m)	0,5					0,5	0,5									E	
1	1																
2																	
3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	E
4																	
5																	
6																	
7												7					E
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8		8	8	8		E
9																	
10		10,5															M
11		11							11	11	11	11	11	11			M
12								12									M
13			12,5														M
14	14	14	14						14	14	14		14	14	14		H
15																	
16		15,5	15,5					15,5				15,5					H
17	16		16,1	16,1	16,1	16	16		16	16	16		16	16			H
18	18	18	18	18													O
19		19	19						19		19	19			19		O
20		19,5		19,5				19,5		19,5			19,5	19,5			O
			20														O
											20,5						O
21					21					21	21		21	21			O
22									21,75								O
23																	
24						24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	F

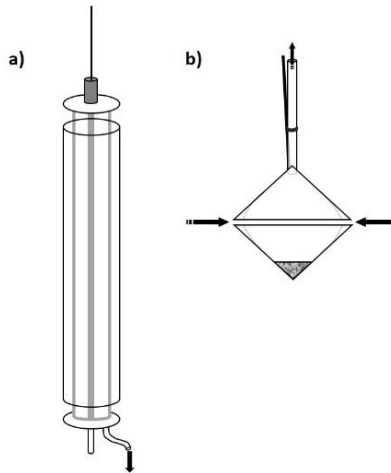


Figura 3.1. Dibujo esquemático de los aparatos de toma de muestras utilizados durante las campañas de muestreo en la Laguna de El Tejo. a) botella hidrográfica Ruttner y b) muestreador de doble cono. Las flechas indican el sentido del flujo de agua.

Figure 3.1. Schematic draw of sampling instruments used for sampling in Lake El Tejo. a) Ruttner's hydrographic bottle and b) Double-cone sampler. Arrows indicate water flow direction.

PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de agua que se tomaban *in situ* eran básicamente de dos tipos: las destinadas a análisis químicos y las que correspondían a análisis biológicos. En función de cada análisis se tuvo en cuenta el tipo de recipiente, si la muestra debía ser filtrada o no y la posible adición de conservantes o estabilizantes (Tabla 3.2).

En el caso particular de muestras para recuento de nanofitoplancton, el agente preservante fue solución de lugol neutra, adicionada justo tras la toma de muestras en una cantidad de 0.4-0.8 mL por 200 mL de muestra (Willén, 1976). Estas muestras se conservan en botellas de vidrio actínico puesto que los materiales plásticos extraen el yodo de la solución, disminuyendo su capacidad de agente fijador. Además, durante el almacenaje de muestras se deben evitar las altas temperaturas y la incidencia de luz directa, factores que aumentan la pérdida de

iodo molecular (Thronsdén, 1978). El uso de esta solución de lugol es ventajoso por la buena fijación de estructuras de los organismos fitoplanctónicos (e.g. flagelos), favoreciendo su coloreado la observación bajo microscopio, y aportando una densidad extra que ayuda a la sedimentación durante la preparación de las muestras (Lund et al., 1958). Además, este agente preservante es fácil de conseguir, se conserva bien durante años y no se ha determinado que sea peligroso para la salud como el caso del formaldehído.

Tabla 3.2. Esquema de los recipientes utilizados y tratamientos previos llevados a cabo durante la recogida de muestras de agua.

Table 3.2. Sampling containers and previous treatments according to each water sample analysis.

ANÁLISIS	RECIPIENTE	V (mL)	PRETRATAMIENTO	PRESERVACIÓN
Alcalinidad	Botella Pyrex® vidrio	50		5 mL HCl 1N
Fósforo soluble	Botella polietileno	50	filtrar <i>in situ</i> con GF/F	2 gotas cloroformo
Fósforo total	Tubo Pyrex® vidrio	50		0.3 mL H ₂ SO ₄ 1:2N
Silicato	Botella polietileno	50	filtrar <i>in situ</i> con GF/F	2 gotas cloroformo
Nitrito	Botella polietileno	50	filtrar <i>in situ</i> con GF/F	0.5 mL de sulfanilamida
Nitrato	Botella polietileno	125	filtrar <i>in situ</i> con GF/F	1 mL de H ₃ BO ₃
Amonio	Botella polietileno	50	filtrar <i>in situ</i> con GF/F	HgCl ₂ al 0.01%
Nitrógeno total	Tubo Pyrex® vidrio	50		
Cloruros	Botella polietileno	50		
Sulfatos	Botella polietileno	50		
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	Botella polietileno	100		1 mL HNO ₃ al 60%
Sólidos en suspensión	Botella PET	1000-2000		Oscuridad y 4°C
Pigmentos fotosintéticos	Botella PET	1000-2000		Oscuridad y 4°C
Recuento bacterias fotosintéticas	Tubos de vidrio estériles	15		Formol 2% y oscuridad
Recuento nanofitoplancton	Botellas de vidrio actínico	125-250		0.4-0.8 mL de lugol ^(*) y oscuridad
Recuento zooplancton	Viales de vidrio		Filtrar <i>in situ</i> en filtros de 35 µm	Formol 4% y oscuridad

(*) Solución yoduro de yoduro potásico: 20g de yoduro potásico (KI) disuelto en 200mL de agua destilada. Adicionar 10g de cristales de yodo.

VARIABLES FÍSICAS Y QUÍMICAS DETERMINADAS *IN SITU*

Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto a lo largo del perfil vertical se obtuvo gracias a un oxímetro que presentaba un electrodo de plata-oro tipo Clark conectado a un medidor WTW modelo Oxi91. Antes de la toma de medidas se dejaba polarizar el aparato durante media hora, para pasar a calibrarlo al aire en atmósfera saturada de vapor de agua teniendo en cuenta la presión atmosférica en el momento de la calibración. La concentración de oxígeno es proporcional a las variaciones de intensidad de corriente entre ánodo y cátodo del electrodo, que vienen determinadas por la concentración de oxígeno disuelto en el agua.

En general se realizaban medidas dentro del perfil a intervalos de cada metro de profundidad, si bien en las profundidades donde se detectaban fuertes gradientes se efectuaban medidas a intervalos menores (e.g. cada 10 cm).

Conductividad

Las medidas de conductividad se realizaron con un conductímetro WTW modelo LF-191 cada metro de profundidad. Los valores que marcaba el aparato de medida ($\mu\text{s cm}^{-1}$) estaban corregidos a 25°C.

Densidad y estabilidad

Con los datos de conductividad corregida a 25°C (K_{25}) y la temperatura de la sonda a cada profundidad (T) se calculó la densidad del agua utilizando las fórmulas propuestas por Büher & Ambühl (1975):

$$\rho = [((0.059385 \times T^3) - (8.56272 \times T^2) + (65.4891 \times T)) \times 10^{-6}] + 0,99984298$$

$$\rho_{\text{final}} = \rho + (0.58 \times 10^{-6} \times K_{25})$$

Teniendo en cuenta la densidad se calculó la estabilidad mediante la frecuencia de Brunt-Väisälä (Millard et al., 1990; Doval et al., 1997) como media integrada de la columna de agua para cada muestreo según la expresión (en min^{-2}):

$$\bar{N}^2 = \frac{g}{z} \times \ln \frac{\rho_b}{\rho_s}$$

siendo g la constante de la gravedad (cm s^{-1}), z la profundidad (cm), ρ_b la densidad en superficie y ρ_s la densidad en el fondo.

Temperatura

A lo largo del perfil vertical se tomaron medidas de temperatura con las sondas térmicas instaladas tanto en el conductímetro como en el oxímetro. En este caso las medidas también se realizaban cada metro de profundidad, disminuyendo los intervalos de medida cuando se detectaban fuertes gradientes.

Radiación fotosintéticamente activa (PAR) y transparencia del agua

La penetración luminosa en profundidad se determinó con un cuantómetro Li-Cor modelo Li-1000 que contenía una célula fotovoltaica capaz de integrar la energía luminosa en una banda comprendida entre 400-800 nm (Jenson et al., 1984). El aparato expresaba la intensidad lumínica en valor absoluto como $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La extinción de luz en el agua sigue la ley de Lambert-Beer:

$$I_z = I_0 e^{-kz}$$

de modo que podemos saber la intensidad luminosa que alcanza determinada profundidad (I_z) en el perfil a partir de la intensidad incidente en superficie (I_0) y el coeficiente de extinción vertical (k). Transformando matemáticamente este modelo obtenemos la fórmula que nos permite obtener el valor del coeficiente de extinción entre dos profundidades determinadas (z_1 y z_2) de la columna de agua:

$$\ln I_z = \ln I_0 - kz$$
$$k = (\ln I_1 - \ln I_2) / (z_2 - z_1)$$

siendo I_1 e I_2 las intensidades luminosas de las profundidades correspondientes a

z_1 y z_2

Una forma adicional de caracterizar las propiedades ópticas del agua, en concreto la transparencia, fue con ayuda del disco de Secchi. Este disco era de PVC pintado de blanco, de 20 cm de diámetro y con un contrapeso de plomo en su base para facilitar su hundimiento. Se sumergía en vertical por el lado de la barca donde la misma no hace sombra, y se iba descendiendo hasta que dejaba de verse en la

vertical. El valor de la profundidad de desaparición del disco de Secchi (Ds) se relaciona con el coeficiente de extinción (k) entre la superficie y esa profundidad del disco de Secchi (Vollenweider et al., 1974; Wetzel & Likens, 1979), lo que se expresa a través de la siguiente relación:

$$k * Ds = N \text{ (constante)}$$

siendo N una constante de valor aproximado a 1.7 en las aguas continentales (Rull et al., 1984). Este coeficiente de extinción vertical da idea de la calidad del agua, siendo de mayor valor cuanto mayor sea la cantidad de sustancias disueltas.

pH y potencial REDOX (Eh)

El pH se medía mediante un electrodo combinado de vidrio y de referencia Ross (ORION modelo 81-02SC) junto a una sonda de temperatura y conectados a un medidor digital portátil (ORION modelo SA-250).

En cuanto al potencial de óxido-reducción (REDOX) se determinaba mediante un electrodo de platino (ORION modelo 96-78) y un electrodo de referencia (ORION modelo 90-02) conectados a un medidor potenciométrico (RADIOMETER modelo PHM-80), refiriendo los resultados al potencial estándar del electrodo de hidrógeno con una solución patrón de potencial conocido.

ANÁLISIS QUÍMICOS DETERMINADOS EN EL LABORATORIO

A continuación se describen de forma resumida los fundamentos y procedimientos de cada uno de los métodos empleados para los análisis químicos que se determinaron en el laboratorio, siendo posible consultar una descripción más detallada en Camacho (1997) y siguiendo por lo general los protocolos de APHA-AWWA-WEF (1992). En todos los casos relativos a espectrofotometría se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-7.

Sales: Alcalinidad total

Fundamento: La alcalinidad es la capacidad tamponadora del agua para neutralizar un ácido, la cantidad de bases fuertes libres ligadas a ácidos débiles. Esos ácidos débiles son principalmente bicarbonatos, carbonatos e hidróxilos, y en menor grado boratos, fosfatos y silicatos. El análisis para conocer la reserva alcalina de determinada agua consiste en añadir un ácido fuerte a la muestra que desplaza todos los carbonatos a CO_2 y el exceso de ácido se valora con una base fuerte (Golterman et al., 1978). En nuestro caso, el ácido fue ácido clorhídrico (HCl 1N) y la base hidróxido sódico (NaOH 1N).

Primeramente se debe calcular exactamente la normalidad de la solución de NaOH con un patrón primario de valoración, en este caso biftalato potásico. Esa misma solución de NaOH se utilizaba para valorar la solución de HCl .

Procedimiento: Durante el muestreo se recogían 50 mL de agua de muestra para cada profundidad de interés y se añadía un volumen conocido (5 mL) de HCl de normalidad conocida. En el laboratorio se añadía una gota de indicador mixto, adquiriendo las muestras una tonalidad rosada que indicaba que el medio era ácido. A continuación, con cuidado se llevaban las muestras a

ebullición para desprender todo el CO₂. Una vez enfriadas, se procedía a valorar el exceso de ácido con la solución de NaOH de normalidad conocida, hasta el punto de viraje del indicador que correspondía al tránsito de coloración rosada a un tono gris-azulado. Conocidas las normalidades y los volúmenes empleados de los reactivos, se calculó la alcalinidad mediante la siguiente expresión:

$$\text{meq L}^{-1} = ((V_{\text{HCl(mL)}} \times N_{\text{HCl}}) - (V_{\text{NaOH(mL)}} \times N_{\text{NaOH}})) \times 1000 / V_{\text{muestra(L)}}$$

Sales: Cloruros

Fundamento: Se evalúa la concentración de cloruro por método volumétrico con nitrato de plata (AgNO₃) de normalidad conocida, utilizando cromato potásico (K₂CrO₄) como indicador (argentimetría). Los cloruros del agua reaccionan con el nitrato de plata y se forma la sal de cloruro de plata (AgCl) y esto induce un cambio del indicador de una coloración amarillo limón a anaranjado (Strickland & Parsons, 1972).

Procedimiento: A 25 mL de muestra filtrada se le añadían tres gotas de indicador y se valoraba añadiendo solución de AgNO₃ gota a gota hasta que se producía el viraje.

Sales: Sulfatos

Fundamento: Los sulfatos presentes en una muestra de agua se precipitan en forma de sulfato de bario (BaSO₄) al añadir cloruro de bario (BaCl₂) en medio ácido (para evitar la precipitación de carbonatos). Ese precipitado coloidal se

estabiliza con polivinil-pirrolidona (PVP) y se mide la turbidez de esa suspensión homogénea a 650 nm (Rodier, 1984). Este método se conoce como nefelometría.

Procedimiento: A 25 mL de muestra de agua filtrada se le añadía 1 mL de HCl 1/10 y 5 mL de solución de BaCl₂ con PVP. Se agitaba y tras 15 minutos de reposo se volvía a agitar para proceder a medir la absorbancia a 650 nm.

Nutrientes solubles: Nitrito

Fundamento: El análisis para determinar la concentración de nitrito se basa en la reacción de Griess (APHA-AWWA-WEF, 1992), que consiste en transformar en medio ácido el nitrito de la muestra a ácido nitroso. En presencia de sulfanilamida el ácido nitroso forma una sal diazónica estable que reacciona cuantitativamente con naftiletildiamida (NNED) coloreando la muestra de un tono rosado y se mide la absorbancia a 543 nm (método colorimétrico).

Procedimiento: En el campo se recogían 25 mL de agua filtrada y se añadían 0.5 mL de sulfanilamida para estabilizar el nitrito presente. En el laboratorio se adicionaban 0.5 mL de NNED y tras 15 minutos y antes de 2 horas se medía la absorbancia a 543 nm. Se seguía el mismo proceso con blanco y patrones.

Nutrientes solubles: Nitrato

Fundamento: El nitrato de una muestra de agua puede ser reducido a nitrito al atravesar una columna de cadmio cuperizado en solución alcalina tamponada a pH=8. A partir de este punto se realiza el análisis colorimétrico de

determinación de concentración de nitrito según el método explicado en el apartado anterior.

Procedimiento: A 100 mL de muestra filtrada se le añadía 1 mL de solución tampón diluida de cloruro amónico, y la mezcla se hacía pasar por la columna reductora de cadmio. Se desechaban los primeros 50 mL de muestra y se recogían los siguientes 25 mL, añadiendo a continuación 0.5 mL de sulfanilamida. Posteriormente se procedía a aplicar el método de Griess. Patrones y blanco seguían el mismo procedimiento. Se debe tener en cuenta que la concentración que se obtiene es la suma de nitritos y nitratos presentes en la muestra; por tanto, a este valor se debe restar la concentración de nitritos para obtener la concentración de nitratos.

Nutrientes solubles: Amonio

Fundamento: La determinación del amonio se realizó mediante el método colorimétrico del azul de indofenol modificado según Verdouw et al. (1978) con objeto de evitar el uso del fenol. El amonio oxidado reacciona con el salicilato sódico en solución alcalina y en presencia de nitroprusiato de sodio e isocianurato de cloro y sodio, siendo el color verde que aparece en la reacción proporcional a la cantidad de amonio presente en dicha muestra.

Procedimiento: A 25 mL de muestra filtrada se le añadían 5 mL de solución de salicilato de sodio al 40% y 1 mL de NaOH 10M. A continuación se adicionaban 2 mL del reactivo y se medía la absorbancia a 650 nm tras 60 minutos.

Nutrientes solubles: Fósforo reactivo soluble (SRP)

Fundamento: Este análisis es el propuesto por Murphy & Riley (1962) detallado en Strickland & Parsons (1972) y llamado *método del azul de molibdeno*. Este método se basa en que los iones fosfato en medio ácido reaccionan con molibdato para dar fosfomolibdato de color amarillo, que se convierten en compuestos de color azul por la acción de agentes reductores, en nuestro caso ácido ascórbico.

Procedimiento: Se tomaban 25 mL de muestra filtrada y preservada con cloroformo y se le añadían 5 mL de reactivo de análisis. El reactivo de análisis se obtiene mezclando un reactivo y una solución de ácido ascórbico siguiendo a Murphy & Riley (1962). Blanco y patrones eran tratados de la misma manera. Tras 15 minutos y antes de 2 horas se medía la absorbancia a una longitud de onda de 882 nm (Golterman et al., 1978).

Nutrientes solubles: Silicato reactivo soluble (SRSi)

Fundamento: Las formas de silicato reactivo soluble reaccionan con el molibdato para dar compuestos que se pueden reducir a azul de molibdeno. Es un método de análisis basado en reacciones químicas similares a las del análisis colorimétrico para fosfatos pero en ambos casos hay reacciones que evitan las interferencias.

Procedimiento: A 10 mL de solución de molibdato se le añadían 15 mL de muestra filtrada. Tras unos minutos se añadían 15 mL de reactivo reductor siguiendo a Murphy & Riley (1962). Tras 2 horas se medía la absorbancia a 810 nm.

Nutrientes totales: Nitrógeno total

Fundamento: El método de análisis para el nitrógeno total consiste en una hidrólisis alcalina en caliente (método de Koroleff, 1983). Durante la digestión todos los compuestos de nitrógeno son oxidados a nitratos, que son analizados por colorimetría.

Procedimiento: La digestión alcalina con persulfato consistía en una oxidación de los compuestos de nitrógeno a nitratos con persulfato potásico en un medio fuertemente alcalino, bajo condiciones de alta presión y temperatura en autoclave. Se enfriaban y neutralizaban las muestras, procediendo al análisis de los nitratos con el método colorimétrico descrito anteriormente.

Nutrientes totales: Fósforo total

Fundamento: El método de análisis para el fósforo total es el descrito en Golterman et al. (1978) y consiste en una hidrólisis ácido-persulfática en caliente. Durante la digestión los polifosfatos y fosfatos ligados a moléculas orgánicas pasan a ortofosfato y tras la neutralización se aplica el método del azul de molibdeno descrito en el apartado del fósforo soluble.

Procedimiento: La digestión consistía en adicionar a la muestra sin filtrar, a los patrones y al blanco colocados en tubos Pyrex, ácido sulfúrico y un 1% p/v de persulfato potásico, que eran incubados 2h a 135°C en autoclave. Tras este proceso y una vez se enfriaban las muestras, éstas se neutralizaban para evitar el exceso de ácido en la reacción y a partir de este punto se aplicaba el método del azul de molibdeno.

ANÁLISIS BIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS: DETERMINACIÓN DE LOS PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

La concentración de pigmentos fotosintéticos, en concreto la clorofila *a* (chl-*a*) presente en todas las algas, es la aproximación más utilizada como estima de la biomasa algal de un sistema, siendo además un modo de conocer el estado fisiológico de las células ya que éste no puede determinarse bajo microscopio. Existe metodología muy precisa para la determinación de dichos pigmentos (e.g. HPLC, Fluorometría); sin embargo en el presente estudio se ha llevado a cabo la cuantificación clásica por espectrofotometría dado que los objetivos del trabajo no requerían una caracterización más exhaustiva de los pigmentos algales.

Espectros de absorción del extracto acetónico

A partir de la muestra homogeneizada se filtraba un volumen conocido en un sistema de filtración utilizando un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F. La filtración se realizaba en condiciones tenues de luz, a ser posible evitando la incidencia directa de la luz. El filtro se introducía en un tubo de vidrio de tapón de rosca, se protegía de la luz y se guardaba en un congelador. Una vez se tenía la tanda de muestras, y evitando siempre la incidencia de luz directa, se procedía a añadir a cada tubo 5 ml del solvente acetona 90% (v/v):DMSO (dimetilsulfóxido) (Shoaf & Lium, 1976), tras lo cual se guardaban a -20°C para la extracción durante 24 horas. Tras ese tiempo, se retiraba el filtro y se centrifugaban los tubos a 3500 r.p.m. durante 10 minutos y a 4°C. Con sumo cuidado y ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio se tomaba el sobrenadante para llenar la cubeta del espectrofotómetro de 1 cm de paso óptico y se realizaba el espectro de absorción entre 350-850 nm. Se cuantificaban los valores de absorbancia de los máximos de absorción correspondientes a cada pigmento para

obtener sus concentraciones puesto que se conocen sus coeficientes de extinción. Una descripción detallada de esta metodología se encuentra en Picazo et al. (2013).

Determinación cuantitativa de los pigmentos algales

Una vez obtenidos los espectros de absorción a partir del extracto acetónico es posible calcular las concentraciones de los diferentes pigmentos. Existe una amplia relación de referencias en la bibliografía respecto a los diferentes solventes utilizados y distintas formulaciones (e.g. Strickland & Parsons, 1972; Jeffrey & Humphrey, 1975). En nuestro caso se ha utilizado la fórmula tricromática propuesta por Jeffrey y Humphrey (1975) puesto que está adaptada a la determinación de las clorofilas del fitoplancton de aguas dulces. Las fórmulas se expresan del siguiente modo:

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = (11.85 A_{665} - 1.54 A_{645} - 0.08 A_{630}) * V_{\text{solvente(mL)}} / (V_{\text{muestra(L)}} * z)$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = (21.03 A_{645} - 5.43 A_{665} - 2.66 A_{630}) * V_{\text{solvente(mL)}} / (V_{\text{muestra(L)}} * z)$$

$$\text{Clorofila } c \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = (24.52 A_{630} - 1.67 A_{665} - 7.60 A_{645}) * V_{\text{solvente(mL)}} / (V_{\text{muestra(L)}} * z)$$

siendo A la absorbancia a esa longitud de onda (corregida restando el valor de la turbidez de la muestra debida a partículas en suspensión que corresponde al valor de absorbancia a 750 nm) y z el paso óptico de la cubeta en centímetros (empleándose cubetas de 1 cm).

Si las muestras de agua presentaban bacterias fotosintéticas, el valor de la absorbancia de la turbidez era a 830 nm para evitar la interferencia con el máximo de absorción de la bacterioclorofila *a* que se encuentra entre 772-775 nm.

ANÁLISIS BIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS: RECIENTOS DE ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

Recuentos celulares: picoplancton (APC)

Los recuentos de los pequeños organismos fotosintéticos procariotas (picoplancton) se realizaron con la ayuda del microscopio de fluorescencia aprovechando la autofluorescencia de estas células. Así, un volumen conocido de cada muestra preservada en formol 2% v:v fue filtrado en filtros de 0.2 μm de policarbonato negro y los recuentos se llevaron a cabo con un microscopio de fluorescencia Zeiss III. Para más detalles metodológicos véase Camacho et al. (2003b).

En la Laguna de El Tejo esta fracción de organismos por su tamaño y fisiología se corresponden con el grupo genérico de las picocianobacterias autotróficas (APC) formado por un conjunto de especies posiblemente del género *Synechococcus* (*Synechococcus* spp.)

Recuentos celulares: nanofitoplancton

Las muestras para identificación y recuento de los organismos nanofitoplanctónicos se procesaron siguiendo el método de sedimentación propuesto por Utermöhl (1958), también denominado *método del microscopio invertido* o *método de Utermöhl* (véase Hasle, 1978). Dicho procedimiento se consolidó desde su publicación en 1958 y en la actualidad está recogido por el Comité Europeo de Normalización para su uso estandarizado en análisis biológicos de agua referidos al recuento de fitoplancton bajo microscopio invertido (CEN/TC 230/WG2/TG3/N83, 2004).

Utermöhl (1931, 1958) desarrolló una metodología de cuantificación directa del plancton basándose en el *método de sedimentación* descrito por primera vez por Volk (1906) y en la cámara de recuento diseñada por Kolkwitz (1907). El método de Volk se fundamentaba en concentrar las muestras de agua transfiriendo las mismas desde volúmenes mayores a más pequeños de forma sucesiva, teniendo en cuenta la inevitable pérdida de material. Por otra parte, Kolkwitz construyó una cámara de recuento para uso en un microscopio óptico estándar, donde la altura de dicha cámara obligaba al enfoque a larga distancia dificultando el uso de los mayores aumentos (necesarios en el caso de gran parte de las especies fitoplanctónicas). Utermöhl ideó un sistema que consistía en verter un volumen conocido de muestra preservada y homogeneizada en un cilindro o torre de sedimentación situado sobre una placa (cubeta de sedimentación) que presenta una excavación circular central (Fig. 3.2). Tras un tiempo determinado, que depende de la altura de la columna, se retira el cilindro suavemente con la ayuda de un cristal que empuja lateralmente el cilindro hasta tapar el diámetro de la cubeta de sedimentación; es en esa cubeta donde se recoge todo el material que se encontraba en suspensión en ese agua, evitando así pérdidas durante el proceso de concentrado y favoreciéndose una sedimentación uniforme de dicho material. Todas estas piezas están patentadas, manufacturadas y comercializadas por Hydro-Bios Apparatebau GmbH. En particular, nuestras cubetas presentan una excavación circular central de 26 mm de diámetro y 4 mm de profundidad, sedimentando habitualmente 50 mL por muestra.

Se debe tener en cuenta que el volumen de muestra a sedimentar depende de la cantidad de material disuelto en el agua, de modo que a mayor cantidad de material se requiere un menor volumen a sedimentar. Otras consideraciones son que la muestra debe estar bien homogeneizada, el vertido debe ser lento con objeto de impedir la formación de burbujas de aire, además de evitar la exposición

solar directa y mantener una temperatura constante durante la sedimentación para prevenir la generación de corrientes de convección.

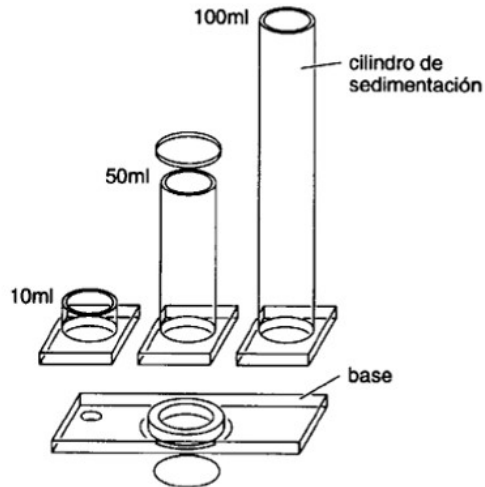


Figura 3.2. Dibujo esquemático de las piezas necesarias para la sedimentación de muestras de fitoplancton siguiendo el método de Utermöhl (Fuente: Ferrario et al., 1995).

Figure 3.2. Schematic draw of phytoplankton sedimentation columns according to the Utermöhl method (From: Ferrario et al., 1995).

En este sistema de procesamiento de las muestras algales el tiempo de sedimentación es función de la altura de la torre de sedimentación y del fijador utilizado, existiendo varias referencias en la literatura especializada. Hasle (1978) señala que las muestras fijadas con reactivo de lugol sedimentan más rápidamente que las que contienen formaldehído. Respecto al tiempo de sedimentación, Utermöhl (1958) recomendó al menos 24 horas de sedimentación, Lund et al. (1958) y Willén (1976) aportan varios tiempos en función del volumen de las torres, mientras Nauwerck (1963) indicó un tiempo de sedimentación de 4 horas por cada centímetro de altura de la torre. Sin embargo, el protocolo más general fue

aportado por Margalef (1969) que señaló que el tiempo de sedimentación ha de ser, en horas, de al menos tres veces la altura de la torre de sedimentación en centímetros.

Puesto que en este sistema la cámara de sedimentación tiene una altura menor a la distancia focal del condensador, se requiere el uso de microscopio invertido y así el enfoque de corta distancia permite mayores aumentos. En los recuentos de este estudio se utilizó un microscopio invertido Zeiss, realizándose dichos contajes con ayuda de la interferencial de Nomarski.

Bajo el microscopio, se realizó una primera aproximación a menores aumentos (200x-400x) de toda la placa y se procedió al recuento a 1000x. El recuento se realizó deslizándose por la placa siguiendo líneas que van de arriba abajo y de izquierda a derecha. En el caso de colonias y/o filamentos se consideró cada una de las células que conforman dicha 'estructura morfológica', puesto que cada célula es considerada como unidad básica de replicación y como tal deben aparecer en el censo (Smayda & Venrick, 1978). Además, durante los recuentos se desestimaban aquellas células vacías o rotas, y aquellas con menos de la mitad dentro del campo óptico. El número de células a contar depende de la precisión requerida en la estima del tamaño poblacional. En nuestro caso, se han seguido las indicaciones aportadas por Lund et al. (1958) y Uthermöhl (1958) basadas en demostraciones empíricas que señalan que, teniendo en cuenta que la población sigue una distribución de Poisson, es necesario contar un total de al menos 100 células del taxón más abundante para un 95% de intervalo de confianza y una precisión de $\pm 20\%$ respecto al valor de la media poblacional. Con 400 células se alcanza un $\pm 10\%$ de precisión (Wetzel & Linkens, 1979). Una mayor aproximación a los fundamentos estadísticos para los recuentos algales se puede encontrar en Venrick (1978).

Dichos recuentos permitieron realizar las listas detalladas de especies identificadas y el número de células de cada especie por unidad de volumen (abundancia o densidad). La identificación de las especies nanofitoplanctónicas se ha basado en las claves taxonómicas y publicaciones de los siguientes autores: Bacillariophyceae en Germain (1981), Krammer & Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a,b) y Kiss et al. (2007); Chlorophyceae en Komárek & Fott (1983); Zygnematophyceae en Förster (1982) y Coesel & Meesters (2007); Cryptophyceae en Huber-Pestalozzi (1968), Anton & Duthie (1981) y Novarino (2003); Chrysophyceae en Starmach (1985); Euglenophyceae en Huber-Pestalozzi (1955) y Tell & Conforti (1986); Dinophyceae en Popovský & Pfiester (1990) y Cyanophyceae en Anagnostidis & Komárek (1988) y Komárek & Anagnostidis (1999). Como libros generales se ha utilizado la clásica serie de Bourrelly (1968, 1972). En los últimos años los avances moleculares han permitido que la taxonomía referente al fitoplancton se encuentre en plena reestructuración, principalmente dentro de algunos grupos como clorofíceas y cianobacterias (e.g. Krienitz & Bock, 2012; Komárek et al., 2014). Teniendo esto en cuenta se han redefinido nuestros listados de especies (incluido los publicados en Morata et al., 2003; capítulo 5) con los nombres aceptados actualmente (Guiry & Guiry, 2015; véase tabla con el listado completo de especies en *Anexo I*).

Como descriptor principal del fitoplancton se calculó la **abundancia** en número de células algales por mililitro, aplicando la siguiente relación:

$$\text{Abundancia algal (cél mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{n}^{\circ} \text{cél contadas/n}^{\circ} \text{campos}) \times (\text{área placa/área campo})}{(\text{volumen sedimentado en mL})}$$

En este tipo de estima de abundancia basada en censos numéricos se debe tener en cuenta que se tiende a sobrestimar las células pequeñas y a subestimar la presencia de las células de mayor tamaño (Smayda & Venrick, 1978), y es por ello que durante los recuentos también se realizaban otra serie de medidas para obtener otros descriptores de los organismos como es el biovolumen. Es así que de forma adicional a los recuentos algales se llevaron a cabo las medidas de las dimensiones de cada especie para el posterior cálculo de **biovolumen**. A este respecto, varios estudios señalan la importancia de la morfometría como descriptor del estado de los sistemas acuáticos (Reynolds, 1997; Quinones et al., 2003) y su implicación en procesos ecológicos (e.g. Vadrucci et al., 2007).

Con objeto de aproximar cada célula algal a una forma geométrica tridimensional lo más similar a su forma real, se obtenían las medidas adecuadas siguiendo las fórmulas propuestas por Rott (1981), Hillebrand et al. (1999) y Sun & Liu (2003). Tal y como refiere la bibliografía, para cada especie se medían las dimensiones de al menos 25 células tomadas al azar (Smayda, 1978; Hillebrand et al., 1999). Es interesante señalar que a pesar del uso generalizado a nivel mundial de estas conversiones de biovolumen propuestas en la literatura, sigue existiendo controversia respecto al uso de las mismas por sus problemas metodológicos (Sun & Liu, 2003), tal y como señalan varios trabajos de intercalibración recientes (Rott et al., 2007; Vourio et al., 2007). Estos problemas se relacionan con la demora en la estandarización para dicha metodología (Vadrucci et al., 2007). Por otra parte, a partir de los datos de abundancia y/o biovolumen es posible estimar la biomasa algal (o contenido en carbono celular) aplicando alguna de las transformaciones propuestas por Quinones et al. (2003) o Gaedke et al. (2004), pero estos resultados generan bastante controversia, utilizándose en este estudio la concentración de chl-*a* como estima indirecta de la biomasa.

En cualquier caso, todas estas variables son complementarias y no pueden sustituir los resultados de abundancia en términos de células por unidad de volumen, puesto que tal y como señalaron Lund y Talling en su trabajo clásico de 1957 y que en la actualidad recoge Reynolds (1997), la cuantificación directa bajo microscopio es ventajosa frente a otros métodos indirectos (e.g. citometría de flujo, concentración de clorofila) dado que permite identificar las especies y evaluar su importancia relativa, detectarlas a pesar de una posible escasa presencia, así como la observación de características morfológicas y sus posibles cambios, además de que los datos de abundancia facilitan entre otras cosas el posterior procesado para la obtención de índices de diversidad. Incluso los actuales planes de control de calidad de aguas a nivel europeo (EC, 2000) incluyen como fundamentales dichos descriptores taxonómicos (abundancia) en el caso del nanofitoplancton pelágico.

ANÁLISIS BIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS: OTROS DESCRIPTORES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Otra forma adicional para describir la comunidad fitoplanctónica es a través del cálculo de índices de diversidad, que relacionan entre sí composición, abundancia y distribución de cada una de las especies frente al total.

La primera aproximación a la diversidad de un sistema es la riqueza (S), número total de especies presentes en cada muestra.

El índice de diversidad de Shannon o Shannon-Wiener (H) se basa en la teoría de la información (Shannon & Weaver, 1963) y tiene en cuenta tanto la riqueza de especies (S) como la distribución de cada una de ellas (p_i) respecto al total de individuos de la muestra, y que se expresa del siguiente modo (en bits ind^{-1}):

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$$

Otro índice de diversidad es el de Margalef (H_s), que contempla el total de abundancia (N) frente al número total de especies o riqueza (S), y cuya expresión es (en bits ind^{-1}):

$$H_s = \frac{\log N}{S-1}$$

Por otra parte, la equitatividad (E) relaciona la importancia relativa de cada especie en relación al total en términos de abundancia (diversidad de Shannon H) y el teórico máximo de diversidad (H_{\max}) que tiene en cuenta la riqueza (S):

$$E = \frac{H}{H_{\max}}$$

siendo $H_{\max} = \log_2 s$

En el periodo de estudio 1997-98 las abundancias, biovolúmenes y diversidades (calculadas según el índice de Shannon H) se analizaron en tres intervalos de profundidad coherentes con las capas generadas durante la época de estratificación: (1) epilimnion (0.5 y 3 m en junio y julio, agregando 8 m en agosto, 11 m en septiembre de 1998 y mediados de octubre de 1997 y 14 m en noviembre de los dos años, (2) metalimnion-hipolimnion (siempre hasta los 18 m) y (3) parte final de la oxiclina (siempre desde los 19 m). Durante la mezcla

vertical (diciembre – mayo) se agruparon de 0-10 m, 11-18 m y 19-24 m (capítulo 5).

Respecto a los bioensayos de 2003-04 se compararon las respuestas de todas las variables analizadas (concentración de chl-*a*, abundancia, biovolumen, índices de diversidad) tras la adición de nutrientes frente a la no adición (estado natural de las aguas) en diferentes profundidades y estaciones (capítulos 6 y 7). La metodología específica de estas experiencias de enriquecimiento se detalla en el capítulo 6.

En cuanto a los análisis estadísticos de los datos obtenidos en este estudio se ha utilizado el paquete estadístico SPSS 19.0. Los resultados correspondientes al periodo 1997-98 se incluyeron dentro de un análisis de componentes principales (PCA) como método multivariante de ordenación (véase capítulo 5). Respecto a los bioensayos realizados en 2003-04 el diseño experimental permitió la realización de análisis de la varianza de una vía (ANOVA) a distintos niveles (concentración de chl-*a*, abundancia algal, etc.) y sus correspondientes test *post-hoc* de Tukey (capítulos 6 y 7).

Estos análisis estadísticos de la varianza (ANOVA) exigen que los datos presenten una distribución normal (normalidad) y homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad), si bien en algunos casos en los que no se cumplieron estos requisitos fue necesario el uso de pruebas no paramétricas (H de Kruskal-Wallis).

En todos los casos en los que se trataron estadísticamente las variables abundancia y biovolumen se normalizaron los datos aplicando la transformación $\ln(x+1)$, siendo x el número de individuos (o tamaño) por unidad de volumen de cada especie.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LA LAGUNA DE EL TEJO

A continuación se detallan y discuten los resultados para las variables físicas y químicas obtenidas con carácter mensual en la Laguna de El Tejo a lo largo del periodo de muestreo comprendido entre septiembre de 1997 y diciembre de 1998. Dicha caracterización limnológica de la masa de agua supone la base primordial para entender el funcionamiento ecológico de este sistema, y en concreto el establecimiento y desarrollo de la comunidad pelágica fitoplanctónica, principal objetivo de la presente tesis.

REGISTROS METEOROLÓGICOS

El conjunto de variables meteorológicas registradas en torno al área de estudio, tales como temperatura ambiental y precipitaciones, son necesarias en la caracterización del funcionamiento de la masa de agua. Dichos parámetros ambientales fueron recogidos por varias estaciones meteorológicas instaladas en la zona, gestionadas por la AEMET (Agencia Estatal de Meteorología) que pertenece al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España. Los datos que presentamos a continuación fueron cedidos por dicho organismo (AEMET: www.aemet.es) y corresponden a las estaciones meteorológicas de Cuenca y Cañada del Hoyo-Las Lagunas, las cuales fueron

seleccionadas por su cercanía a la zona de estudio así como por la existencia de registros completos en el periodo 1997-98 (Tabla 4.1).

El registro histórico de temperaturas de la estación meteorológica de Cuenca nos indica a través de las medias mensuales de temperatura para el periodo 1955-98 que en la zona de estudio los veranos son calurosos y los inviernos fríos, características típicas del clima mediterráneo continentalizado (Fig. 4.1). Así mismo, los periodos de lluvias se concentraron habitualmente en otoño y primavera, siendo verano e invierno estaciones secas. Tal y como se observa en el diagrama ombroclimático de la figura 4.1, la intersección de las líneas correspondientes a ambas variables (temperatura y precipitaciones) muestra que el periodo seco abarca principalmente de mediados de junio a agosto. Una aproximación más detallada a los registros meteorológicos históricos en esta zona y su relación con el sistema lagunar de Cañada del Hoyo se puede consultar en Sendra (2009).

Tabla 4.1. Situación, tipo de estación y periodo de registro de las estaciones meteorológicas de Cañada del Hoyo (Las Lagunas) y Cuenca.

Table 4.1. Location, station type and record period in Cañada del Hoyo (Las Lagunas) and Cuenca weather stations.

Station	Type	Longitude	Latitude	Altitude (m)	Register
C. del Hoyo - Las Lagunas	Thermometric and rainfall	1°52'37''	39°59'20''	1032	1990-1998
Cuenca	Compleat	2°08'17''	40°04'	935	1955-1998

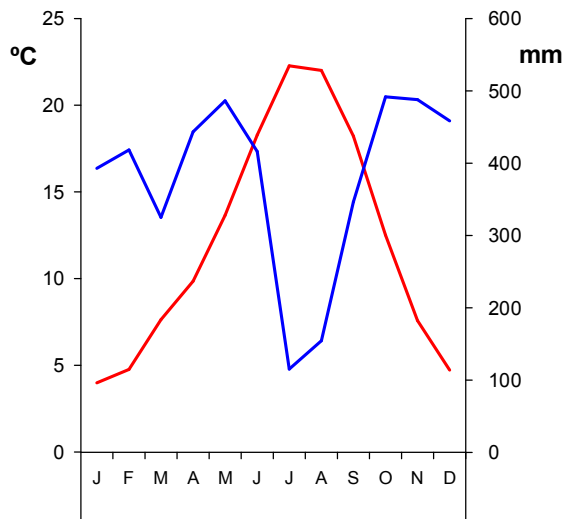


Figura 4.1. Diagrama ombroclimático con las temperaturas medias mensuales (línea roja) y las precipitaciones medias mensuales (línea azul) registradas por la estación meteorológica de Cuenca en el periodo 1955-1998.

Figure 4.1. Ombroclimatic diagram with monthly average temperatures (red line) and monthly average rainfall (blue line) recorded in Cuenca weather station along 1955-1998.

Basándonos en los registros de la estación meteorológica de Cañada del Hoyo (Las Lagunas) se ha profundizado en las condiciones climáticas del área de estudio durante el periodo 1997-98. De modo global los resultados para la temperatura media indican que el año 1997 fue más cálido que 1998 (Tabla 4.2), si bien es cierto que respecto a las medias mensuales el verano de 1998 presentó mayores temperaturas medias que los mismos meses del año 1997 (Sendra, 2009).

Tabla 4.2. Temperatura media anual, media de las temperaturas máximas y mínimas absolutas, y temperaturas medias máximas y mínimas registradas por la estación meteorológica de Cañada del Hoyo (Las Lagunas) en los años 1997 y 1998.
Table 4.2. Annual average temperature, absolute maxima and minima mean temperatures, and maxima and minima temperatures, recorded in Cañada del Hoyo (Las Lagunas) weather station in 1997 and 1998.

	annual	abs-max.	max.	abs-min.	min.
1997	12,24	24,81	19,20	-1,97	5,31
1998	11,18	24,90	19,46	-2,51	3,76

Respecto a las precipitaciones recogidas en el área de estudio, podemos observar que hubo mayor regularidad en 1997, siendo éstas más abundantes durante los meses de invierno de 1997 (Fig. 4.2). Por otra parte, en 1998 la mayor cantidad de lluvia se registró durante la primavera, hecho que constata que el patrón de precipitaciones fue diferente comparando ambos años. La pluviosidad total fue de 665 L m⁻² en 1997 y 415 L m⁻² en 1998.

La ocurrencia de un patrón de lluvias en un área es de gran interés para conocer el funcionamiento hidrológico de los sistemas lénticos y en particular en este tipo de lagunas cársticas, puesto que por su morfología y situación los aportes se ven limitados a este tipo de precipitaciones directas en periodos de lluvia y a las recargas que proceden del acuífero local.

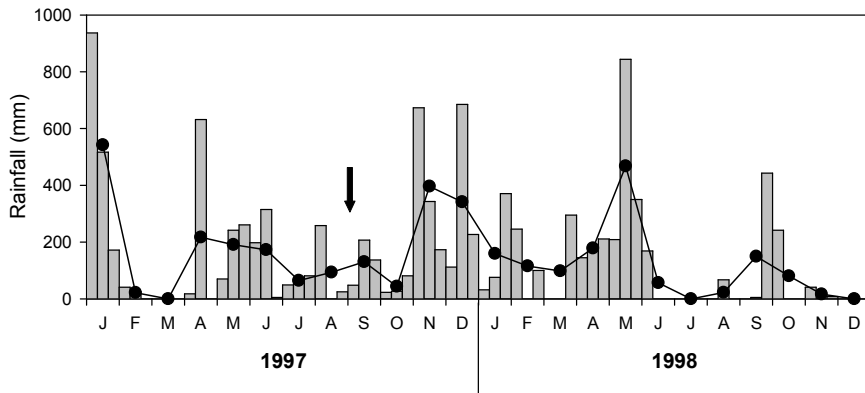


Figura 4.2. Precipitaciones (mm) acumuladas cada 10 días (barras grises) y precipitación media mensual (línea negra) registradas por la estación meteorológica de Cañada del Hoyo (Las Lagunas) durante 1997 y 1998. La flecha negra indica el momento de inicio de las campañas de muestreo en la Laguna de El Tejo.

Figure 4.2. Ten-days accumulated rainfall (mm; grey bars) and mean monthly rainfall (black and dotted line) recorded in Cañada del Hoyo (Las Lagunas) weather station in 1997 and 1998. Black arrow indicates the beginning of sampling events in Lake El Tejo.

MORFOMETRÍA (BATIMETRÍA)

Como paso previo al estudio limnológico de la Laguna de El Tejo se realizó una aproximación batimétrica del sistema, midiendo los distintos diámetros en profundidad a lo largo de los ejes Norte-Sur (N-S) y Este-Oeste (E-W). Dichos perfiles se han esquematizado en la figura 4.3, donde observamos que la forma del vaso es de cono y/o tronco-cono invertido, con paredes de fuertes pendientes y de marcada profundidad en relación con el diámetro superficial. Esta forma se relaciona con un colapso en este sistema cárstico (véase descripción detallada de estos fenómenos en el *Capítulo 2: Lugar de estudio*).

Al inicio de las campañas de muestreo (septiembre de 1997) se tomaron las pertinentes medidas para el cálculo de la superficie y el volumen de la laguna. El

eje mayor fue el de dirección Norte-Sur (145 m) y el eje menor el de dirección Este-Oeste (132 m), lo que indica que la superficie no es estrictamente circular. Con la media de ambos diámetros y aproximando la figura a un círculo se calculó un área en superficie de unos 15066 m². Por otra parte, teniendo en cuenta la forma geométrica del tronco de cono y las medias de todos los diámetros en profundidad, se obtiene que dicho vaso contiene un volumen de agua de unos 212008 m³. Los primeros registros realizados en esta laguna en los años 1980-81 por E. Vicente y M.R. Miracle (comunicación personal) señalaron que la profundidad máxima era de 32 m y el diámetro mayor de 147 m, que comparando con los datos tomados en 1997 indica que esta laguna ha sufrido un fuerte descenso de nivel.

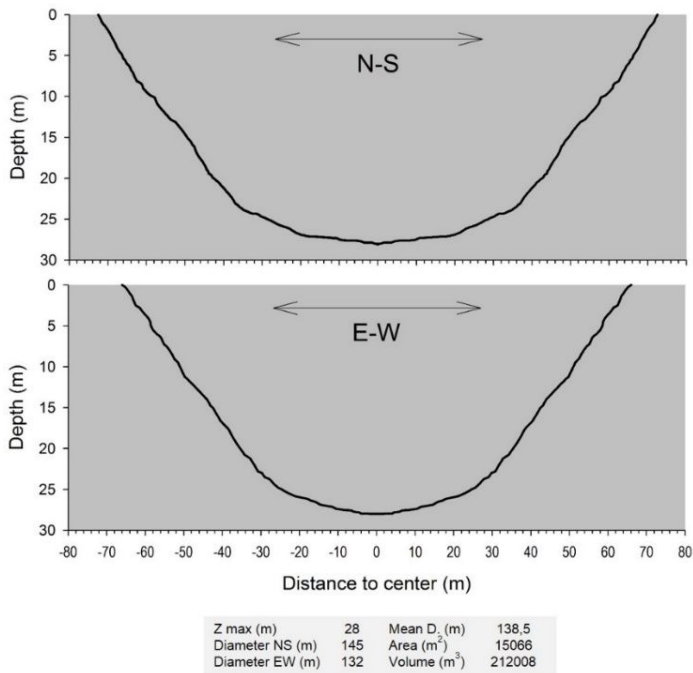


Figura 4.3. Esquema del perfil en profundidad respecto a los ejes Norte-Sur (N-S) y Este-Oeste (E-W) y datos morfométricos de la Laguna de El Tejo en 1997.

Figure 4.3. Schematic depth profile related to North-South (N-S) and East-West (E-W) axis and morphometric data for Lake El Tejo in 1997.

ESTRATIFICACIÓN Y MEZCLA TÉRMICA

En el presente apartado se detallan los perfiles de temperatura obtenidos en las aguas de la Laguna de El Tejo, preludeo a la caracterización limnológica completa de este sistema acuático. En este sentido, es interesante prestar atención al establecimiento y evolución en el tiempo de gradientes de temperatura en profundidad, puesto que determinan las épocas de estratificación y mezcla de aguas de la laguna.

Durante el ciclo limnológico 1997-98 en la Laguna de El Tejo se inició el establecimiento de un gradiente de temperatura entre la superficie y el fondo a mediados de mayo de 1998 (termoclina: zona definida entre capas separadas un metro que presentan entre ellas y en profundidad un descenso de temperatura superior a 1°C), gradiente que en los meses sucesivos se fue incrementando en amplitud simultáneamente a su profundización conforme iba avanzando la estación (Fig. 4.4). Estas variaciones diferenciales de temperatura permitieron una estratificación térmica vertical, alcanzando máximos superficiales de 23-25°C durante el estío y con mínimos de 6°C en las aguas hipolimnéticas. En otoño, la ruptura de gradientes de temperatura marcó el inicio de la mezcla completa de aguas, con mínimos de 5-6 °C en toda la columna de agua a lo largo de la época invernal.

Al inicio de la primavera los gradientes de temperatura fueron más susceptibles de desestabilización ante la presencia de condiciones meteorológicas más inestables, como por ejemplo la mayor cantidad de precipitaciones (Fig. 4.2). Sin embargo, la situación de esta laguna encajada en una dolina favoreció que una vez se inició la estratificación térmica vertical las perturbaciones externas (que además disminuyen en intensidad) fueran de menor importancia, y por tanto este periodo de máxima estabilidad se alargó desde finales de primavera hasta

mediados de otoño. Es a partir de otoño cuando de nuevo las perturbaciones externas fluctuantes (aumento de precipitaciones, bajada de temperatura ambiental, disminución de intensidad lumínica y fotoperiodo) desestabilizaron la columna de agua hasta inducir su mezcla. La superficie de la laguna se fue enfriando gradualmente, aumentando así su densidad (véase siguiente apartado) hasta que se produjo un hundimiento progresivo de estas capas, lo que generó corrientes térmicas convectivas que pusieron en circulación las aguas hasta la mezcla total de la columna en invierno. En la Laguna de El Tejo estas corrientes térmicas convectivas parecen ser el factor más importante que explica la mezcla de las aguas (holomixis) debido principalmente a la abrupta morfometría de la laguna, tal y como se ha descrito en otros sistemas similares (Ward et al., 1990; Colomer et al., 2001; Serra et al., 2007).

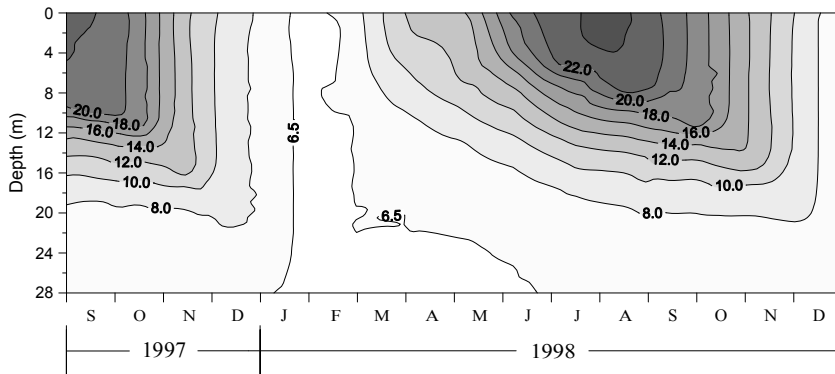


Figura 4.4. Isolíneas de temperatura (°C) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.4. Time-depth temperature isopleths (°C) from September 1997 to December 1998.

ESTRUCTURA FÍSICA DE LA COLUMNA DE AGUA:

DENSIDAD Y ESTABILIDAD

El calentamiento diferencial de las capas de agua descrito anteriormente se relaciona estrechamente con el establecimiento de acusados gradientes de densidad en profundidad, determinando así la estructura física de la columna de agua, que en último término tiene implicaciones en la distribución y dinámica de los organismos del plancton.

La densidad del agua obedece a una correlación entre temperatura y concentración de solutos disueltos. En nuestro caso, se ha tomado la conductividad como aproximación a la concentración de solutos en el agua. Dicha interacción entre temperatura y conductividad en el caso de la Laguna de El Tejo muestra que la distribución espacio-temporal de la densidad del agua siguió un patrón idéntico al de la temperatura, si bien no fue tan marcado en el caso de la conductividad (Figs. 4.4 y 4.5) y por tanto la estratificación fue térmica y no por el contenido en sales.

A mediados de primavera el aumento gradual de la temperatura superficial del agua llevó aparejado un descenso en su densidad, de modo que las aguas se estructuraron desde capas de agua superficiales más calientes hasta capas paulatinamente más frías y densas que se fueron confinando en profundidad. Tal y como se comentó en el anterior apartado, en la Laguna de El Tejo este estado estratificado de las aguas se extendió de mediados de primavera a principios de otoño, situación que se ve favorecida por la morfología circular y profunda de esta laguna (Mazumder & Taylor, 1994).

En otoño se produjo un progresivo descenso de la temperatura de las aguas superficiales unido a un aumento en densidad que tuvo como consecuencia el

hundimiento de esas capas, y que junto a la fuerza mecánica procedente de fenómenos meteorológicos más activos en esta época (vientos, precipitaciones) supuso la dilución de gradientes y la ruptura de la estratificación. Así mismo, esta mezcla puso en circulación agua profunda que había aumentado su carga en solutos durante la estratificación ($>520 \mu\text{S cm}^{-1}$ en el hipolimnion frente a $\sim 490 \mu\text{S cm}^{-1}$ en el epilimnion), de modo que en la época invernal la columna de agua fue isoterma ($\sim 5^\circ\text{C}$) e isohalina ($\sim 500 \mu\text{S cm}^{-1}$).

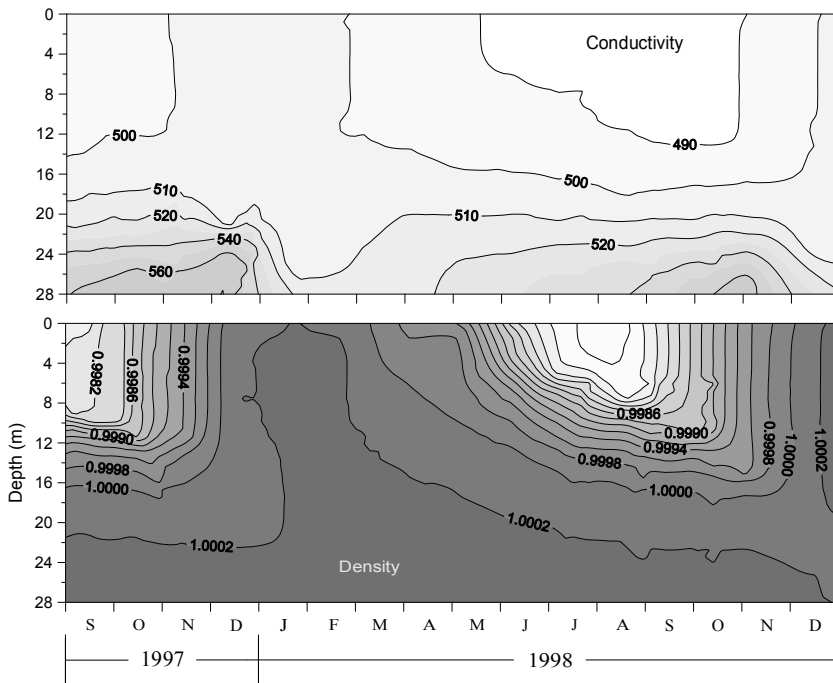


Figura 4.5. Isolíneas de conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$) y densidad del agua en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.5. Time-depth conductivity isopleths ($\mu\text{S cm}^{-1}$) and water density from September 1997 to December 1998.

Los cambios espacio-temporales de las distintas variables descritas se relacionan directamente con modificaciones en la estabilidad y que resultarán de interés en posteriores capítulos para entender el funcionamiento de las poblaciones algales en este sistema acuático (e.g. Ghosal et al., 2000). Es por ello que se calculó la estabilidad usando la frecuencia de Brunt-Väisälä, que es la estabilidad media integrada de la columna de agua para cada muestreo (véase *Capítulo 3: Material y metodología analítica general*). Los valores obtenidos confirman que la mayor estabilidad en la laguna correspondió al periodo de estratificación térmica vertical, aumentando la inestabilidad durante la mezcla invernal (Fig. 4.6), como era de esperar.

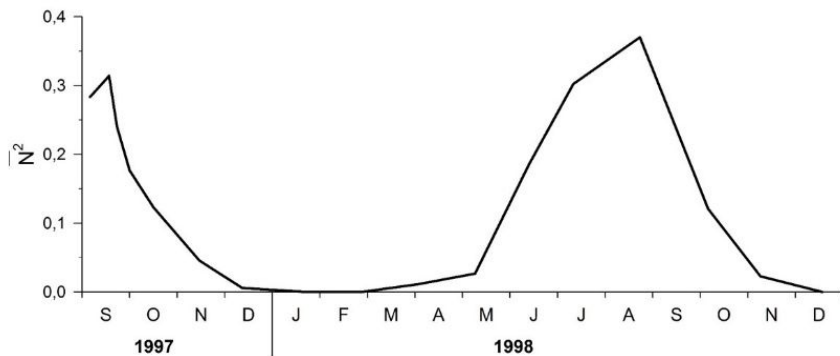


Figura 4.6. Estabilidad media integrada (min^{-2}) de la columna de agua desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.6. Mean integrated stability (min^{-2}) in water column from September 1997 to December 1998.

OXÍGENO DISUELTO

La concentración de oxígeno disuelto en el agua sigue un patrón espacio-temporal que depende tanto de condicionantes físicos (temperatura, densidad) como biológicos (producción, respiración). En cuanto a la dinámica estructural de la Laguna de El Tejo, la interacción de esta variable con otras como la temperatura determinó el establecimiento de tres zonas bien diferenciadas en la columna de agua durante el periodo de estratificación estival:

- Epilimnion, aguas superficiales cálidas y oxigenadas tanto por difusión como por producción.
- Metalimnion, aguas de la zona correspondientes al marcado gradiente de temperatura en profundidad (termoclina).
- Hipolimnion, aguas profundas frías y anóxicas.

Durante la estratificación térmica de la Laguna de El Tejo los máximos de oxígeno disuelto se localizaron en la parte superior de la termoclina, variando su posición desde 6 m a principios de junio hasta los 13 m a finales de septiembre de 1998 (Fig. 4.7). Por otra parte, la profundidad de extinción de oxígeno se situó a 22.5 m a mediados de mayo, ascendiendo a 20 m a finales de septiembre, interfase óxico-anóxica que marcó el límite del hipolimnion profundo.

Comparando el final de la estratificación y la mezcla otoñal de 1997 y 1998 se observa que las condiciones fueron algo diferentes: en septiembre de 1997 la temperatura epilimnética fue un par de grados más alta que en septiembre de 1998, empezando la termoclina y la interfase óxico-anóxica medio metro más arriba respecto a lo que sucedió el año siguiente. Así mismo, el máximo metalimnético de oxígeno fue mucho menor y restringido a un intervalo de profundidades también menor en 1998. En la cercana Laguna de La Cruz se

produjo la misma situación durante los mismos periodos (Sendra, 2009), debido posiblemente a un retardo en la estabilización de la termoclina consecuencia de las fuertes precipitaciones registradas durante la primavera de 1998 y que no se produjeron en 1997 (Fig. 4.2).

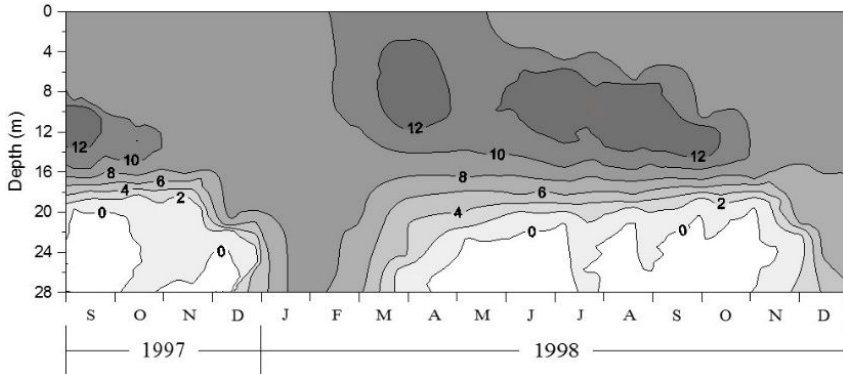


Figura 4.7. Isolíneas de concentración de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.7. Time-depth dissolved oxygen isopleths (mg L^{-1}) from September 1997 to December 1998.

Como argumentaremos en el siguiente capítulo, los máximos metalimnéticos de oxígeno disuelto se correspondieron con zonas de máximos de densidad nanofitoplanctónica (Fig. 5.1), y por lo tanto se relacionan con una mayor actividad fotosintética oxigénica unida a una acumulación de oxígeno fruto de la restricción en su difusión cuando la columna de agua se encontraba fuertemente estratificada y estable. Así mismo, este incremento en la actividad fotosintética fue la causa del aumento del pH detectado en la zona oxigénica durante la estratificación (Fig. 4.8) y, como veremos en el apartado de mineralización, siendo esto consecuencia del desplazamiento en el equilibrio de los carbonatos durante la fotosíntesis.

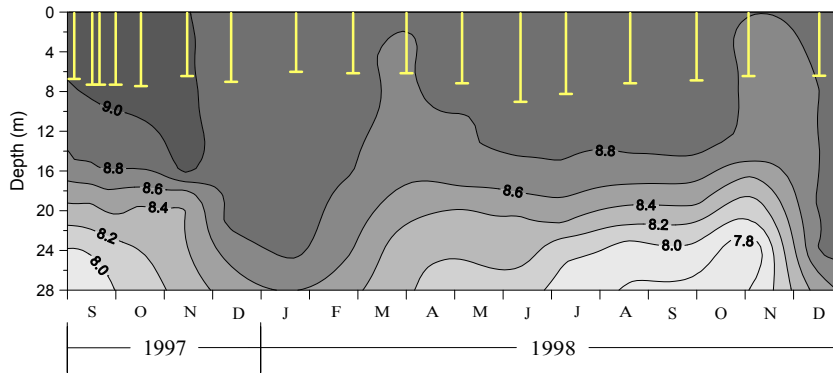


Figura 4.8. Isolíneas de pH en el perfil vertical y profundidad de desaparición del disco de Secchi (líneas superiores verticales) desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.8. Time-depth pH isopleths and Secchi depth (up and vertical lines) from September 1997 to December 1998.

ESTRUCTURA FÍSICA Y RADIACIÓN

En un sistema acuático es de interés conocer el porcentaje de radiación del espectro lumínico que alcanza cada profundidad, por su importancia respecto a la actividad de los organismos fotosintéticos, además de condicionar la estructura física del sistema.

En la Laguna de El Tejo la radiación fotosintéticamente activa (PAR) alcanzó mayores profundidades durante la estratificación que en periodos de mezcla invernal (Fig. 4.9). Como detallaremos en el apartado de los nutrientes, durante la estratificación el fitoplancton agotó los nutrientes en el epilimnion, disminuyendo la abundancia algal y aumentando así la transparencia. Dicho incremento en la transparencia de las aguas durante el estío también se reflejó en una mayor profundidad en cuanto a la desaparición del disco de Secchi (Fig. 4.8).

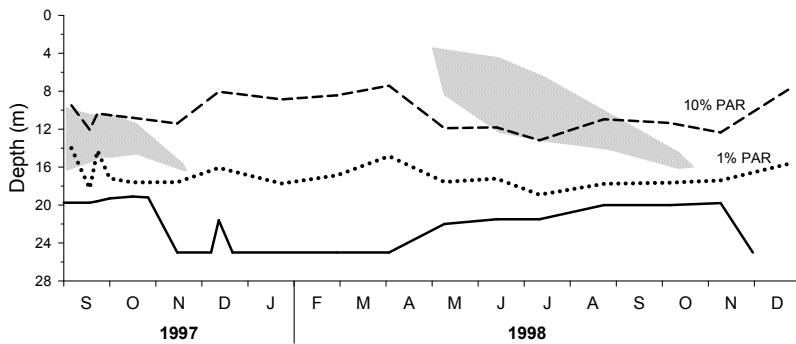


Figura 4.9. Amplitud de la termoclina (zona sombreada), interfase óxico-anóxica (línea continua) y su relación con el 10% y el 1% de la PAR (línea discontinua y línea punteada respectivamente) desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.9. Thermocline breath (shaded area) and oxic-anoxic interface (solid line) related to 10% and 1% of photosynthetic active radiation-PAR (dashed and dotted line respectively) from September 1997 to December 1998.

Dejando a un lado la relación de la PAR con la actividad de organismos fotosintéticos (y que se discutirá en los capítulos siguientes), es interesante la comparación entre la zona eufótica ($Z_{eu} = 1\%$ de la PAR) y la zona de profundidad de mezcla de la columna (Z_m) por su implicación con la estructura física del sistema. En esta laguna durante la estratificación estival la profundidad de mezcla de la columna de agua (Z_m) se fue incrementando paulatinamente conforme avanzaba dicho periodo de estratificación (Fig. 4.10), mientras que la amplitud de la zona eufótica fue disminuyendo gradualmente.

La relación de estos parámetros con la estructura física de la columna de agua es determinante si se compara la razón $Z_m:Z_{eu}$ con la media integrada de la estabilidad, observándose que el comportamiento de ambas fue inverso (Fig. 4.11). La razón $Z_m:Z_{eu}$ presentó los mayores valores a lo largo de la mezcla invernal dado que en ese periodo la profundidad de mezcla de la columna de agua fue la máxima, mientras que la inestabilidad presente en el medio durante el

invierno fue expresada a través de los mínimos valores para la frecuencia de Brunt-Väisälä, como era lógico esperar.

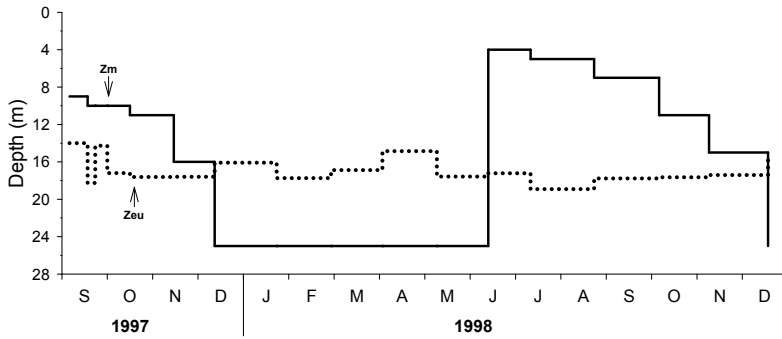


Figura 4.10. Profundidad de mezcla de la columna de agua (Zm: línea continua) y profundidad de la zona eufótica (Zeu: línea punteada) desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.10. Mixing depth (Zm: solid line) and euphotic depth (Zeu: dotted line) from September 1997 to December 1998.

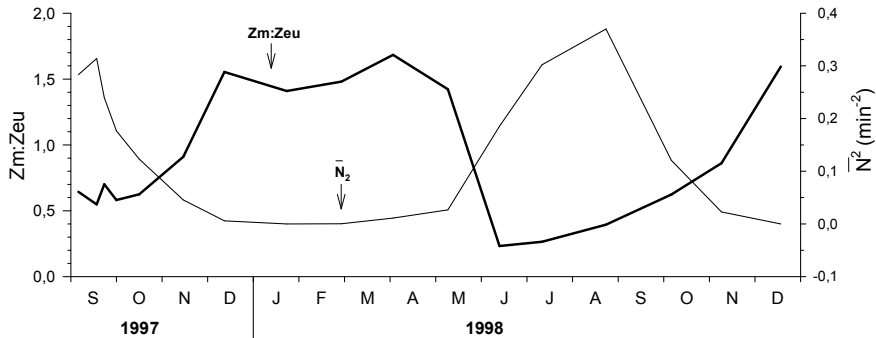


Figura 4.11. Razón Zm:Zeu (línea continua en negrita) y estabilidad (línea continua) desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.11. Zm:Zeu ratio (bold solid line) and stability (solid line) from September 1997 to December 1998.

MINERALIZACIÓN

La mineralización en un medio acuático supone la base para caracterizar químicamente el sistema, en contraposición a las variables de los apartados anteriores que se refieren fundamentalmente a la estructuración física de la masa de agua tanto a escala espacial como temporal.

Aún referida previamente, la conductividad forma parte de este apartado puesto que muestra el comportamiento de la totalidad de moléculas conductivas disueltas, la concentración total de solutos (Fig. 4.5). En el caso de la Laguna de El Tejo, y tal y como se comentó para la densidad del sistema, conductividad y temperatura mostraron patrones similares; por tanto, es posible señalar que en esta laguna se produjo una ‘estratificación’ química estival, con marcados gradientes en profundidad, seguida de una mezcla invernal hasta que la columna se tornaba de carácter isohalino.

Respecto a los componentes principales de la mineralización de las aguas, la alcalinidad total da idea del equilibrio carbonatos-bicarbonatos (Fig. 4.12), indicando la importancia de los bicarbonatos en esta laguna. Nótese que a partir de este apartado las figuras de isolíneas corresponden a las muestras puntuales tomadas para análisis químicos a lo largo del perfil vertical y por tanto no aportan tanta resolución al ser representadas, en comparación con las figuras de isolíneas anteriores relativas a los registros de parámetros físicos y químicos con mayor precisión, es decir, realizando medidas cada metro (en algunos casos incluso centímetros) con las diferentes sondas a lo largo del eje vertical.

Durante la estratificación la actividad fotosintética indujo el desplazamiento del equilibrio de los carbonatos al aumentar el consumo de CO₂ disuelto, lo que se tradujo en una bajada del pH (Fig. 4.8). Esto fue coincidente con los máximos metalimnéticos de oxígeno (y a su vez con los máximos de densidad de nanofitoplancton; véase *Capítulo 5: Composición y dinámica poblacional del fitoplancton en la Laguna de El Tejo*).

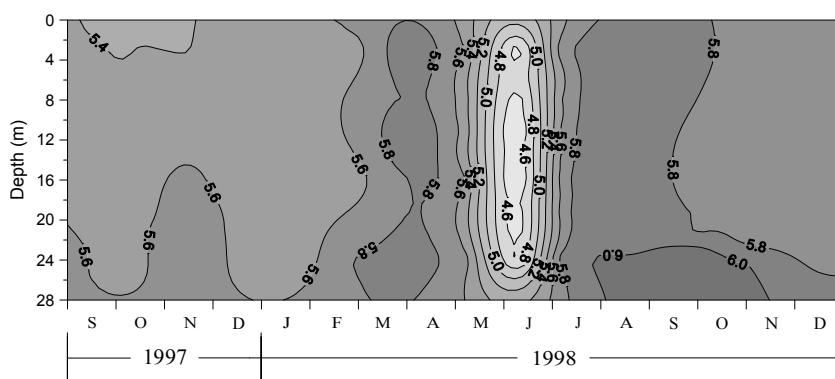


Figura 4.12. Isolíneas de alcalinidad (meq L⁻¹) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.12. Time-depth alkalinity isopleths (meq L⁻¹) from September 1997 to December 1998.

Otros iones de importancia en la Laguna de El Tejo fueron los cloruros, y en menor medida los sulfatos (Fig. 4.13), coincidiendo sus mayores concentraciones con periodos de lluvia (Fig. 4.2).

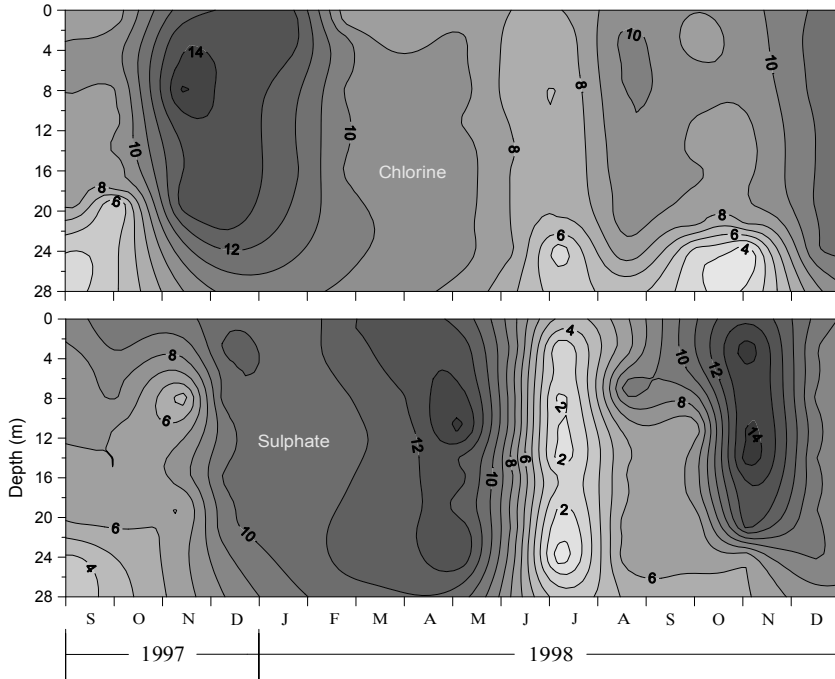


Figura 4.13. Isolíneas de cloruros y sulfatos (μM) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.13. Time-depth chlorine and sulphate isopleths (μM) from September 1997 to December 1998.

NUTRIENTES

El estudio sobre la disponibilidad de los nutrientes inorgánicos en un sistema acuático es imprescindible para conocer la dinámica de las poblaciones de los productores primarios planctónicos (PPP) que sustentan el medio (e.g. Elser et al., 1990), constituyendo uno de los principales objetivos de la presente investigación (*Capítulos 6 y 7: Evaluación experimental in situ de la limitación por nutrientes*). En aquellos lagos donde el control sobre el crecimiento de los PPP depende básicamente de la limitación por nutrientes, la dinámica del

plancton se correlaciona en su mayoría con los mecanismos internos de reciclado de dichas sustancias (Sommer, 1988) y por los aportes externos.

Habitualmente los nutrientes inorgánicos que se tienen en cuenta como parte de la caracterización química de una masa de agua son las distintas formas de nitrógeno inorgánico (nitratos, nitritos y amonio), el fósforo inorgánico y los silicatos (esenciales para el metabolismo de las diatomeas). Como veremos a continuación, dichos nutrientes presentaron importantes variaciones a lo largo del ciclo anual así como en el perfil vertical en esta laguna profunda.

Silicatos

El silicato soluble (SRSi) constituye un nutriente de interés por su relación directa con el desarrollo y crecimiento del grupo algal de las diatomeas. En la Laguna de El Tejo la mayor concentración de silicatos ($>20 \mu\text{M}$) se detectó en el hipolimnion durante la época de estratificación (Fig. 4.14). Estas altas concentraciones se pueden relacionar en cierta medida con la redisolución de silicatos de los frústulos de diatomeas sedimentados en el fondo anóxico, lo que supone el reciclado de este nutriente en la laguna, tal y como sucede en la cercana Laguna de La Cruz (Rodrigo, 1997; Sendra, 2009). Como detallaremos en los capítulos siguientes, las diatomeas suelen ser las dominantes en la comunidad fitoplanctónica de este sistema acuático.

El silicato soluble confinado en aguas hipolimnéticas a lo largo de la estratificación fue puesto en circulación durante la mezcla otoñal, con el consiguiente agotamiento del mismo por parte de las diatomeas en otoño e invierno, las cuales ven favorecido su desarrollo en esa época (e.g. Reynolds,

1997), observaciones que serán discutidas en los siguientes capítulos relativos a las dinámicas del fitoplancton de esta laguna.

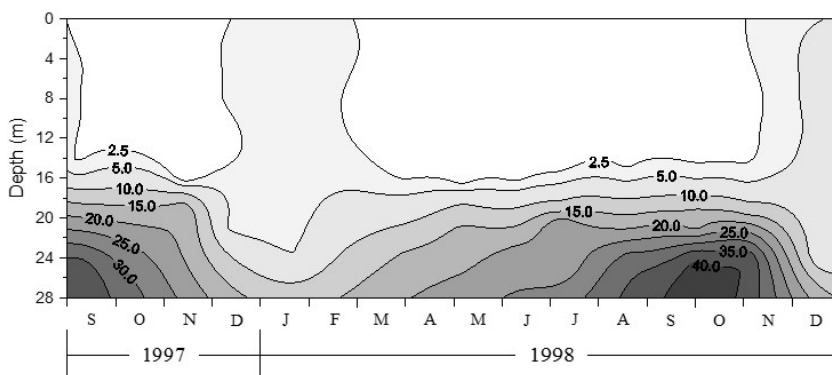


Figura 4.14. Isolíneas de silicatos solubles (μM) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.14. Time-depth silicate isopleths (μM) from September 1997 to December 1998.

Fósforo

En la Laguna de El Tejo la concentración de fósforo reactivo soluble (SRP) varió desde valores indetectables hasta valores de $0.20 \mu\text{M}$ (Fig. 4.15). El aumento de concentración de SRP en la columna de agua a mediados de primavera de 1998 posiblemente fue debido a los aportes que provienen de las intensas precipitaciones registradas en este periodo (Fig. 4.2). Fue en esta época cuando la presencia de SRP en el epilimnion unida al aumento de calidad-cantidad de luz tuvieron como consecuencia un remarcable desarrollo algal promoviendo un agotamiento de dicho nutriente, tal y como discutiremos en el capítulo siguiente en relación con la dinámica del fitoplancton. Durante el estío, los PPP consumieron y agotaron los nutrientes en el epilimnion, con el consecuente

descenso en abundancia algal en superficie, que a su vez evitó un efecto de sombra en el eje vertical favoreciendo así el crecimiento de organismos en zonas inferiores (Christensen et al., 1995). Con la mezcla invernal se pusieron en circulación los nutrientes de las aguas hipolimnéticas acumulados por la mineralización durante la estratificación, junto a los aportes provenientes de las precipitaciones otoñales, época en la cual los PPP volvieron a agotar el fósforo inorgánico (P).

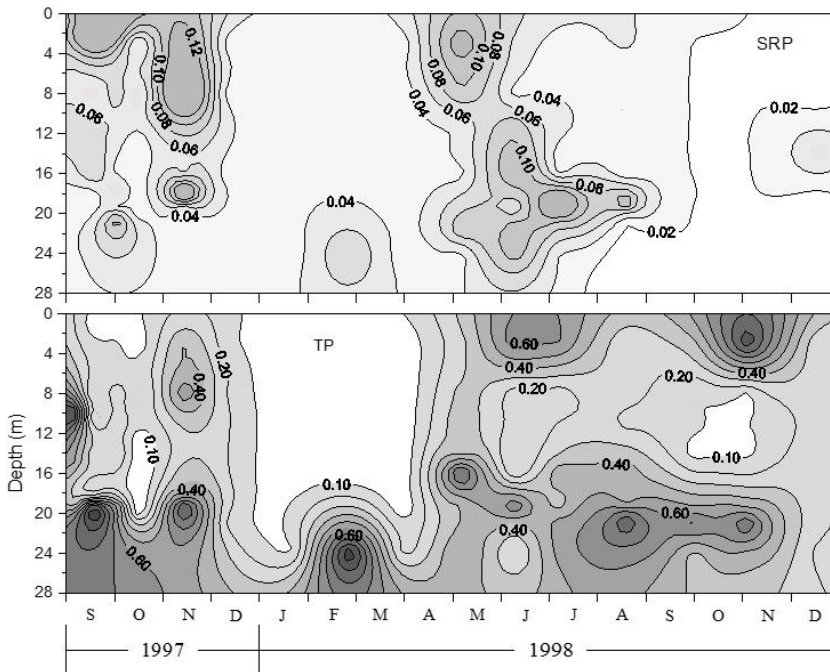


Figura 4.15. Isolíneas de fósforo reactivo soluble (SRP; μM) y fósforo total (TP; μM) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.15. Time-depth soluble reactive phosphorous (SRP) and total phosphorous (TP) isopleths (μM) from September 1997 to December 1998.

A la luz de estos resultados para el periodo de estudio 1997-98 la limitación del crecimiento algal en la Laguna de El Tejo en ciertas épocas y/o profundidades pudo deberse al P. La limitación por P para el desarrollo del fitoplancton en sistemas acuáticos de aguas templadas ha sido referida en multitud de trabajos (Schindler, 1977; Smith, 1979; Heyman & Lundgren, 1988; Capblanc, 1990; Sterner, 2008), y en especial en el epilimnion durante la estratificación estival, donde la disponibilidad lumínica es mayor que en aguas profundas (e.g. Konopka, 1989), tal como hemos detectado en la Laguna de El Tejo. Los reservorios de P en los sistemas acuáticos son los procedentes de la acumulación en el hipolimnion y de los aportes desde los sedimentos, lugar donde se acumulan los compuestos insolubles de P que proceden de la columna de agua, dependiendo su disponibilidad de las concentraciones de calcio y hierro en el medio, ya que se trata de los elementos que secuestran los ortofosfatos por adsorción y/o formando compuestos insolubles (e.g. Nürnberg 1987). Desde el sedimento es posible la liberación de P inorgánico en condiciones de pH ligeramente ácido y anoxia, lo que sucede en el hipolimnion durante la estratificación de la laguna. Es en la zona de transición óxico-anóxica donde se producen transferencias de este P a la zona óxica, tanto en forma soluble o en forma de P orgánico por parte de los microorganismos de la zona; ciertos estudios (e.g. Bañeras & García-Gil, 1996) demuestran que en esa zona de transición las bacterias fotosintéticas presentan una alta tasa de incorporación de ortofostatos, estableciéndose como secuestradoras del mismo y por tanto reduciendo su tasa de difusión hacia aguas más superficiales. Tal y como describiremos en los siguientes capítulos, es justo en esta zona profunda durante la estratificación donde se detectó abundancia de picocianobacterias autótrofas (APC) que además de su alta eficiencia en la incorporación de nutrientes presentan pigmentos accesorios como la ficoeritrina que les permiten un aprovechamiento eficaz de la escasa luz que alcanza dichas profundidades (e.g. Schallenberg & Burns, 2001; Camacho et al., 2003b).

En cuanto al fósforo total (TP), se registraron máximos en el epilimnion durante la estratificación y que disminuyeron con el avance del verano (Fig. 4.15). Este TP se relaciona directamente con los datos que se obtuvieron en cuanto a densidad del nanofitoplancton y de las APC, así como con la concentración de chl-*a* (véase capítulo 5), siendo posible considerar la concentración de TP como medida de la biomasa. Además, la elevada concentración de TP detectada en las capas inferiores de la columna de agua durante la estratificación estival se puede relacionar en cierta medida con la acumulación de organismos que sedimentaron y que provenían de estratos superiores en la columna de agua, junto a la elevada densidad de las APC y de otras bacterias fotosintéticas, tal y como sucedió en la cercana Laguna de La Cruz (Picazo, 2002; Camacho et al., 2003c; Sendra, 2009).

La fracción de P acumulado en algunos organismos también puede ser de gran importancia para el crecimiento y desarrollo de los PPP (e.g. Guy et al., 1994), estando condicionada la liberación de este P al medio en forma de ortofosfato asimilable a la actividad de las fosfatasas (e.g. Jansson et al., 1988; Bañeras & García-Gil, 1996). Estas enzimas liberadas por los microorganismos planctónicos también actúan sobre las formas de P orgánico, siendo otra fuente de P asimilable, y por tanto las fosfatasas se erigen como el motor del intercambio activo entre la fracción disuelta y la particulada (Jansson, 1988), con lo que resultaría de interés estudiar la actividad de las fosfatasas (APA) en esta laguna.

Nitrógeno inorgánico

Respecto a las formas inorgánicas de nitrógeno (N), la concentración del nitrógeno inorgánico disuelto (DIN) varió considerablemente tanto en el tiempo como en el perfil vertical (Fig. 4.16). En primavera de 1998 presentó valores relativamente altos (5-10 μM) en la zona oxigenada de la columna de agua. Sin

embargo, a mediados de verano el DIN volvió a disminuir a valores menores de $2 \mu\text{M}$ (a excepción de las aguas anóxicas) y permanecieron bajos hasta el final de la estratificación, aunque ligeramente superiores a los del año anterior en las mismas fechas. En otoño de 1998 las concentraciones de DIN fueron mayores respecto a la misma época en 1997 como consecuencia de una mayor acumulación. Estas concentraciones de DIN normalmente excedentarias, al menos en zonas profundas, se debieron principalmente a aportes por parte del acuífero, siendo de origen agrícola (véase capítulo 2), cuyos aumentos se relacionan con los momentos de mayor precipitación atmosférica (Fig. 4.2).

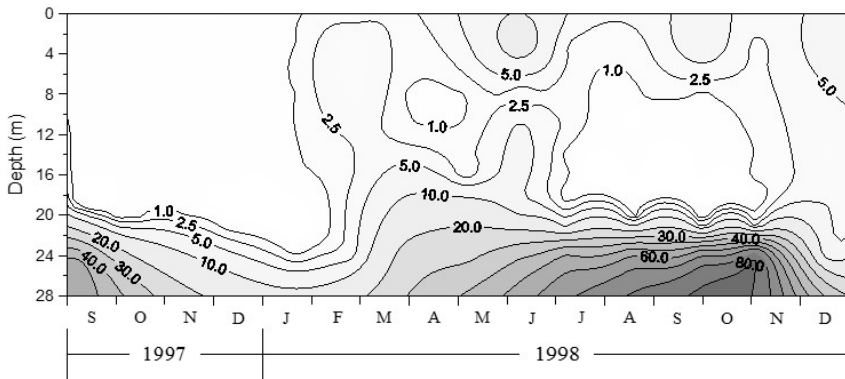


Figura 4.16. Isolíneas de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN; μM) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.16. Time-depth dissolved inorganic nitrogen (DIN) isopleths (μM) from September 1997 to December 1998.

Durante la estratificación térmica, la mayor fracción del DIN correspondió al amonio en el hipolimnion (Fig. 4.17), mientras que en superficie los compuestos de nitrógeno presentaban concentraciones muy bajas. Este cambio en la columna de agua en profundidad fue debido al aumento de amonio por descomposición de la materia orgánica, procesos más activos hacia zonas anóxicas. Por otra parte, es

interesante destacar el intenso agotamiento de amonio en las capas superficiales y medias durante la estratificación estival, consecuencia de un consumo exhaustivo por parte del fitoplancton, dado que el amonio es la forma de nitrógeno energéticamente más favorable para las algas (Reynolds, 1984).

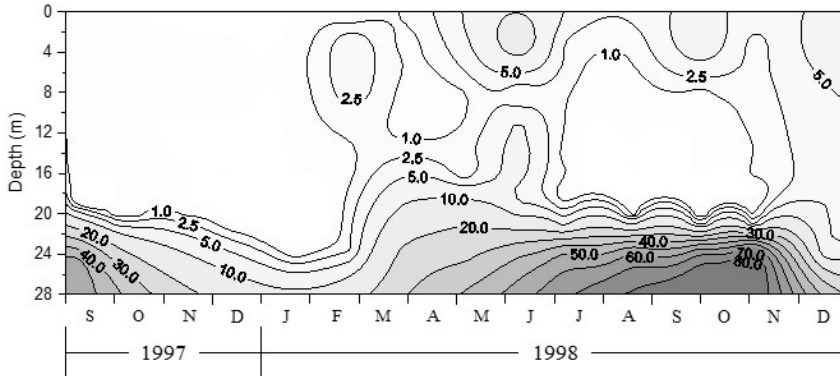


Figura 4.17. Isolíneas de amonio (μM) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 4.17. Time-depth ammonia isopleths (μM) from September 1997 to December 1998.

Respecto a la dinámica de los nutrientes en la Laguna de El Tejo, Camacho et al. (2003c) llevaron a cabo unas experiencias de enriquecimiento de nutrientes en laboratorio con agua de esta laguna en septiembre de 1997, cuyos resultados evidenciaron que posiblemente el N sería el nutriente limitante para los PPP al final de la estratificación estival. Estos resultados, junto a los descritos en este capítulo para los nutrientes en el periodo de estudio 1997-98, revelan que podrían darse cambios en la limitación por nutrientes a escala temporal y/o vertical en este sistema. Es por ello que con objeto de clarificar estas observaciones y conocer en detalle los posibles cambios de limitación por nutrientes para el desarrollo del fitoplancton de esta laguna, se llevaron a cabo una serie de

experiencias de fertilización *in situ* en distintas épocas y profundidades durante el periodo 2003-04, resultados que se exponen y discuten en los capítulos 6 y 7.

En resumen, en este capítulo se han detallado los cambios en la estructura física y en la composición química de la masa de agua de esta laguna profunda teniendo en cuenta las escalas temporal y vertical. Estos condicionantes del medio, con cambios y/o fuertes gradientes en algunos casos, suponen la fuerza principal de regulación de la dinámica de los organismos fitoplanctónicos en este tipo de lagos profundos (e.g. Lindenschmidt & Chorus, 1998; Salmaso, 2003; Moreno-Ostos et al., 2006), tal y como observaremos con la dinámica del fitoplancton en Laguna de El Tejo descrita en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 5

COMPOSICIÓN Y DINÁMICA POBLACIONAL DEL FITOPLANCTON EN LA LAGUNA DE EL TEJO

*Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago
marcadamente estratificado (Morata et al., 2003)*

INTRODUCCIÓN

La incidencia de la estabilidad generada durante la estratificación térmica en lagos profundos sobre los organismos planctónicos ha sido descrita en varios trabajos (e.g. Reynolds, 1992; Miracle et al., 1998; Naselli-Flores et al., 2003; Salmaso, 2003), y en último término implica una estrecha vinculación entre las relaciones tróficas y los factores ambientales. Los lagos cársticos de profundidades relativas muy altas, muestran marcados gradientes verticales de temperatura, con un notable máximo metalimnético de oxígeno resultante de la fotosíntesis algal, generándose en el hipolimnion una oxiclina, en cuya parte inferior se mantienen también altas densidades de fitoplancton. Los estudios en lagos de estas características aportan pues una valiosa información sobre las comunidades fitoplanctónicas que se pueden organizar en el eje vertical luz-nutrientes de la columna de agua. Además, dada la escasez de estudios sobre productores primarios planctónicos (PPP) en lagos de origen cárstico (Planas, 1990), no se han llegado a establecer claramente las asociaciones de especies que se dan en los diferentes estratos y la relación con los diferentes condicionantes ambientales. Si bien existen algunos estudios del fitoplancton en lagos cársticos en la Península Ibérica, la Laguna de La Cruz (Rojo & Miracle, 1987; Dasí &

Miracle, 1991; Sendra, 2009), el Lago de Banyoles (Planas, 1973, 1990), la Laguna del Vilà (García de Emiliani, 1973), el Lago de Montcortés (Camps et al., 1976) y el Lago Grande de Estanya (Ávila et al., 1984), las poblaciones fitoplanctónicas difieren en cuanto a su composición específica y tipología, aunque no en su periodicidad, siendo necesarios más estudios en estos u otros lagos cársticos para determinar las principales relaciones de las comunidades fitoplanctónicas con los procesos de estratificación de las aguas, tan acusados en estos sistemas.

La laguna cárstica de El Tejo es un lago profundo que presenta una marcada estratificación térmica vertical estival y una única mezcla anual. El estudio mensual llevado a cabo en los años 1997-98 tuvo como objeto determinar la composición y dinámica de las poblaciones algales así como su relación con los antedichos factores ambientales, como son los gradientes de temperatura y oxígeno durante su evolución vertical y estacional (capítulo 4), y que condicionan de manera notable la estructuración y sucesión de dichas poblaciones.

RESULTADOS

Abundancia y biovolumen total del nanofitoplancton

Durante el periodo de estudio 1997-98 el total de organismos nanofitoplanctónicos, tanto en abundancia como biovolumen (Fig. 5.1), mostró una estructuración en la columna de agua y en distintas épocas acorde con los momentos de estratificación térmica vertical (Fig. 4.4). Las mayores densidades se registraron en la zona metalimnética a finales de la estratificación estival de 1998 durante un desarrollo masivo de *Cosmarium cf. bioculatum*, mientras que en biovolumen esos máximos se dieron en el epilimnion y el metalimnion durante

plena estratificación estival, debido a la dominancia de grandes dinofíceas, como veremos más adelante. Estos máximos para abundancia y biovolumen del nanofitoplancton fueron coincidentes con los perfiles de oxígeno disuelto (Fig. 4.7) por lo que se relacionan con la actividad fotosintética y acumulación de oxígeno a consecuencia de la restricción de la difusión en aguas fuertemente estratificadas.

Por otra parte, la concentración de chl-*a* (Fig. 5.2) fue relativamente baja y homogénea en toda la columna de agua durante la época invernal y presentó un máximo primaveral en la mayor parte del perfil vertical. En cambio, durante los periodos de estratificación los valores fueron mínimos en el epilimnion pero se localizó un máximo profundo en torno a los 20 m de profundidad (DCM), debido mayoritariamente a una densa población de picocianobacterias autótrofas (APC) en la zona de la oxiclina (Fig. 5.3) y es por ello que la distribución de la chl-*a* no coincidía con la densidad del nanofitoplancton, presentando éste los máximos algo por encima (14-16 m) de los de chl-*a*.

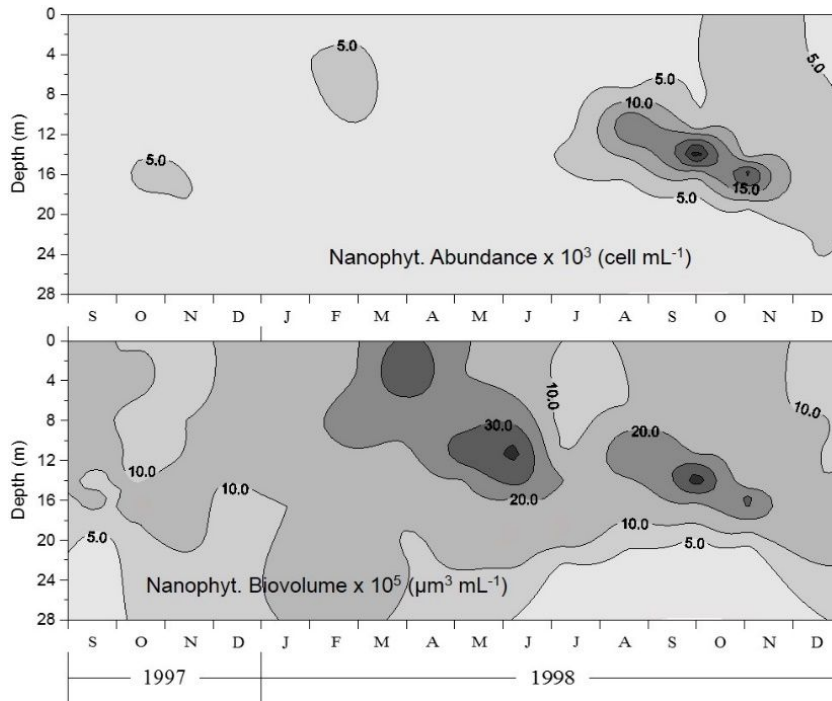


Figura 5.1. Isolíneas de abundancia (gráfica superior) y biovolumen (gráfica inferior) del nanofitoplancton (nanophyt.) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 5.1. Time-depth nanophytoplankton abundance (upper graph) and biovolume (bottom graph) isopleths from September 1997 to December 1998.

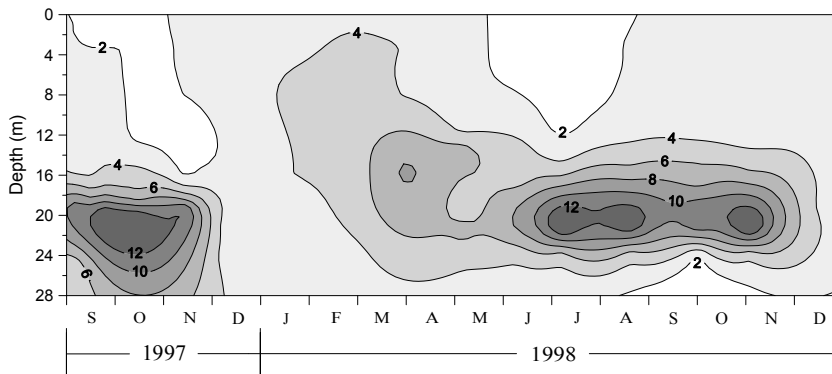


Figura 5.2. Isolíneas de concentración de clorofila *a* (μg L⁻¹) en el perfil vertical desde septiembre de 1997 a diciembre de 1998.

Figure 5.2. Time-depth chlorophyll-*a* concentration isopleths (μg L⁻¹) from September 1997 to December 1998.

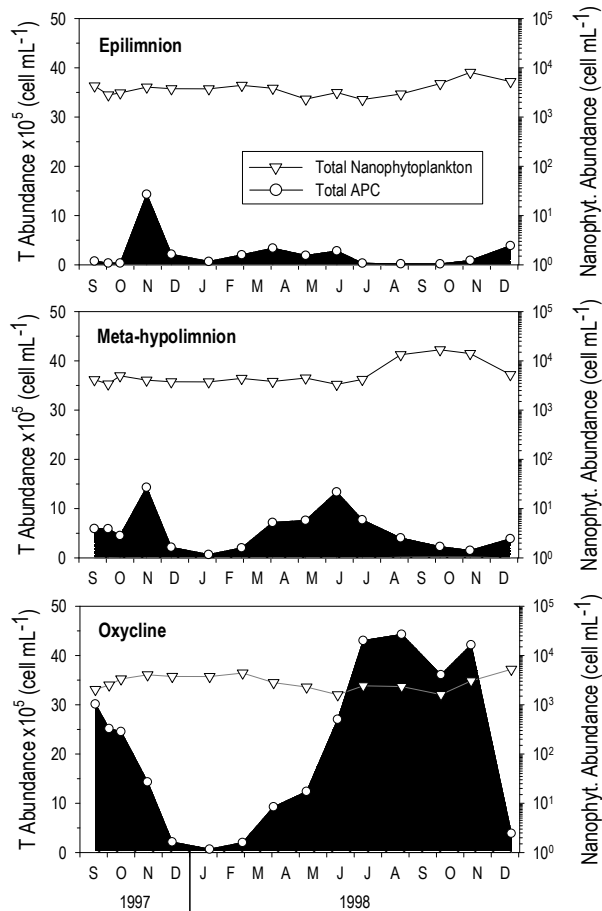


Figura 5.3. Variación temporal de la abundancia o densidad total del fitoplancton (T abundancia) y abundancia total de las fracciones de nanofitoplancton (en escala logarítmica) y de picocianobacterias autótrofas (APC) durante el periodo de estudio, diferenciando las distintas capas de la columna de agua durante la estratificación: epilimnion, meta-hipolimnion e interfase óxica-anóxica (oxiclina). Este último intervalo de profundidad fue el mismo para todo el año (de 19 m a la profundidad de extinción de oxígeno), pero la divisoria entre los dos primeros varió según los meses del año (las muestras de 8, 11, 14 y 16 m se fueron integrando sucesivamente en las del epilimnion; ver métodos en capítulo 3). Durante el periodo de mezcla se mantuvieron los siguientes intervalos: 0-11 m, 12-18 m, 19-24 m.

Figure 5.3. Temporal variation of total abundance or density (T abundance), and total nanophytoplankton abundance (in logarithmic scale) and total autotrophic picocyanobacteria abundance (APC) during the study period in the different depth intervals: epilimnion, meta-hypolimnion and oxic-anoxic interface (oxycline). The later interval was constantly from 19 m to the oxygen extinction depth, but the dividing depth between the first two depth intervals varied depending on the months (samples from 8, 11, 14 and 16 m were included successively in the epilimnion; see methods in chapter 3). During mixing, depth intervals were: 0-11 m, 12-18 m, 19-24 m.

Composición, distribución vertical y evolución estacional del nanofitoplancton

En la Laguna de El Tejo durante el periodo de estudio 1997-98 se identificaron especies del nanofitoplancton pertenecientes a distintos grupos algales, siendo el grupo de las clorofíceas el que presentó el mayor número de especies en todas las épocas (Tabla 5.1). Para ver el listado completo de especies algales identificadas en esta laguna durante todo el estudio se puede consultar la tabla correspondiente en el *Anexo I*.

Tabla 5.1. Número de especies encontradas pertenecientes a cada grupo nanofitoplanctónico y número total de especies en los diferentes meses del periodo estudiado.

Table 5.1. Number of species belonging to each nanophytoplankton group and total number of species (richness-S), found in the sampling months of the study period.

	1997					1998									
	S	O	O	N	D	J	F	M	My	Jn	Jl	A	S	N	D
Chlorophyceae	14	18	14	15	15	17	21	21	30	20	24	28	18	15	15
Zygnematophyceae	6	7	5	5	5	6	5	6	6	4	6	7	6	6	5
Cyanobacteria	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
Bacillariophyceae	5	6	7	5	7	5	5	5	7	5	5	5	5	6	4
Chrysophyceae	3	2	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3	4	2
Dinophyceae	5	6	5	2	3	2	2	4	3	3	6	4	3	3	3
Cryptophyceae	3	5	4	4	7	7	6	6	7	7	5	8	5	6	8
Euglenophyceae	2	2	3	0	1	1	0	1	1	0	2	1	1	0	0
Total (S: Richness)	39	47	42	32	40	39	39	44	54	39	49	55	41	40	37

La distribución obtenida para la abundancia de los diferentes grupos algales del nanofitoplancton identificados en el perfil vertical y en distintas épocas (Fig. 5.4) y para los biovolúmenes de todos los grupos del fitoplancton (incluyendo las APC; Fig. 5.5) muestra que las diatomeas normalmente dominaban en abundancia en todas las profundidades y épocas del año, las dinofíceas eran

dominantes en biovolumen durante la estratificación térmica en las aguas epi- y metalimnéticas, y las APC y criptofíceas sustentaban la zona de la oxiclina. Con el avance de la estación, las zygnematofíceas aumentaron su importancia en aguas superficiales, presentando una elevada densidad y biovolumen en el metalimnion. Durante la mezcla invernal la distribución entre grupos se hizo más equitativa en toda la columna de agua, descendiendo los valores de abundancia y biovolumen respecto a otras épocas del año.

En cuanto a la distribución espacio-temporal de las principales especies nanofitoplanctónicas presentes en la Laguna de El Tejo durante el periodo de estudio 1997-98, se establecieron grupos de especies dependiendo de la posición que ocuparon en la columna de agua (Figs. 5.6 y 5.6bis) en términos de abundancia. Así, a continuación se describen las especies agrupadas según su ubicación en las capas de agua en la que cada especie se desarrolló más habitualmente y/o de modo más intenso a lo largo del periodo estudiado.

a) Especies de presencia constante (Fig. 5.6bis)

Cyclotella delicatula Hustedt fue la especie mayoritaria durante todo el periodo de estudio, siendo además la especie más frecuente prácticamente en toda la columna de agua y la que alcanzó densidades mayores, a excepción de *Cosmarium* cf. *bioculatum* en su máximo puntual de crecimiento. La mayor densidad de *C. delicatula* se detectó durante la época de mezcla vertical (2500-3500 células mL⁻¹ hasta los 8 m de profundidad) y al inicio de la estratificación. En el periodo invernal esta diatomea estaba bien representada a lo largo de toda la columna, y a medida que avanzaba la primavera su mayor abundancia se fue localizando en el metalimnion hasta principios de verano, para posteriormente disminuir notablemente desde mediados de verano hasta que recuperó su abundancia con la mezcla otoñal.

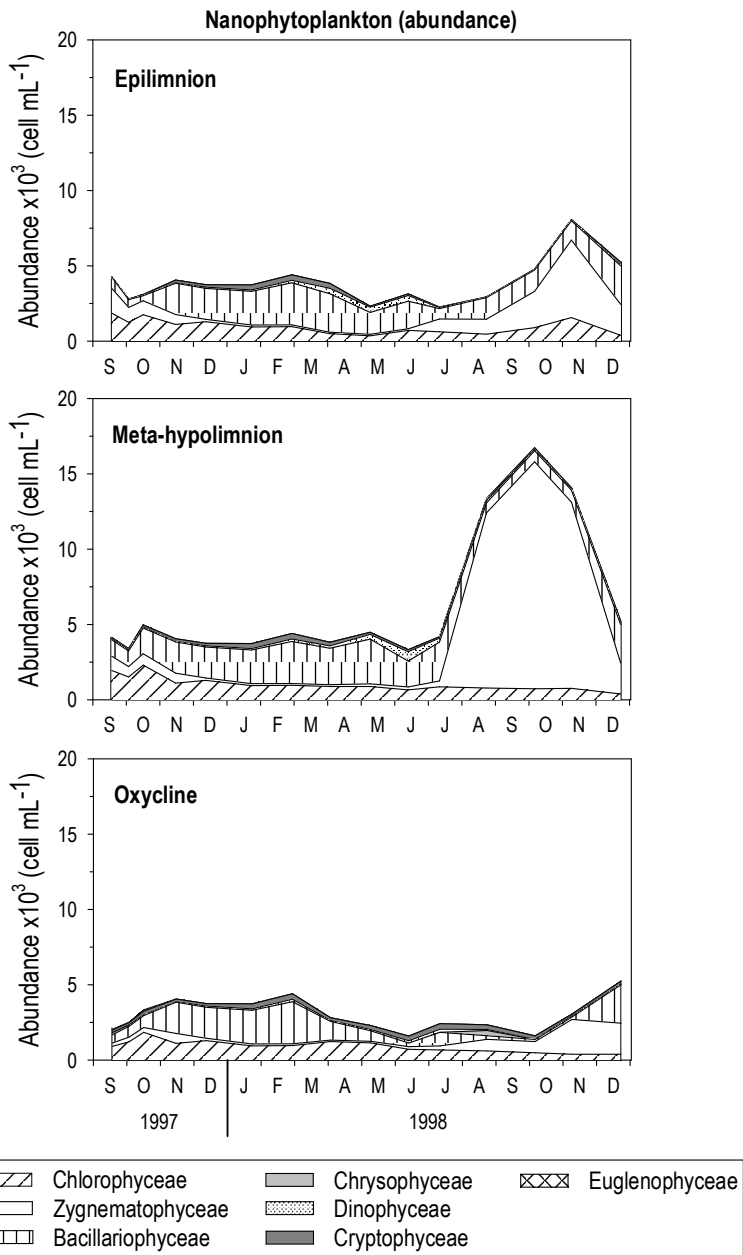


Figura 5.4. Variación temporal de la abundancia o densidad de los distintos grupos del nanofitoplancton, diferenciando las distintas capas de la columna de agua del modo detallado en el pie de la figura 5.3.

Figure 5.4. Temporal variation of the different nanophytoplankton groups abundance (or density) during the study period in the different depth intervals as detailed in figure 5.3.

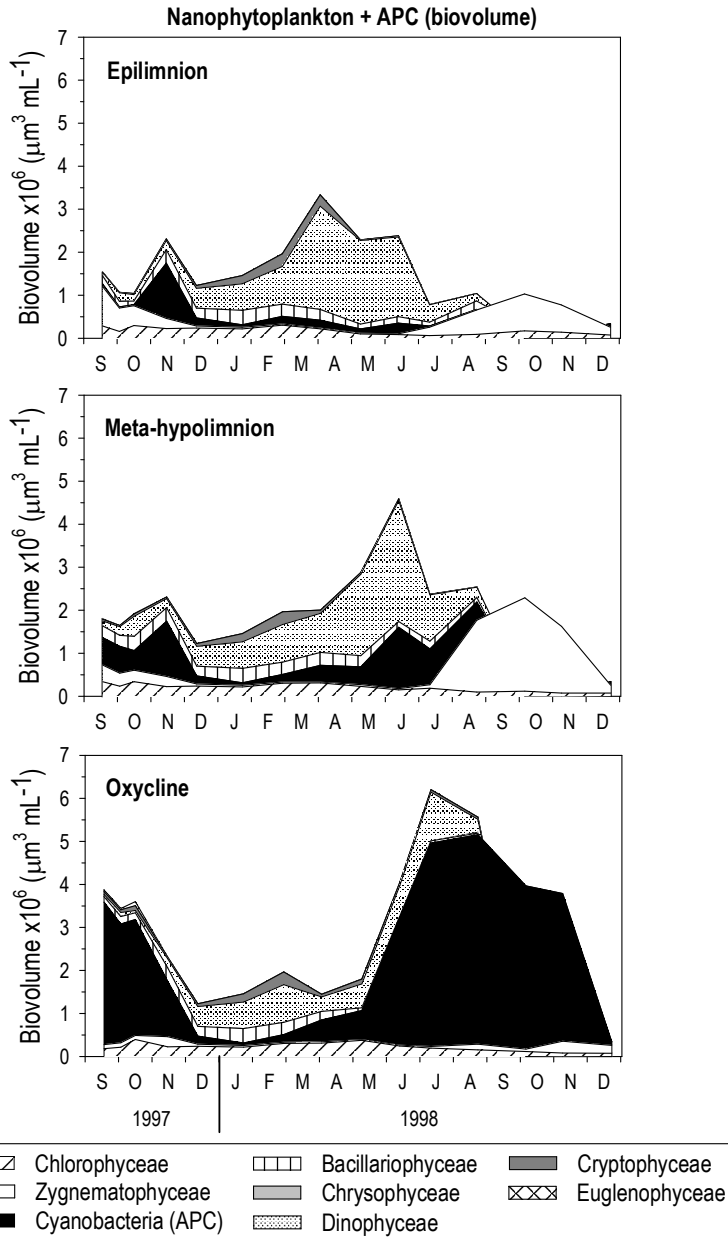


Figura 5.5. Variación temporal del biovolumen de los distintos grupos del fitoplancton (nanofitoplancton + APC), diferenciando las distintas capas de la columna de agua del modo detallado en el pie de la figura 5.3.

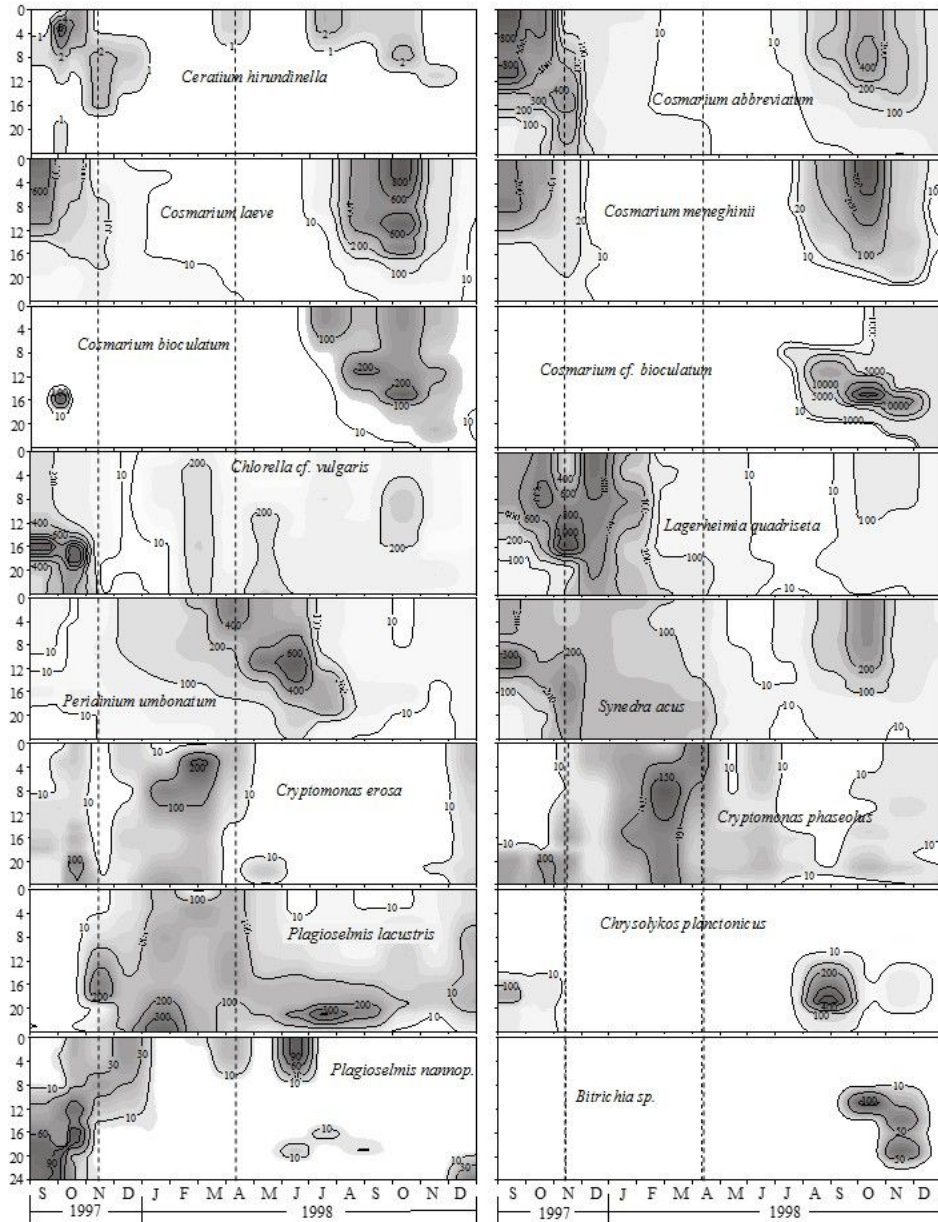
Figure 5.5. Temporal variation of the different phytoplankton groups biovolume (nanophytoplankton + APC) during the study period in the different depth intervals as detailed in figure 5.3.

Tetraëdron minimum (A.Braun) Hansgirg fue una de las especies más frecuentes de la laguna, contabilizándose en todas las muestras y profundidades. Su desarrollo más acusado se detectó en otoño de 1997, observándose un ligero aumento en la parte inferior de la columna de agua durante todo el periodo de mezcla que siguió. Esta cloroficea se mantuvo más o menos abundante en el metalimnion, pero se redujo mucho en el epilimnion durante la estratificación. En otoño de 1998 no presentó un máximo acusado como en el año anterior, localizándose en las aguas superficiales.

b) Especies del epilimnion o de aguas superficiales

La dinoficea *Ceratium hirundinella* (O.F. Müller) Dujardin se desarrolló preferentemente en el epilimnion durante el periodo de estratificación, alcanzando su máxima abundancia en la parte superior de la termoclina en septiembre de 1997. Pese a su escasa abundancia, debido a su gran tamaño es importante en términos de biovolúmenes. En la época de mezcla prácticamente desapareció, algo que ocurrió de forma más temprana en 1998 respecto a 1997 (Fig. 5.6).

En los dos años estudiados varias especies de desmidiáles pertenecientes al género *Cosmarium* experimentaron un notable desarrollo a finales del periodo de estratificación. *Cosmarium laeve* Rabenhorst y *Cosmarium abbreviatum* Raciborski presentaron máximos poblacionales en el epilimnion en dicha época, pero las densidades máximas, con valores semejantes, fueron alcanzadas alternativamente; en el caso de *C. laeve* esa mayor densidad poblacional se produjo en 1998 mientras que en *C. abbreviatum* se alcanzó en 1997. *Cosmarium meneghinii* Brébisson ex Ralfs presentó también máximos poblacionales en la misma zona y época, pero más localizados en la superficie y con diferencias menos acusadas en los dos años.



(*Peridinium u.* ≡ *Parvodinium u.*; *Synedra a.* ≡ *Fragilaria a.*)

Figura 5.6. Isolíneas de la densidad (cél mL⁻¹) de las principales especies del nanofitoplancton durante el periodo de muestreo (meses, en abscisas) y en el perfil vertical (profundidad m, en ordenadas). En la figura 5.6bis se representan las especies de presencia constante. Las líneas discontinuas enmarcan el periodo de mezcla vertical de las aguas.

Figure 5.6. Time-depth distribution of main nanophytoplankton species. Density isopleths in cell mL⁻¹, months in abscissas and depth (m) in ordinates. Figure 5.6bis shows the permanent species. Dashed lines indicate the period of vertical mixing.

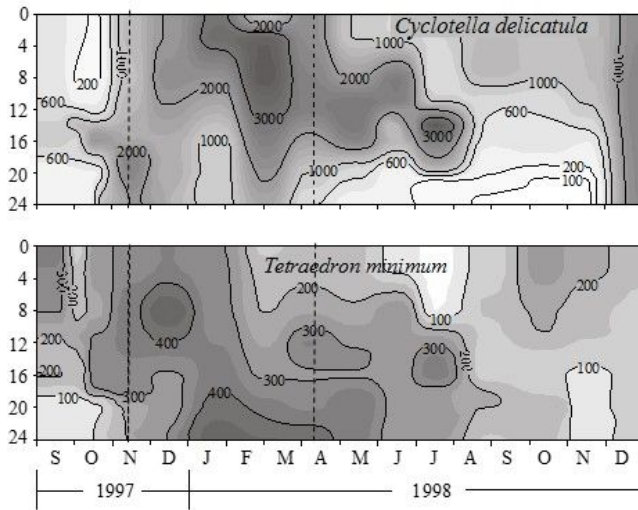


Figura 5.6bis. (continuación Fig. 5.6)
Figure 5.6bis. (continuation Fig. 5.6)

c) Especies del metalimnion-hipolimnion óxico o de profundidades intermedias

La mayor densidad poblacional de *Cosmarium bioculatum* Brébisson ex Ralfs se localizó en la parte más profunda del metalimnion a finales del periodo estival de 1997 y en la misma profundidad durante la estratificación de 1998, con densidades inferiores al resto de especies de *Cosmarium*. Sin embargo, fue muy destacable la acusada proliferación de *C. cf. bioculatum* desde mediados hasta el final de la estratificación de 1998, con un marcado máximo que fue descendiendo asociado al máximo del gradiente térmico, desde el entorno de los 8 m en julio hasta los 16 m en noviembre. Este aumento aportó los valores más elevados de densidad poblacional para el periodo estudiado, con un máximo de 32500 cél mL⁻¹ a 14 m en septiembre de 1998. Es interesante destacar que *C. cf. bioculatum* no sólo proliferó intensamente, sino que esta especie se estableció ligeramente desplazada en el espacio y en el tiempo respecto a sus congénéricas.

La cloroficea *Chlorella* cf. *vulgaris* se detectó de forma bastante frecuente en el nanofitoplancton de la laguna, destacando su máxima abundancia sobre 16-18 m (parte superficial del hipolimnion) a finales del periodo de estratificación de 1997.

Lagerheimia quadriseta (Lemmermann) G.H. Smith alcanzó una elevada densidad poblacional prácticamente en toda la columna de agua durante el periodo de estudio de 1997, con un máximo metalimnético en noviembre. A finales de la época invernal 1997-98 esta cloroficea inició un acusado descenso en su abundancia.

A pesar de no alcanzar valores elevados de abundancia es interesante destacar la presencia de la diatomea pennada *Fragilaria acus* (Kützing) Lange-Bertalot (en la figura corresponde a *Synedra acus* Kützing, actualmente un basiónimo) en la zona correspondiente al metalimnion a finales de la época de estratificación de 1997 y, en profundidades medias durante el periodo de mezcla de aguas invernales. Tras la práctica desaparición de esta especie durante primavera-verano, volvió a desarrollarse al final de la estratificación de 1998 a menor profundidad que el año anterior.

Parvodinium umbonatum (Stein) S. Carty (en la figura corresponde a *Peridinium umbonatum* Stein, actualmente un basiónimo) fue la dinoficea más frecuente y abundante en la laguna. Su máximo se observó a inicios del periodo de estratificación de 1998 en la parte superior del metalimnion, disminuyendo considerablemente en aguas más profundas. Durante los periodos de mezcla su presencia fue escasa en toda la columna de agua.

- d) Especies características de la oxiclina (durante la estratificación) o de aguas profundas

Las criptofíceas *Cryptomonas erosa* Ehrenberg y *Cryptomonas phaseolus* Skuja se encontraron en la zona de la oxiclina, especialmente la segunda. No obstante, durante la época de mezcla de aguas estas especies tuvieron un gran desarrollo en la parte superior de la columna, con un máximo más profundo de *C. phaseolus* respecto a *C. erosa*.

Plagioselmis lacustris (Pascher & Ruttner) P. Javornicky alcanzó una mayor densidad poblacional en la zona profunda, principalmente durante la época invernal 1997-98 y en la oxiclina durante la época estival de 1998. En cambio *Plagioselmis nannoplanctica* (H. Skuja) G. Novarino, I.A.N. Lucas & S. Morrall presentó un máximo profundo a finales de la época de estratificación de 1997 y durante el periodo de mezcla prácticamente desapareció. Por tanto, las dos especies de *Plagioselmis* se excluyeron mutuamente: a finales de la estratificación de 1997 *P. nannoplanctica* dejó paso a una mayor presencia de *P. lacustris* en toda la columna de agua en la época de mezcla, mientras que durante la estratificación de 1998 *P. lacustris* se desarrolló más abundantemente en la oxiclina y *P. nannoplanctica* en el epilimnion y/o parte alta de la oxiclina al principio del periodo, cuando *P. lacustris* era menos abundante (y posteriormente en diciembre se observó también una segregación espacial). Así mismo, se observa una segregación entre las poblaciones de los dos géneros de criptofíceas encontradas en la laguna (*Cryptomonas* y *Plagioselmis*), fenómeno más acentuado fuera del periodo de mezcla.

Por su crecimiento restringido a capas profundas podemos destacar las crisofíceas, *Chrysolykos planctonicus* Mack y *Bitrichia* sp. las cuales se desarrollaron respectivamente la primera a mediados-finales de verano y la

segunda a principios de otoño. Con mucha menor abundancia se encontraron también varias especies de euglenófitos circunscritas a la interfase óxico-anóxica.

La evolución estacional de estas especies se puede resumir como sigue. Durante el periodo invernal las poblaciones nanofitoplanctónicas de la Laguna de El Tejo estaban dominadas por las diatomeas, principalmente *C. delicatula*, siendo también relativamente abundantes las clorofíceas, especialmente *T. minimum*. Con el inicio de la estratificación a finales de primavera, la abundancia de diatomeas fue disminuyendo en la columna de agua, concentrándose en el metalimnion, pero mostrando un considerable descenso en la zona profunda. Esta disminución dio paso a un aumento de dinofíceas (principalmente *P. umbonatum*), primero en superficie y después a profundidades mayores, en el metalimnion. Las criptofíceas, abundantes en toda la columna en invierno, se localizaron ya desde el inicio de la estratificación en la zona de la oxiclina, situación que se mantuvo durante todo el periodo estival. A finales de verano y en otoño de ambos años, las zygematofíceas fueron el grupo nanofitoplanctónico dominante, constituyendo *Cosmarium* spp. más del 50% de su población. A finales de verano-otoño de 1998 fue éste el género dominante de forma absoluta, con más del 50% de los individuos del nanofitoplancton en el metalimnion, en cambio en el otoño de 1997 no se produjo un crecimiento tan acusado de las especies de este género. Con el establecimiento de la mezcla vertical la dominancia se invirtió de nuevo a favor de las diatomeas. Este hecho ocurrió a finales de los dos años de estudio, aunque en 1998 el declive de las poblaciones de zygematofíceas fue más drástico que en 1997.

Abundancia, diversidad y heterogeneidad

Como detallamos anteriormente, por lo general el número de individuos del nanofitoplancton por unidad de volumen no fue muy elevado (Fig. 5.7A), alcanzándose las mayores abundancias en el metalimnion en octubre de 1997 y de forma más acusada en septiembre-octubre de 1998. En el periodo invernal la máxima abundancia se localizó en aguas superficiales. La abundancia total del nanofitoplancton en la zona de la oxiclina fue siempre menor que en los estratos superiores.

En la figura 5.7 B y C se representa la diversidad del nanofitoplancton, observándose que durante el periodo de estudio la oxiclina presentó los mayores valores de diversidad con una relativa menor fluctuación, disminuyendo respecto al resto de zonas únicamente a finales de la época estival de 1997 (Fig. 5.7B). Esto es debido a la escasa población nanofitoplanctónica, ya que a esta profundidad dominaban las APC. También se contrastaron las diversidades de la columna de agua frente a la diferencia de temperaturas superficial y profunda (19 m) de los perfiles verticales (Fig. 5.7C); la variación de ambos parámetros se espera que sea semejante y así fue durante los gradientes térmicos decrecientes (de septiembre a enero) cuando la diversidad de la columna de agua siguió el patrón de descenso esperado y durante el aumento del gradiente térmico al final de la estratificación de 1997 en que se alcanzaron los mayores valores de diversidad. Sin embargo durante la estratificación de 1998, debido a los crecimientos masivos de *Cosmarium cf. bioculatum*, el valor de diversidad de la columna de agua no aumentó, siendo la diversidad en el meta-hipolimnion inferior a la del epilimnion y coincidiendo los valores de menor diversidad con los de mayor abundancia (Fig. 5.7 A y B).

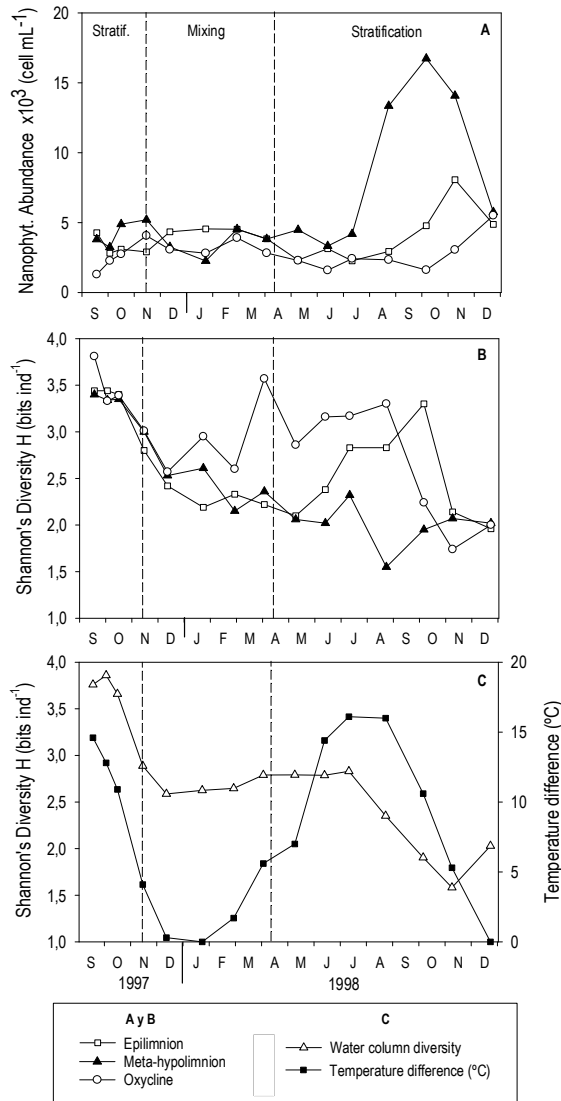


Figura 5.7. Distribución temporal de la abundancia (A) y diversidad del nanofitoplancton (B) en los diferentes intervalos de profundidad. Variación temporal de la diversidad de la columna de agua y diferencia entre las temperaturas superficial y profunda (C). Las líneas verticales discontinuas enmarcan el periodo de mezcla de aguas. Intervalos de profundidad como en la figura 5.3.

Figure 5.7. Temporal distribution of nanophytoplankton abundance (A) and diversity (B) for each depth interval. Temporal variation of the water column diversity and temperature differences between surface and bottom (C). Dashed lines indicate the period of vertical mixing. Depth intervals as in figure 5.3.

Para relacionar la diversidad con el número de especies o riqueza (S), en la tabla 5.1 se detalla el número de especies encontradas distribuidas en los diferentes grupos nanofitoplanctónicos. El mayor número de especies en cualquiera de los meses considerados correspondió a las clorofíceas, aunque muchas de ellas no tuvieron importancia cuantitativa. El mayor valor total de especies distintas encontradas se obtuvo en agosto de 1998 y el menor número durante los meses invernales, observándose un descenso en el número de especies a principios de junio de 1998, después de un importante periodo de lluvias (Fig. 4.2).

Asociaciones

Se aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para los datos referentes a las 18 especies principales de la laguna, previamente normalizados (véase capítulo 3) y los resultados obtenidos mostraron la importancia relativa de aquellos factores que determinaron los cambios en la población nanofitoplanctónica a lo largo del perfil vertical y del ciclo limnológico anual (Figs. 5.8 y 5.9). Los dos primeros factores principales obtenidos en el PCA explicaron de forma conjunta aproximadamente el 60 % de la varianza total de los datos. Las muestras representadas por los valores de estos factores se presentan separadamente en dos gráficos (Fig. 5.8 A y B) dividiendo en dos zonas la columna de agua (0-13 m y 14-22 m, o 24 m), porque la variabilidad en las muestras de superficie y profundidad es muy diferente. Como profundidad divisoria se han escogido los 14 m, que es la profundidad donde, en la mayoría de los meses después del máximo metalimnético empieza a disminuir el oxígeno. Las muestras se ubican siguiendo una secuencia respecto a los meses del año, mostrando el primer factor la variación entre el inicio y el final de la estratificación y el segundo la diferencia interanual entre los meses del final de la estratificación (septiembre-noviembre) de 1997 y de 1998. Los valores

correspondientes a la época de mezcla de aguas quedan juntos y cercanos al valor 0. Esto se hace más evidente en las muestras de profundidad (Fig. 5.8B) concentrándose las pertenecientes al periodo de mezcla en las proximidades del cruce de ambos ejes. Las muestras de profundidad son siempre mucho menos variables que las de la parte superficial: (1) las del final del periodo de estratificación quedan mucho más centradas respecto al primer factor principal y (2) las del inicio y establecimiento de la estratificación con mucha menor variabilidad respecto a los dos factores (junio y julio quedan juntos en profundidad (Fig. 5.8B), en cambio las muestras de la parte superficial del mes de julio se diferencian mucho (Fig. 5.8A).

Las correlaciones de las especies nanofitoplanctónicas con los factores principales se representan en la figura 5.9 y agrupan aquellas especies que requerían condiciones semejantes para su desarrollo. En primer lugar, las especies de presencia más frecuente, *C. delicatula* y *T. minimum*, se sitúan con correlaciones negativas para los dos factores, con valores más bajos para el primer factor, situándose las especies de las distintas capas del meta- e hipolimnion estival con correlaciones negativas más altas del primer factor (variando con el segundo factor). En la parte más positiva de este primer factor se encuentran las especies de *Cosmarium* de presencia superficial al final de los periodos de estratificación. En la parte más positiva del segundo factor se sitúan las especies del hipolimnion de finales de la estratificación de 1998 (septiembre-noviembre). Por otro lado, en la parte negativa del segundo factor y positiva del primero se sitúan las especies abundantes en el mismo periodo que acabamos de citar pero del año 1997.

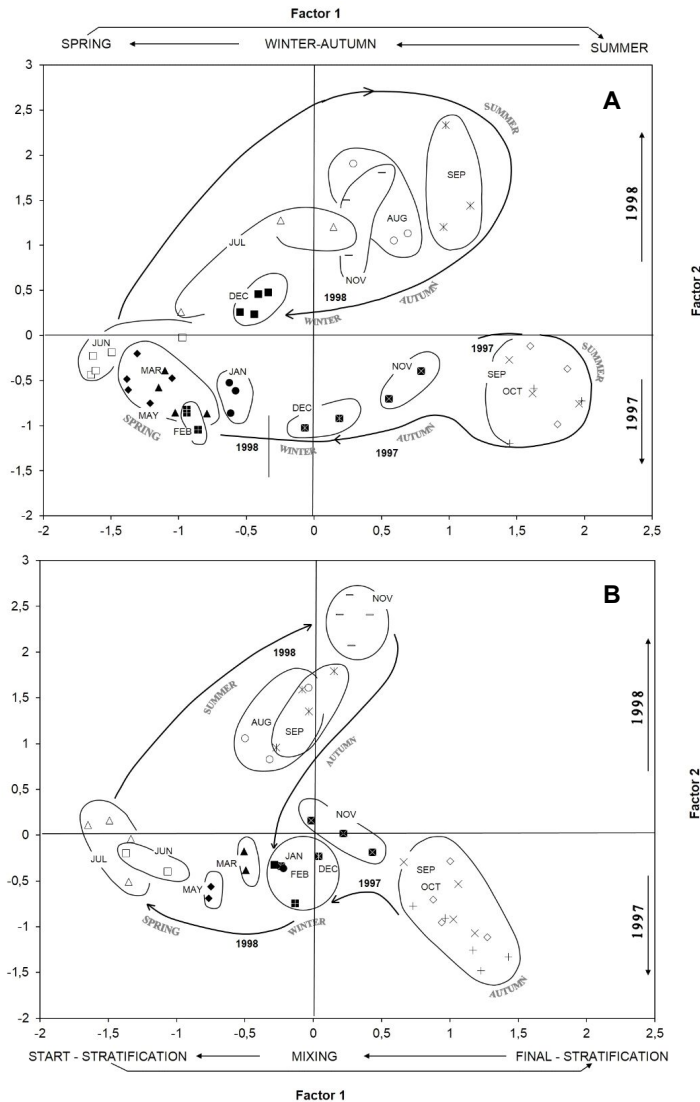


Figura 5.8. Situación de las muestras en el espacio definido por los dos primeros factores resultantes del PCA. **A:** aguas superficiales (0-13 m) y **B:** aguas profundas (14-22/24 m). Los distintos símbolos corresponden a los meses muestreados que se indican por sus siglas en la correspondiente agrupación.

Figure 5.8. Position of the samples in the space defined by the first two factors from the PCA. **A:** superficial waters (0-13 m) and **B:** deep waters (14-22/24 m). Symbols represent the different sampling months, which are abbreviated in the corresponding clusters.

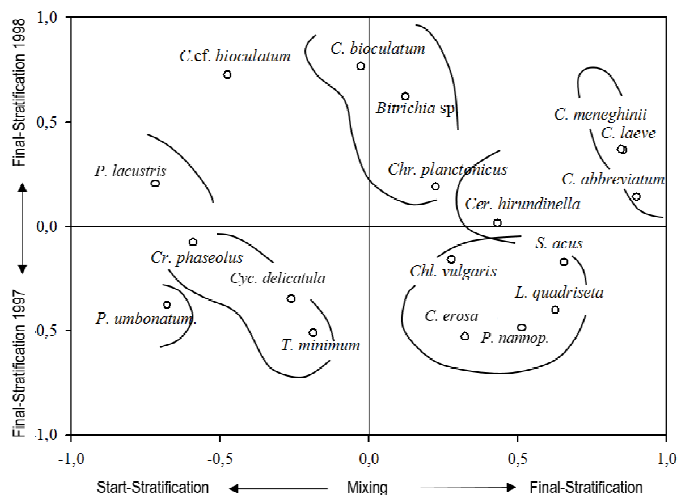


Figura 5.9. Situación de las principales especies nanofitoplanctónicas en el espacio definido por los dos primeros factores resultantes del PCA. Las especies se han agrupado según su distribución espacio-temporal.

Figure 5.9. Position of the main nanophytoplankton species in the space defined by the first two principal factors from the PCA. Species are grouped according their spatio-temporal distribution.

Por lo demás, los resultados del análisis ponen de manifiesto la contraposición entre algunas especies congénéricas. Son de destacar las siguientes contraposiciones:

- (1) *Cryptomonas erosa* y *Plagioselmis nannoplanctica* se sitúan en posiciones opuestas a *Cryptomonas phaseolus* y *Plagioselmis lacustris*. Las primeras se desarrollaron abundantemente durante el final de la estratificación de 1997 en profundidad y en todo el perfil en la primera parte de la época invernal, pero el resto del periodo de estudio su abundancia decreció, mientras que las segundas se desarrollaron especialmente al final del invierno en todo el perfil y en su parte profunda durante la estratificación de

1998, especialmente los primeros meses. Además, en las fechas en que coincidían, el máximo de abundancia de las segundas especies siempre se situaba más profundamente, si bien debe considerarse que las especies del género *Plagioselmis* estaban por lo general más próximas a las capas profundas del hipolimnion que las de *Cryptomonas*.

- (2) Algunas especies de *Cosmarium* se separan por sus coeficientes de correlación porque fueron alternativamente abundantes en uno u otro año al final de la estratificación. *C. cf. bioculatum* presentó las mayores diferencias con respecto a las otras especies del género, al constituirse como la especie dominante en el metalimnion del final de la estratificación de 1998 y *C. bioculatum* también fue más abundante en 1998 respecto a la misma época que el año anterior. Por otra parte, *C. meneghinii*, *C. laeve* y *C. abbreviatum* presentaron máximos de densidad poblacional en superficie al final de la estratificación en ambos años, siendo más importante en 1997 para *C. abbreviatum*.
- (3) Las dos especies principales de dinofíceas se separan también en el espacio de los factores principales: *P. umbonatum* se localizó principalmente al inicio de la estratificación en el metalimnion y *C. hirundinella* en el epilimnion durante la época estival.

DISCUSIÓN

La marcada estratificación estival de la laguna cárstica de El Tejo influyó de manera notable en la distribución de las poblaciones fitoplanctónicas. La gran profundidad relativa de esta laguna, su morfología circular y su ubicación hundida en la dolina, la protegen de los factores meteorológicos y favorecen el

establecimiento de una estratificación térmica vertical y la estructuración de los gradientes de oxígeno disuelto, produciéndose en la zona profunda una interfase óxico-anóxica (Fig. 4.9). Los productores primarios planctónicos (PPP) se organizan en el perfil vertical en dos máximos de población, uno debido al nanofitoplancton situado en el metalimnion y otro a las picocianobacterias (APC) en la interfase óxico-anóxica, que se evidencia por el máximo profundo de concentración de chl-*a*. La gran importancia del picoplancton se pone de manifiesto al no coincidir la distribución de chl-*a* con la del total de algas del nanoplancton. Estas elevadas concentraciones de chl-*a* en la interfase óxico-anóxica son debidas al desarrollo de densas poblaciones de picoplancton fotoautotrófico tipo *Synechococcus* (Camacho et al., 2003c). Estas APC proliferan considerablemente por la mayor disponibilidad de nutrientes en dicha interfase y gracias a pigmentos accesorios como la ficoeritrina que permiten el aprovechamiento óptimo de la escasa luz (Figs. 4.8 y 4.9) que alcanza dichas profundidades (e.g. Vörös et al., 1998; Schallenberg & Burns, 2001; Camacho et al., 2003b). Por tanto, a pesar de que el presente estudio se centra en las poblaciones nanofitoplanctónicas debemos constatar la importancia del picoplancton procariota en la estructura trófica del lago. Estos máximos profundos de clorofila también se han detectado en otras lagunas cercanas, como la Laguna de La Cruz (Vicente & Miracle, 1988), el Lagunillo de El Tejo (Vicente & Miracle, 1984) y la Laguna de Arcas-II (Camacho et al., 2000).

Respecto al nanofitoplancton, la baja densidad de individuos que por lo general se observa puede relacionarse con la baja disponibilidad de nutrientes inorgánicos (cuyos valores se muestran en el *Capítulo 4: Caracterización física y química de la Laguna de El Tejo*). En las aguas ricas en calcio, como en la Laguna de El Tejo, es característica la rápida precipitación del ortofosfatos en forma de apatito, especialmente en aguas de pH alcalino (Dittrich & Koschel, 2002; Romero-Viana, et al., 2008) durante el estío. Al inicio de la estratificación, el fósforo inorgánico (P) constituyó el factor limitante para el desarrollo de las especies del

fitoplancton, tal y como se ha citado para los lagos de regiones templadas (Schindler, 1978; Sterner, 2008). Además, el incremento de P en las aguas superficiales en primavera (Fig. 4.15), justo antes de su agotamiento por parte de los PPP en la estratificación, probablemente se debe a aportes por escorrentía tras intensos periodos de lluvia (Fig. 4.2). Sin embargo, al menos a finales del periodo de estratificación de 1997, el nitrógeno inorgánico (N) controló el desarrollo del fitoplancton en el epi-metalimnion, según los bioensayos realizados en laboratorio adicionalmente a la toma de muestras justo en ese año (Camacho et al., 2003c). En relación a esto, observamos un agotamiento exhaustivo de amonio a final de la estratificación estival en las capas epi- y metalimnéticas en 1997 y 1998 (Fig. 4.17), siendo esta la forma de nitrógeno energéticamente más propicia para el nanofitoplancton (Reynolds, 1984). Este cambio en el control por nutrientes sobre los PPP ha sido descrito para otros lagos de zonas templadas (e.g. Lehman & Sandgen, 1978; Planas, 1990; Elser et al., 2007; Harpole et al., 2011). Por otra parte, la mayor disponibilidad de nutrientes en el medio durante la mezcla invernal no supone un incremento destacable en abundancia del fitoplancton debido al descenso en tiempo e intensidad de la radiación diaria, unido a una disminución en la penetración de la luz en la columna de agua (Figs. 4.9 y 4.10) dado al aumento de turbidez durante la mezcla vertical (Kirk, 1985), si bien el aumento de silicato soluble (Fig. 4.14) sí favoreció el desarrollo de las diatomeas.

Con objeto de aclarar estos resultados respecto a la limitación por nutrientes para los PPP en la Laguna de El Tejo se realizaron experiencias de adición de nutrientes *in situ* en distintas profundidades y épocas en el periodo 2003-04, cuyos resultados se discuten en los capítulos 6 y 7.

La sucesión estacional del nanofitoplancton de la Laguna de El Tejo es similar a la descrita en otros lagos cársticos, pero se diferencia principalmente en el excepcional crecimiento de las especies de la zygmatofícea desmidial

Cosmarium al final del periodo de estratificación. Así, la presencia de importantes poblaciones de pequeñas diatomeas céntricas pertenecientes a *Cyclotella delicatula* group (*C. delicatula* y *C. wuethrichiana* Druart & Straub entre otras, con características morfológicas similares y difíciles de identificar en los recuentos; K. Kiss, comunicación personal; Kiss et al., 2007) prácticamente todo el año, un mayor número dentro del grupo de las clorofíceas, y la estructuración de la comunidad nanofitoplanctónica con un reducido número de especies presentando elevadas abundancias, se ha descrito para otros lagos de la Península Ibérica de naturaleza cárstica, como los lagos de Banyoles (Planas, 1973, 1990), Montcortés (Camps et al., 1976), Estanya (Ávila et al., 1984), Laguna del Vilà (García de Emiliani, 1973) y la cercana Laguna de La Cruz (Rojo & Miracle, 1987; Dasí y Miracle, 1991; Miracle et al., 1998; Sendra, 2009). En la mayoría de estos lagos también se han constatado crecimientos explosivos de otras clorófitas, pero nunca de *Cosmarium*, así como la importancia del establecimiento de poblaciones bien definidas en la interfase óxico-anóxica, especialmente de los grupos de criptofíceas, crisofíceas y euglenofíceas. En concreto *C. phaseolus* se cita como característica de la oxiclina en la mayoría de las lagos antedichos y en las lagunas cársticas-sulfatas del Cisó (Gasol et al., 1990) y de Arcas (Camacho et al., 2001).

La sucesión en la Laguna de El Tejo se puede resumir como sigue: (1) En superficie viene determinada por el descenso en la disponibilidad de nutrientes (y entre ellos el silicato; Fig. 4.14): *Cyclotella* – *Peridinium* (*Parvodinium*) – *Ceratium*. (2) A finales de verano, debido a perturbaciones físicas (viento, disminución de la temperatura en el litoral) que conducen a la progresiva profundización de la termoclina al incrementarse la profundidad de mezcla (*Z_m*) de la columna de agua (Fig. 4.10) y que también generan corrientes litoral-centro que en esta pequeña laguna facilitan el transporte horizontal de nutrientes y algas o diásporas por el metalimnion superficial, de manera que la sucesión retrocede en esta capa y se produce un crecimiento de *Cosmarium*. Reynolds & Reynolds

en su revisión de 1985 describe estos retrocesos en la sucesión por las perturbaciones físicas de finales de verano y presenta datos de lagos mesotróficos del Reino Unido donde estas regresiones llevan a un aumento de especies de zygmatofíceas desmidiales (*Cosmarium* entre ellas).

Es destacable la gran densidad poblacional del grupo de las desmidiales a finales del periodo de estratificación de 1998, cuando se produce en el metalimnion desde mediados de agosto un intenso crecimiento de *C. cf. bioculatum* que conduce a un aumento de su población en más de un orden de magnitud. Esta proliferación denota unas condiciones en el lago que no ocurrieron en su metalimnion el año anterior, por ejemplo la incidencia de vientos más intensos y mayores cambios de temperatura día/noche, que podrían aumentar la circulación de agua desde el litoral al centro, vía metalimnion superficial, debido al gradiente térmico más agudo que se forma cuando la termoclina se profundiza (Figs. 4.4 y 4.9). Además, el agotamiento de nutrientes tras la época estival (Figs. 4.14, 4.15 y 4.16) pudo inducir una intensa competencia por la adquisición del recurso justo en esta estrecha capa de gradiente acusado, que condujo a la proliferación de una determinada especie. Es destacable como *C. cf. bioculatum* va situando su máximo sucesivamente más profundo, siempre unos metros por debajo del máximo metalimnético de oxígeno (Fig. 4.7), dominando absolutamente en dicha zona hasta que la mezcla vertical se completa.

La bibliografía refiere que en lagos de aguas alcalinas el desarrollo de zygmatofíceas no está favorecido y también que no es frecuente que sea un grupo dominante en el plancton (Hutchinson, 1967). Sin embargo esta misma referencia, extraordinaria obra de compilación del conocimiento del fitoplancton hasta aquella fecha, ya recoge citas antiguas de *C. bioculatum* var. *minutum* produciendo máximos poblacionales asociados a una cianofícea chroococcal en las montañas de Java (Ruttner, 1952) y de *C. bioculatum* como dominante junto con cianofíceas en lagos finlandeses eutróficos (Järnefelt, 1956). Por tanto, es

posible la existencia de una asociación con máximos de abundancia de *Cosmarium*, acompañado de una cianofícea (en nuestro caso *Synechococcus* spp.) con su máximo situado en una posición más profunda. Así mismo, estudios recientes demuestran que la proliferación de desmiales en este tipo de aguas y en condiciones de limitación de P inorgánico puede ser debido a la alta actividad de su enzima fosfatasa alcalina (APA; Spijkerman & Coesel, 1998). En relación a esto, recientemente se han encontrado importantes poblaciones de zygematofíceas en sistemas de aguas alcalinas en Hungría (Fehér, 2003), Serbia (Stamenković & Cvijan, 2008) y en los lagos cársticos Vrana y Visovac en Croacia (Glicora et al., 2007, 2011), así como en la cercana Laguna de La Cruz (Sendra, 2009).

La presencia prácticamente constante y normalmente dominante de *C. delicatula*, el desarrollo superficial de dinofíceas durante la estratificación y la adaptación de las especies a una baja disponibilidad de nutrientes indican la naturaleza oligotrófica de las aguas superficiales de la Laguna de El Tejo, pero el desarrollo de varias especies del género *Cosmarium* en algunos años denota su condición de mesotrofia. Por ello, en aguas profundas se presenta una zona en la que domina la descomposición donde se desarrollan criptofíceas y crisofíceas. Es destacable la proliferación de crisofíceas en la interfase óxico-anóxica al final de la estratificación de 1998, relacionando su presencia con la comentada existencia de unas condiciones distintas en la laguna respecto al año anterior. En la cercana Laguna de La Cruz se observó que, aunque este grupo fue poco representativo, también se localizó preferentemente en la oxiclina (Dasí & Miracle, 1991; Sendra, 2009).

Los máximos profundos de *T. minimum* y *C. delicatula* se podrían deber en ocasiones a sedimentación pasiva y retención por diferencias de densidad en el agua y a una mayor resistencia a la degradación de los individuos sedimentados. La composición de sílice de los frústulos de las diatomeas y la pared celular

altamente resistente de *T. minimum* compuesta por biopolímeros alifáticos no hidrolizables (Blokker et al., 1998), permiten su preservación en las aguas profundas y en los sedimentos.

Esta laguna pertenece al grupo de lagos en los que, durante la estratificación, la luz penetra hasta la interfase óxico-anóxica (Fig. 4.9), donde se produce el reciclaje de los nutrientes que promueven la aparición de densas poblaciones fitoplanctónicas en la oxiclina (e.g. Reynolds, 1992), por debajo de la profundidad de la zona eufótica (Fig. 4.10). En esta zona fronteriza proliferan intensamente las picocianobacterias tipo *Synechococcus* y las criptofíceas, con un uso diferencial de los recursos y en condiciones de baja disponibilidad lumínica. En esa zona de ambiente microaerobio este grupo eucariota es eficiente gracias a la presencia del pigmento accesorio ficoeritrina o bien posiblemente cambie su metabolismo de autótrofo a heterótrofo dada su capacidad mixotrófica (Laybourn-Parry et al., 2005; Carrillo et al., 2006). Experiencias realizadas con criptofíceas en la Laguna del Cisó (Gasol et al., 1990) indican su mejor adaptación a bajas intensidades luminosas al avanzar la estratificación. Durante la mezcla invernal APC y criptofíceas también son dominantes en toda la columna de agua, y por tanto la presencia conjunta de ambos grupos en todas las épocas podría evidenciar cierta similitud funcional entre ellos.

La distribución y desarrollo de las especies algales de la Laguna de El Tejo durante el periodo de estudio muestran que se da un patrón distinto de los valores del índice de diversidad de Shannon (H) en un año con abundantes precipitaciones primaverales como el 1998, en comparación al año anterior más seco (Fig. 4.2). Los valores de diversidad obtenidos siguen un patrón de comportamiento espacial y temporal que aumenta con el gradiente térmico (es decir, con la estratificación) en 1997, pero no en 1998, en el que la diversidad disminuye por la proliferación masiva de *C. cf. bioculatum*, cuando se da el mayor gradiente de temperaturas (Fig. 5.7C).

El PCA indica que la comunidad algal se desarrolla preferentemente de acuerdo a los factores que determinan las diferencias existentes entre la época de estratificación y la época de mezcla, mostrando que dichos factores difieren para el periodo de estratificación en ambos años. Este análisis confirma además la comentada estabilidad de la zona de agua profunda que presenta una menor variación que la zona superficial durante la sucesión estacional (Figs. 4.10 y 4.11). El presente trabajo incide en la importancia de condicionantes abióticos, así como sus marcados gradientes, en la composición y estructuración de la comunidad nanofitoplanctónica a lo largo del tiempo, siendo los principales factores que regulan la dinámica de estos organismos en lagos profundos (e.g. Lindenschmidt & Chorus, 1998; Miracle et al., 1998; Naselli-Flores et al., 2003). La sucesión inducida por efecto de la turbulencia en sistemas estratificados es referida por Reynolds (1980, 1984), señalando la disponibilidad de nutrientes y la estabilidad de la columna como los factores más importantes para los acontecimientos de la sucesión. Además, los cambios en la turbulencia fueron asociados a la formación de crecimientos algales explosivos, normalmente de cianofíceas (Reynolds & Walsby, 1975). Sin embargo, estudios más recientes (Reynolds, 1997) señalan la influencia de los cambios temporales sobre la estructura de la comunidad no como motores de la sucesión sino promoviendo un ‘ensamblado’ entre especies. En conclusión, el cambio detectado en lo que se refiere a la comunidad nanofitoplanctónica a lo largo del periodo de estudio en la Laguna de El Tejo permite definir dicha comunidad por su entidad heterogénea, siendo los factores de estacionalidad y verticalidad los que en principio la condicionan.

CAPÍTULO 6

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL *IN SITU* DE LA

LIMITACIÓN POR NUTRIENTES (I): CLOROFILA *a*

Empirical evidence of vertical and seasonal shifts in nutrient limitation of planktonic primary producers in a deep karst lake (Morata et al., submitted)

INTRODUCTION (CHAPTERS 6 & 7)

In the past three decades the role of macronutrient limitation for phytoplankton growth in freshwater ecosystems has been well extensively studied (e.g. Guildford & Hecky, 2000). Traditionally, limnologists followed Schindler's phosphorus limitation paradigm (Schindler, 1978), which considers that phosphorus represents the main limiting resource for primary producers in temperate lakes (Sterner, 2008). However, many data, mostly based on enrichment experiments (e.g. Elser et al., 1990; Dodds, 2002), pointed out that nitrogen limitation in lakes could be more important than formerly supposed (Elser et al., 2007; Lewis & Wurtsbaugh, 2008). Temporal shifts in nitrogen and phosphorus limitation depending on specific phytoplankton requirements, as well as on changes in the relative importance of the nutrient sources can occur (e.g. Beardall et al., 2001; Elser et al., 2007; Harpole et al., 2011). Tilman (1976) predicted the nutrient co-limitation concept and the response of the community to shifts in nutrient balances in his classical experiences of resource-based competition theory, supporting the current *N+P phytoplankton control paradigm*

(Lewis & Wurtsbaugh, 2008) as a premise to elucidate the main forces controlling planktonic primary producers in lakes.

Nitrogen limitation occurs in lakes of all trophic categories (Lewis & Wurtsbaugh, 2008; Sterner, 2008). In oligotrophic lakes, the more sensitive stoichiometric relationships compared to eutrophic lakes (Bergström & Jansson, 2006) allows small variations in nutrient inputs promoting strong changes in the abundance and/or the community composition of phytoplankton. The significance of nitrogen for freshwater autotrophic production nowadays interplays with the great increase of total amount of nitrogen in the biosphere due to anthropogenic activities (Gruber & Galloway, 2008). Particularly, shifts in the relative nutrient supplies for autotrophs in aquatic environments (Bergström & Jansson, 2006; Elser et al., 2009), even in remote areas away from direct human impact, can be determined by the interplay of atmospheric sources and regional groundwater flows (Camacho et al., 2003c; Bergström & Jansson, 2006; Mladenov et al., 2011).

In a previous experiment Camacho et al. (2003c) found evidence for a possible nitrogen limitation for planktonic primary producers (PPP) growth in the holomictic Lake El Tejo. We hypothesized that seasonal and vertical changes in the nutrient limitation could occur according to the dynamics of nutrient inputs to the lake, and to the different nutrient and light availability at different lake layers. Based on this previous experience we performed four *in situ* bioassays to test nutrient limitation along the year and within the different lake strata. Phytoplankton growth in aquatic systems can be governed by the interaction of several factors, such as nutrients, grazing, vertical mixing and/or light availability (Kunz & Diehl, 2003; Sawatzky et al., 2006; North et al., 2007; Delgado-Molina et al., 2009; Helbling et al., 2013). We focused on determining the nature of nutrient limitation in different seasonal situations of vertical mixing and

stratification, with contrasting nutrients and light availability among lake strata, as well as in elucidating whether in all water layers phytoplankton growth was limited by the same factor, either the type of nutrient or light.

METHODS (CHAPTERS 6 & 7)

Field sampling, chemical and biological determinations

A field survey was undertaken at Lake El Tejo just before each bioassay was started. Vertical physical and chemical profiles were recorded at 0.5-1 m intervals in the central point of the lake. Dissolved oxygen was measured with a WTW Oxi91 field oxymeter, conductivity with WTW LF-191 probe and temperature with sensors installed in both devices. Vertical profiles of photosynthetically active radiation (PAR) were measured using a 4π scalar irradiance sensor.

Water samples for chemical and biological analyses were taken along the vertical profile with a double-cone fine-layer sampler as described in García-Gil & Camacho (2001). Samples for chemical analyses were treated adequately after collection to preserve them from alterations. Inorganic nutrients were analyzed according to APHA-AWWA-WEF (1992). Nitrate plus nitrite was measured by the cadmium-reductive method following spectrophotometric determination by the Griess reaction. Ammonium was measured by the indophenol blue method. Soluble reactive phosphorus (SRP) was measured by the ascorbic-acid molybdate method (see also chapter 3). Chlorophyll-*a* (chl-*a*) concentration was measured spectrophotometrically from acetone:DMSO (1:1 v/v) extract as described in Picazo et al. (2013).

Nanophytoplankton samples were preserved with neutral potassium iodine plus iodine solution. Afterwards they were concentrated and counted using an inverted light microscope as referred in Utermöhl's method (1958). Taxonomic identifications followed the references cited in Morata et al. (2003) and in this thesis (see chapter 3). Several individuals of each species (25-50 when available) were measured for biovolume calculation according to geometrical shapes proposed by Hillebrand et al. (1999) and Sun & Liu (2003).

Samples for autotrophic picocyanobacteria (APC) counting were preserved *in situ* with formaline 2 % v:v final concentration and refrigerated. Once in the laboratory, the samples were filtered on 0.2 µm black polycarbonate filters counting the autofluorescent cells with a Zeiss III fluorescence microscope as detailed in Camacho et al. (2003a).

Microcosm experimental design

Four *in situ* nutrient enrichment bioassays were performed in Lake El Tejo in May, July, and September 2003, and in January 2004 to cover the main different limnological situations of the lake, as well as the different water-feeding balances. At each experimental date, according to the physical and chemical profile obtained at the central lake point, two testing depths (subsurface and middle depth) were selected for this bioassay. Water was pumped from each depth to the boat with the double-cone fine-layer sampler, randomly filling experimental containers (5 L acid-washed transparent polyethylene enclosures) that were maintained in the dark during the process. Subsequently containers were fertilized with inorganic nutrients (nitrogen, phosphorus and silica) alone or combined, resulting in eight treatments combinations: C (control-no nutrients added), N (nitrogen addition: NH_4NO_3 added to 30 µM-N final concentration), P

(phosphorus addition: Na_2HPO_4 added to 2 μM -P final concentration), Si (silica addition: Na_2SiO_3 added to 14 μM -Si final concentration), and the combinations of nutrients NP, NSi, PSi and NPSi in the above mentioned concentrations. The assayed nutrient concentrations were always higher than the natural maxima previously observed in Lake El Tejo (Camacho et al., 2003c; Morata et al., 2003; see also chapter 4) to promote a quick phytoplankton response avoiding changes in the community composition. All treatments were replicated three times at each incubation depth, resulting in 24 (8 treatments x 3 replicates) experimental enclosures per depth per experimental date (Fig. 6.1; see also *Annex IV*). Complementary samples were taken as well during the field experimental setting to assess the chemical and biological conditions at the beginning of incubations ($t=0$) for each microcosms.

Additionally to the two assayed depths in each experimental date, during the strongest stratification period (both July and September bioassays), the middle depth water (metalimnion during the stratification) was tested in two different ways; 1) at its original depth but simplifying the assay by removing silica addition (resulting four treatment combinations: C, N, P and NP); and 2) middle depth water fertilized as explained above (8 treatments) and then incubated still within the metalimnion layer but hanged upward in the water column (in order to avoid light restriction in phytoplankton response) at a depth with around 13 % of surface irradiance (see black arrows in Fig. 6.2 for the enclosures position in each bioassay, and the corresponding percentage of PAR in Figs. 6.3 and 6.4).

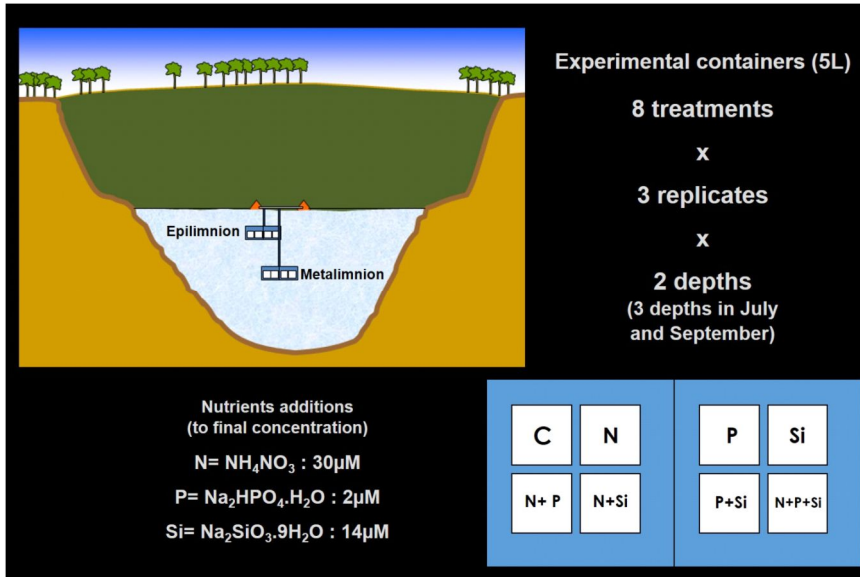


Figura 6.1. Esquema del diseño experimental de enriquecimiento de nutrientes llevado a cabo en la Laguna de El Tejo en mayo, julio y septiembre de 2003 y enero de 2004 (véase *Anexo IV*).

Figure 6.1. Schematic microcosm experimental design (nutrient enrichment bioassays) performed in Lake El Tejo in May, July and September 2003 and January 2004 (see also *Annex IV*).

In all cases, each experimental set was hanged on the center of the lake at the mentioned depths using a buoys system, and was incubated for 3 days (4 days in January). The selection of the length of the bioassays was based on previous experiences (Camacho et al., 2003c), and was short enough to avoid changes in the community composition, but long enough to get a growth response to the limiting nutrient. After *in situ* incubation, experimental enclosures were immediately processed and inorganic nutrients and chlorophyll concentrations, among other variables, were determined as previously explained.

Chl-*a* concentration in each microcosm was used as the main response variable for phytoplankton growth (Camacho et al., 2003c). Soluble reactive phosphorus

(SRP) and total phosphorus (TP) analyses were also performed in each microcosm both at the beginning and at the end of incubations to test the relative P incorporation into biomass, hypothetically increasing when the SRP:TP ratio was decreasing. Also we tested different variables related with phytoplankton abundance and biovolumen (totals, groups, diversity) in order to determine whether the response of each variable to nutrient availability was different (see chapter 7 for PPP). The impact of nutrient additions was statistically evaluated through one-way ANOVA, with *post-hoc* analyses (Tukey test) to compare among treatments, using SPSS 19.0 statistical software.

RESULTS

Physical and chemical characteristics of lake water and phytoplankton populations

During the assayed period temperature profiles in Lake El Tejo showed a slight stratification in May, a strong stratification in July and September, and entire mixing in January (Fig. 6.2). The selected depths of the bioassays (see black arrows in Fig. 6.2 and specific data in Figs. 6.3 and 6.4) were conditioned by temperature and oxygen distribution and irradiance at the different dates.

In the three assayed dates of the stratification period, soluble inorganic phosphorus was very scarce ($<0.1 \mu\text{M}$) in the water column except for higher concentrations in deep layers, although it was moderately higher in January (Fig. 6.2). Similarly, during the assayed dates in stratification, dissolved inorganic nitrogen (nitrate+nitrite+ammonium: DIN) concentrations were low in surface waters ($<2 \mu\text{M}$) but increased in deep layers. In January, DIN concentrations were $3.5\text{-}5 \mu\text{M}$ along the entire vertical profile. In May silica concentrations were low

through epi- and metalimnetic layers (2.5-5.5 μM) but greatly increased with depth (12-20 μM), whereas in July and September higher concentrations were achieved along water column (8-18 μM in epi- and metalimnetic layers), slightly dropping again in January.

Chl-*a* concentrations were low in upper layers during stratification (1.4-2.9 $\mu\text{g L}^{-1}$). In this period they augmented with depth and increased within the lower oxic-anoxic interface both in July (16.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 22 m) and September (14.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 23 m), reaching almost ten times greater concentrations than the surface. However, in January chl-*a* concentration was relatively uniform along the vertical profile and higher (2.6-3.7 $\mu\text{g L}^{-1}$) compared with epi- and metalimnetic concentrations during stratification.

In relation with phytoplankton populations (detailed in chapter 7), during early stratification large dinoflagellates (with low cell chl-*a* content) dominated surface waters, whereas smaller diatoms and chlorophytes abounded in deep waters. Contrastingly, in summer, large dinoflagellates and Zygnematophyceae dominated in epi- and metalimnetic layers. The abundance of planktonic primary producers (PPP) decreased in the entire water column in January, being then dominated by dinoflagellates, APC and cryptophytes.

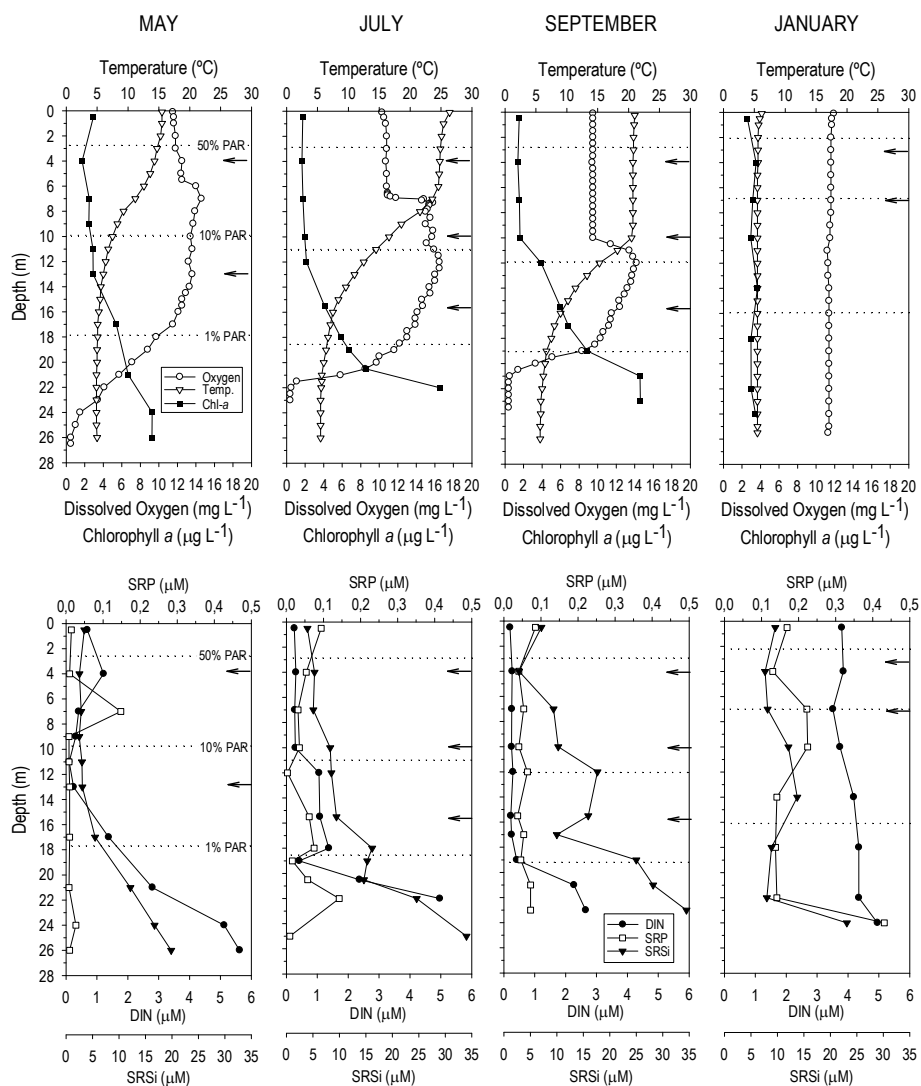


Figura 6.2. Perfiles verticales de algunas variables limnológicas obtenidas en la Laguna de El Tejo en mayo, julio y septiembre de 2003 y enero de 2004. Las líneas horizontales punteadas indican 50 %, 10 % y 1 % de la radiación (PAR). Las flechas negras señalan las profundidades seleccionadas para cada bioensayo *in situ*. (Oxygen: Oxígeno disuelto; Temp.: Temperatura; Chl-*a*: Clorofila *a*; DIN: Nitrógeno inorgánico disuelto; SRP: Fósforo reactivo soluble; SRSi: Silicato reactivo soluble)

Figure 6.2. Vertical profiles of several limnological variables in Lake El Tejo obtained in May-July-September 2003 and January 2004. Dashed horizontal lines indicate 50 %, 10 % and 1 % of surface irradiance (PAR) respectively. Black arrows show the select depths of each *in situ* bioassay. (Oxygen: Dissolved Oxygen; Temp.: Temperature; Chl-*a*: Chlorophyll-*a*; DIN: Dissolved inorganic nitrogen; SRP: Soluble reactive phosphorus; SRSi: Soluble reactive silica)

Effects of enrichment on phytoplankton growth estimated by chl-*a* concentration

The effect of nutrients additions on phytoplankton growth was estimated through variations in chl-*a* concentrations (as an indirect measure of phytoplankton biomass) by comparing the response of the nutrient amended treatments among them once variations in the control were subtracted (Fig. 6.3, Table 6.1).

With respect to subsurface waters (epilimnion during the stratification period), in early stratification (May) chl-*a* increased significantly in treatments jointly containing N and P (in both NP and NPSi treatments; Fig. 6.3, Table 6.1). Both in July and September, the addition of inorganic nitrogen (N) to the epilimnetic samples stimulated a significant increase of chl-*a* after incubation (Fig. 6.3, Table 6.1). Although when both N and P (NP and NPSi treatments) were jointly added higher values of chl-*a* were found, the significantly positive response when only N was amended demonstrated N-limitation in surface layers along stratification. On the other hand, lower values of chl-*a* concentration, similar to the control, were persistently found in treatments with P and Si, either alone or combined (PSi). It is noteworthy that experimental enrichments during stratification period were carried out coinciding with the lower concentrations of inorganic nutrients in epilimnetic waters (Fig. 6.2). In January, in subsurface waters there were not significant differences in chl-*a* concentrations between control enclosures and each nutrient addition treatment (Table 6.1), neither among treatments. Remarkably, when comparing with the stratification period, there were higher dissolved inorganic nutrients concentrations through the water column but lower temperature and light availability (Fig. 6.2).

In relation with middle depth waters (metalimnion during stratification), no statistically significant differences were found in any treatments and season tested

when water was incubated at its own depth (Fig. 6.3, middle row) which shows that light could primarily be the limiting factor for phytoplankton growth, although in July the results though not statistically significant suggest N-limitation. However the assays performed in July and September with middle depth water incubated upwards (at the onset of the thermocline, at > 13 % PAR; Figs. 6.2 and 6.3) yield significantly higher chl-*a* concentrations when inorganic N was added either alone or combined, as previously reported for some of the bioassays in subsurface layers (Fig. 6.3, Table 6.1), which shows that overcoming light limitation reveals a secondary nutrient limitation by N. Notably, concentrations of inorganic nutrients in the metalimnion were scarcer during stratification periods than during mixis (Fig. 6.2).

The SRP:TP ratios based on the changes in SRP and TP concentrations within each microcosm were used to test P incorporation into biomass, hypothetically increasing when the SRP:TP ratio was decreasing. As a general pattern, the SRP:TP ratio was lower (more P incorporation into biomass) in all the P amended treatments (Fig. 6.4), except in a few cases when there appear not significant differences or the pattern was the opposite (May in subsurface samples).

Tabla 6.1. Resultados de los ANOVA de una vía sobre las concentraciones de clorofila *a* (chl-*a*) en cada fecha y profundidad ensayada en las experiencias de enriquecimiento de nutrientes. Tras los contrastes *post-hoc* de Tukey se obtuvieron los grupos homogéneos (a, b, ó c) y los tratamientos dentro de cada grupo, en la tabla ordenados de menor a mayor significatividad. Nótese que las profundidades de enero no corresponden con epi- y metalimnion, sino con profundidades superficiales y medias dentro del mixolimnion cuando la laguna no estaba estratificada.

Table 6.1. Results from one-way ANOVAs on chlorophyll-*a* (chl-*a*) concentrations at each date and assayed depth in the enrichment experiences. Homogeneous groups (a, b, or c) and treatments within each group are ordered by increasing means (left to right), and were obtained after *post-hoc* Tukey contrasts. Note that January depths do not correspond to the epi- and metalimnion, but to the shallowest and deepest samples assayed in the mixolimnion, since the lake was not stratified.

	Nutrient groups			
	Chl- <i>a</i> concentration			
	<i>P</i>	Tukey groups		
	a	b	c	
EPILIMNION				
May	***	NP, NPSi	NP, PSi	N, NSi, Si, P, PSi
July	***	NP, NPSi	N, NSi	P, PSi, Si
September	***	NP, NPSi	N, NSi	P, PSi, Si
January (superficial depth)	n.s.			
METALIMNION (incubated at its depth)				
May	n.s.			
July	n.s.			
September	n.s.			
January (medium depth)	n.s.			
METALIMNION (incubated at increased light availability)				
July	***	N, NP, NSi, NPSi	P, PSi, Si	
September	***	NP, NPSi	N, NSi	P, PSi, Si

ANOVA *P*-value: *** *P*<0.001; n.s., not significant

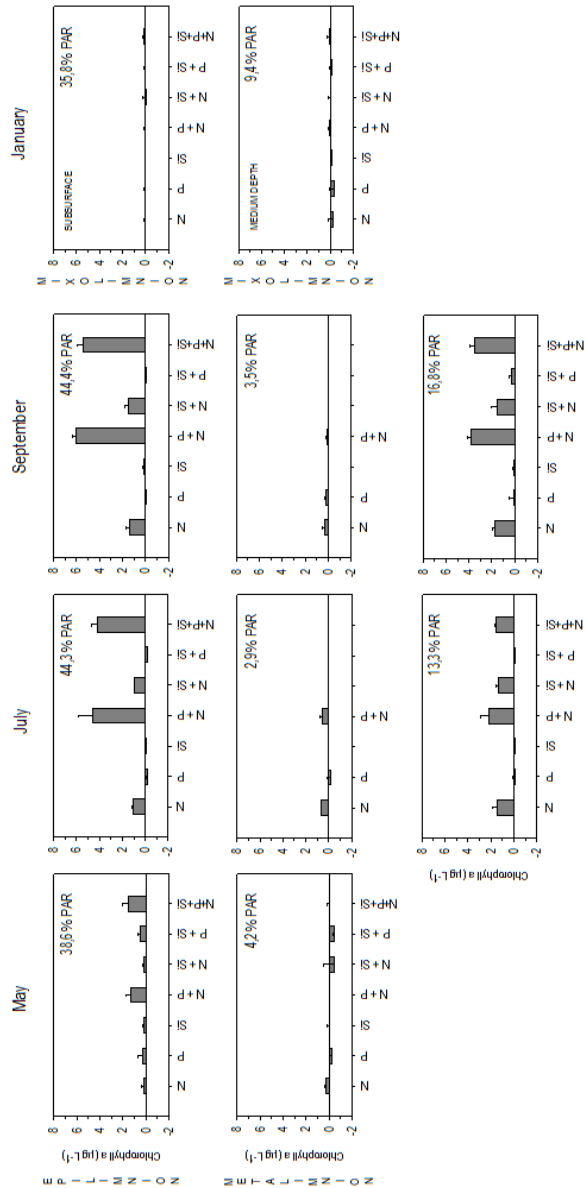


Figura 6.3. Variación de concentración de clorofila *a* (chl-*a*) (medias \pm SD de tres réplicas) respecto al control en los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica (profundidades relativamente más someras).

Figure 6.3. Variations of chlorophyll-*a* (chl-*a*) concentrations (means \pm SD of three replicates) with respect to control conditions in the nutrient amendment treatments for each assayed depths in the four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

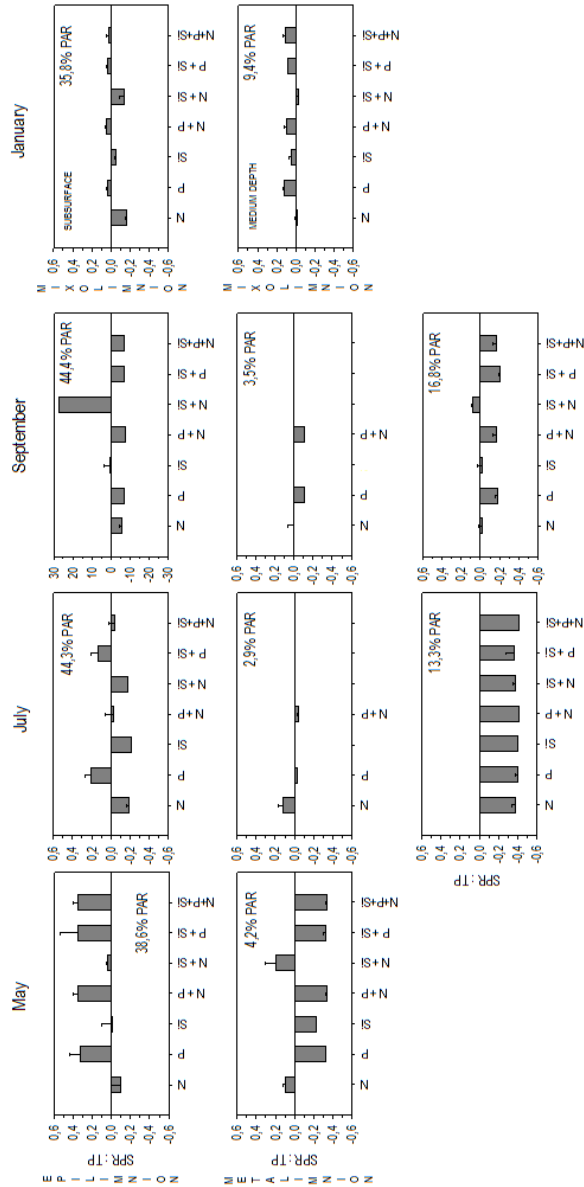


Figura 6.4. Variación de la razón fósforo reactivo soluble:fósforo total - SRP:TP (medias \pm SD de tres réplicas) respecto al control en los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica (profundidades relativamente más someras). Nótese la escala diferente en la muestra epilimnética de Septiembre.

Figure 6.4. Variations of soluble reactive phosphorus to total phosphorus - SRP:TP - ratios (means \pm SD of three replicates) with respect to control conditions in the nutrient amendment treatments for each assayed depths in the four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth). Note the different scale for the results of the epilimnetic sample in September.

DISCUSSION

Primary production in the oligo-mesotrophic Lake El Tejo is largely controlled by the interplay between phytoplankton demand and the availability of inorganic macronutrients (mainly nitrogen and/or phosphorus). This also occurs in many other aquatic systems (e.g. Guildford & Hecky, 2000), though in deep layers light overcomes nutrients as limiting factor. Specifically, our *in situ* bioassays evidence temporal and spatial shifts in the limiting nutrient. Thereby for subsurface waters our data highlighted significant N-limitation during the marked stratification season in coincidence with nutrient exhaustion and low phytoplankton abundance (see chapter 7). In metalimnetic layers similar results were found when light availability was artificially augmented by exposing phytoplankton to increased irradiances exceeding 10 % of surface irradiance (PAR) at shallower depths, but not when maintained under the low light environment they experience near the chemocline. This suggests that for deep strata along summer phytoplankton growth was limited primarily by light and secondarily by N. In deep waters of strongly stratified lakes nutrient limitation mechanisms are less clear compared with upper strata (Wurtsbaugh et al., 2001; Sawatzky et al., 2006) because light availability could be a key limiting factor (Camacho et al., 2003a; Kunz & Diehl, 2003).

Contrastingly our results show that, at the beginning of stratification (May) in subsurface waters phytoplankton growth was likely P-limited, while light availability was still the limiting factor in deep waters. However as the stratification season advanced there was a shift in the nutrient limitation from P to N. This occurred in parallel with the progressive N depletion in the upper layers and the decrease of the N-rich groundwater inputs during the driest summer months. The highest response to N plus P in the epilimnion, where nutrients resulted limiting compared to light, was expected due to the spring nutrient

depletion, since in enclosures finally one or the other nutrient becomes limiting for phytoplankton growth. In this situation additional nutrient loads (as occurred in bioassays) stimulated growth again, but only at the strata where light availability is over a critical point. As in other studies, phytoplankton growth in the photic zone is mainly controlled by irradiance and temperature in winter and by nutrients in summer (Delgado-Molina et al., 2009; Helbling et al., 2013). However in our case the light availability defining the borders of the functional photic zone is higher than the usually considered 1 % of surface irradiance. This is shown by the fact that metalimnetic samples incubated at their own depths (more than 1 % PAR) did not respond quickly to nutrient amendments. Moreover, no trend was found that could show that these results might be due mainly to the fact that growth rates could be too short to be evidenced by short-term incubations.

The observed vertical and seasonal shifts between N and P limitation in Lake El Tejo connect with the idea that moderate nutrient pulses can have a big impact on oligotrophic lakes (Elser et al., 1990, 2007; Sawatzky et al., 2006). Specifically for inland standing waters, there are few integrative works as our bioassay pointing out shifts in the limiting nutrient along the year and/or within the different layers of the water column (Harpole et al., 2011). Here we document the occurrence of these spatial/temporal changes and pay attention to the dynamic features that regulate phytoplankton growth. In addition, several data recorded by other authors emphasize that N and P limitation in lakes are not reciprocally exclusive (Davies et al., 2004; North et al., 2007). According to our observations it could be possible a spring nutrient co-limitation as Lewis & Wurtsbaugh (2008) exemplified in *N+P phytoplankton control paradigm* subject, though P additions showed a marked higher response, compared with any other nutrient amendment. However, our results showing higher growth when both N and P were added should not be necessarily interpreted as a simultaneous co-limitation. Instead they

could also show a common response in bioassays in which the addition of one nutrient alone could induce limitation by other nutrients, and this fact is avoided when both nutrients are added together, thus the higher response of joint N and P additions. Anyway, Allgeier et al. (2011) demonstrated that freshwater ecosystems tended to have frequent synergistic responses to dual nutrient enrichment (i.e. the response was greater than predicted by an additive model), and this could support the idea of a possible co-limitation.

Significant N-limitation found during summer in this temperate lake is consistent with the preliminary results obtained by Camacho et al. (2003c) for these periods in a laboratory enrichment bioassay performed at the last part of the stratification period in 1997, and overall our results confirm the hypothesis of probable change of nutrient limitation along the year, at least for the upper layers of the lake, as well as the different limiting factors for different strata. P availability is widely seen as the main limiting factor for primary production in freshwaters systems (Sterner, 2008), especially in the northern hemisphere with a large proportion (27 %) of the tested lakes exclusively being P-limited (Dodds, 2002). However, limnologists gradually found evidence of N-limitation in several temperate lakes (11 % of tested cases according to Dodds, 2002), with these results sometimes supported by nutrient enrichment assays (e.g. Elser et al., 1990), indicating that N-limitation may occur more frequently than formerly believed (Elser et al., 2007; Lewis & Wurtsbaugh, 2008). On the other hand in this kind of high alkalinity karstic lakes carbonate precipitation events strongly remove dissolved P from water column (e.g. Dittrich & Koschel, 2002; Romero-Viana et al., 2008), especially in spring-summer due to the pH increase linked to higher photosynthetic rates and higher temperatures and stability, and this lead to a decrease in bioavailable P. In this context P-limitation is expected but here paradoxically we found a significant summer N-limitation. Similarly, also in humic lakes P-limitation is assumed due to complex processes catching P in

presence of humic substances (Jones, 1992) but several of these lakes are N-limited (Pålsson & Granéli, 2004). Jansson et al. (1996) found that N-limitation in this sort of lakes may be favored by mixotrophic organisms grazing on P-rich bacteria. In fact, algal composition in Lake El Tejo (Morata et al., 2003; see also chapters 5 and 7) reveal substantial presence of potential mixotrophs (e.g. cryptophytes and dinophytes), habitually inhabiting oligotrophic lakes (Jansson et al., 1996) when the shift to mixotrophic metabolism in some algae seems to provide them an advantage in aquatic systems with scarcity of nutrients (Carrillo et al., 2006). However, although all these processes could play a role in explaining the dominance of N over P as limiting nutrient in the upper layers of Lake El Tejo, temporal changes in the relative importance of the different nutrient sources, mainly groundwater and atmospheric deposition, are likely to mainly explain these shifts in nutrient limitation between N and P.

Other aspect related to the response to P by the PPP is also shown by the behavior of the SRP:TP ratios, which show that P amendments allow a higher incorporation of P to biomass relative to the inorganic phosphorus (SRP) still remaining bioavailable, though these aspects deserve more attention and specific experiments have been designed to address them. Also, the relative difference in the cell specific chl-*a* concentration and its ratio to cell biovolume can explain the different pattern found when the response of either the chl-*a* concentration and the biovolume are compared.

In the northern hemisphere N-limitation has been also found in other lakes (Lewis & Wurtsbaugh, 2008; Sterner, 2008; Baron et al., 2011). Contemporary intensive human activities explain the current strong atmospheric N-deposition values recorded (Fig. 6.5). Lake El Tejo is located in the Mediterranean region mainly influenced by winds from Atlantic Ocean and Sahara Desert. In recent decades this area has greatly been affected by droughts, high irradiation periods and P-

rich dust from Saharan storms (Escudero et al., 2005; Mladenov et al., 2011). The later potentially plays a relevant role in an ongoing eutrophication in Mediterranean freshwater bodies, particularly in oligotrophic lakes (e.g. Pulido-Villena et al., 2008). Explicitly, common spring and/or summer Saharan storms impacting eastern Spain could disturb the phytoplankton populations in Lake El Tejo if punctual or gradual dust deposition occurs simultaneous with P-limitation, increasing P supply and in turn enhancing a change in the limiting nutrient. On the other hand, according the European Environmental Agency (EEA, 2007, 2011) in the area where the lake is located atmospheric N-deposition is low ($<0.6 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$; see Camacho et al., 2003c), as shown in figure 6.5 . Bergström & Jansson (2006) settled a meta-analysis with data from 42 northern hemisphere remote lakes concluding that lakes with an annual N-deposition of $<2.5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ are N-limited, whereas with $2.5\text{-}5.0 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ they are NP co-limited and those having atmospheric loads $>5.0 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ are P-limited. Here we included empirical experimental evidence confirming that in Lake El Tejo primary production is N-limited along stratification in upper layers, and this agrees with the threshold of $<2.5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ for atmospheric N-deposition registered at this area (Fig. 6.5). Nevertheless the spring possible co-limitation with P (or only P limitation) shows that it is actually the balance between the nutrient sources for the lake which determines the temporal changes in the limiting nutrient. It is noticeable that an increase in N-deposition could change the type of nutrient limitation in a system from N to P-limitation. This supports the hypothesis that probably in northern hemisphere lakes were originally N-limited (Baron et al., 2011) and higher external nutrient loads amounts along time lead those systems to P-limitation, the usual limitation referred in literature for European and North-American lakes (e.g. Sterner, 2008). In addition, this nutrient deposition contributes to clarify why many current data from those areas indicate that N-limitation is more habitual than formerly supposed (e.g. Elser et al., 2007). Moreover, N-limitation in Lake El Tejo occurs during summer, when

groundwater N-sources are less important than other relatively richer in P (such as atmospheric deposition in the area caused by Saharan dust), because groundwater flow is limited. Then further atmospheric N input can disturb stoichiometric ratios (Bergström & Jansson, 2006; Elser et al., 2009) and could lead to strong alterations in abundance and/or phytoplankton community composition. Furthermore, the shift in nutrient limitation along the year and within depths is the result of the balance between different inputs as well groundwater inflows, atmospheric depositions and stratified/mixing events.

Figura 6.5. Evolución de la deposición atmosférica de nitrógeno ($\text{eq ha}^{-1} \text{y}^{-1}$) en Europa en las pasadas décadas (datos de 1998 de Camacho et al. (2003c) y datos de 1998-2004-2010 de la Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA, 2007, 2011)). Nótese que, a pesar de la reducción en la escala, a partir de 2004 los datos muestran una mayor precisión territorial. La línea punteada señala el límite máximo de influencia de aerosoles en Europa (deposición de polvo sahariano estival) y las flechas negras indican la dirección del impacto de los vientos cargados en fósforo procedentes del desierto del Sahara (datos de Mladenov et al., 2011). La estrella negra marca la localización de la Laguna de El Tejo en la Península Ibérica.



Figure 6.5. Atmospheric nitrogen deposition ($\text{eq ha}^{-1} \text{y}^{-1}$) evolution in Europe in the last decades (1998 data redrawn from Camacho et al. (2003c) and 1998-2004-2010 data from European Environmental Agency (EEA, 2007, 2011). Noted that despite the reduced scale, since 2004 data illustrate a more precise territorial detail. Dashed line indicates the maximum influence limit of aerosols in Europe (deposition of summer Saharan dust) and black arrows show the direction of impact from Sahara desert phosphorus-rich winds (data from Mladenov et al., 2011). Black star points out the location of Lake El Tejo in the Iberian Peninsula.

CAPÍTULO 7

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL *IN SITU* DE LA LIMITACIÓN POR NUTRIENTES (II): PRODUCTORES PRIMARIOS PLANCTÓNICOS

INTRODUCCIÓN

Este capítulo es la continuación del anterior, *Capítulo 6: Evaluación experimental in situ de la limitación por nutrientes (I): Clorofila a*, presentando aquí los resultados de las experiencias de enriquecimiento de nutrientes y la dinámica vertical-temporal del fitoplancton de la Laguna de El Tejo en diferentes épocas del año del periodo 2003-04. Dichos resultados se estructuran en función del análisis de las distintas variables que conciernen de forma específica a los productores primarios planctónicos (PPP), como son la abundancia y el biovolumen del fitoplancton en distintos niveles de análisis (totales, fracción picoplanctónica vs. nanoplanctónica, grupos taxonómicos, especies de presencia relevante) y los índices de diversidad fitoplanctónica.

A modo de recordatorio, en la terminología utilizada nos referimos al fitoplancton total como los productores primarios planctónicos (PPP) que se dividen en las fracciones pico- y nanofitoplanctónica. En la Laguna de El Tejo la fracción de organismos procariotas autotróficos es sustentada principalmente por las picocianobacterias autotróficas (APC) y el resto de PPP son microalgas nanoplanctónicas (algae) que comprenden varios grupos.

Los detalles respecto al interés y objetivos de esta investigación así como la metodología específica se encuentran desarrollados en la introducción del capítulo 6. La relación entre ambos capítulos se pone de manifiesto en el texto del presente capítulo con la referencia en múltiples ocasiones al precedente (texto y figuras), además de una discusión global que enlaza todos estos resultados.

RESULTADOS

Dinámica fitoplanctónica: Abundancia y biovolumen. Diversidad

En la Laguna de El Tejo durante el periodo de estudio 2003-04 el fitoplancton presentó variaciones temporales y verticales, no sólo en términos de abundancia sino también en cuanto al biovolumen, y tanto en cuanto a los totales (PPP) como teniendo en cuenta los diferentes grupos taxonómicos, así como diferenciando organismos pico- y nanofitoplanctónicos.

En el caso de la abundancia total de los PPP, en la mayoría de las muestras más del 95% de densidad correspondía a las picocianobacterias (APC; Fig 7.1 fila superior). Por ello la mayor densidad fitoplanctónica se encontró en las aguas del fondo, sin embargo durante la estratificación térmica se observaron unos marcados picos adicionales en aguas metalimnéticas de unos 2.8×10^5 cél mL⁻¹ (un pico hacia los 15.5 m en julio y dos picos en septiembre, uno en la misma profundidad y otro más arriba). En cambio, durante la mezcla invernal (enero) se detectó un pico de densidad de los PPP en aguas superficiales (4.3×10^5 cél mL⁻¹ a 0.5 m en enero), si bien se observó una mayor uniformidad vertical (en promedio 1.8×10^5 cél mL⁻¹, sin considerar el valor a 0.5 m) en comparación a los perfiles obtenidos durante los meses estivales con una marcada estratificación térmica.

Puesto que la densidad de las APC fue en general dos órdenes de magnitud mayor que la del nanoplancton, los perfiles de abundancia total de los PPP son en realidad un reflejo de los de las picocianobacterias. Por ello, se han representado los resultados de la fracción de organismos nanofitoplanctónicos por separado (Fig. 7.1 fila inferior; nótese que los valores de dicha fracción se corresponden a la adición de los valores de densidad de cada grupo algal para cada profundidad y fecha). Se observa que al inicio de la estratificación, por debajo de un pico en el metalimnion a 7 m las algas mostraron un gradual aumento en profundidad, pero una vez bien establecida la estratificación térmica dichos organismos presentaron picos de densidad en estratos con una incidencia lumínica alrededor del 10 % respecto a la incidente, profundizando los máximos conforme avanzaba la estación (2500 cél mL⁻¹ a 10 m en julio; 3400 cél mL⁻¹ a 12 m en septiembre). La abundancia del nanofitoplancton responde en gran parte al aumento de radiación y profundización de la termoclina (véase también Fig. 6.2 fila superior). Durante la mezcla invernal la densidad fue menor y más uniforme a lo largo de la columna de agua en comparación con los momentos de estratificación térmica vertical (en promedio 1100 cél mL⁻¹, sin tener en cuenta 2000 cél mL⁻¹ a 12 m).

Por otro lado, el biovolumen total de los PPP (Fig. 7.2 fila superior) vino determinado por la fracción nanoplanctónica, constituyendo las APC una fracción relativamente pequeña. En la estratificación temprana (mayo) los mayores valores del biovolumen se localizaron en aguas epilimnéticas (1.4-1.8 x 10⁶ μm³ mL⁻¹ entre 0.5-7 m), mientras que durante la plena estratificación estival los mayores valores se encontraron en aguas metalimnéticas y gradualmente más profundos (1.1 x 10⁶ μm³ mL⁻¹ a 10 m en julio; 1.6 x 10⁶ μm³ mL⁻¹ en 10 m en septiembre). En todos estos casos, coincidiendo con momentos de estratificación térmica vertical de las aguas los máximos se situaron en la zona de la columna de agua con una incidencia de radiación fotosintéticamente activa (PAR) superior al

10%, aunque los valores se mantenían bastante altos hasta varios metros por debajo. Por otra parte, durante la mezcla invernal el biovolumen presentó una mayor uniformidad vertical, si bien los mayores valores para esta variable permanecieron en aguas de profundidad media (por debajo del 10% de PAR, $1.0 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$ a 14 m).

En el caso del biovolumen, al separar las fracciones de organismos pico- y nanofitoplanctónicos (Fig. 7.2 fila superior) observamos que en periodos de estratificación en las aguas superficiales dominaba el nanofitoplancton mientras que en aguas profundas (por debajo del 1% de PAR) aumentaba la importancia relativa de la fracción de las APC. Los perfiles verticales de la abundancia de la fracción del nanofitoplancton y del biovolumen total de los PPP (determinado por el nanofitoplancton) presentaron cierta similitud con los perfiles correspondientes a la concentración de oxígeno disuelto (véase Fig. 6.2 fila superior), mientras que los perfiles verticales de abundancia total de los PPP (determinado por las APC) y biovolumen de la fracción de las APC fueron similares a la concentración de chl-*a*.

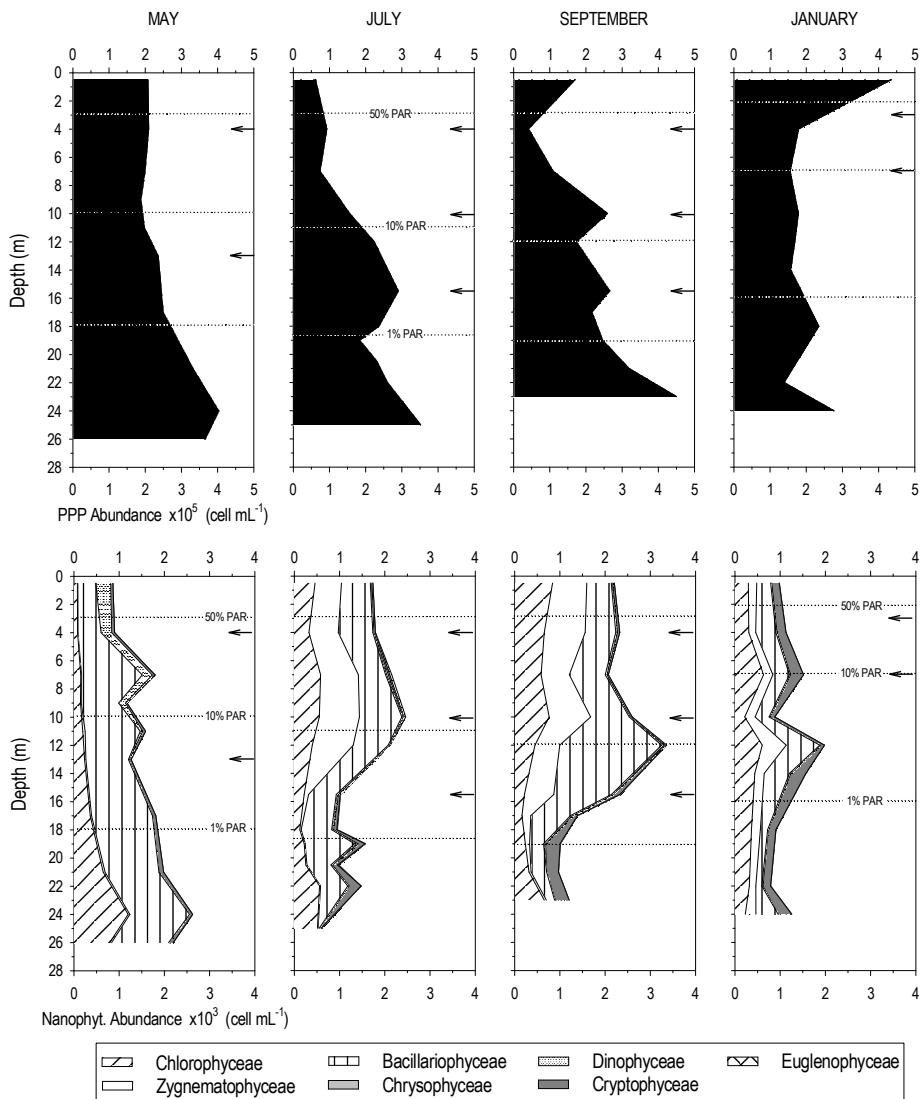


Figura 7.1. Perfiles verticales de abundancia fitoplanctónica total (PPP = nanofitoplancton + picocianobacterias-APC; fila superior) y abundancia del nanofitoplancton desglosando los datos para los grupos algales (fila inferior), obtenidos en la Laguna de El Tejo en Mayo-Julio-Septiembre de 2003 y Enero de 2004. Las líneas horizontales punteadas indican respectivamente 50 %, 10 % y 1 % de la radiación superficial (PAR). Las flechas negras señalan las profundidades seleccionadas en cada experiencia de enriquecimiento *in situ*.

Figure 7.1. Vertical profiles of total phytoplankton abundance (PPP = nanophytoplankton + autotrophic picocyanobacteria-APC; upper row) and nanophytoplankton abundance for each algal group (bottom row) obtained in Lake El Tejo in May-July-September 2003 and January 2004. Dashed horizontal lines indicated 50 %, 10 % and 1 % of surface irradiance (PAR). Black arrows show the select depths of each *in situ* bioassay.

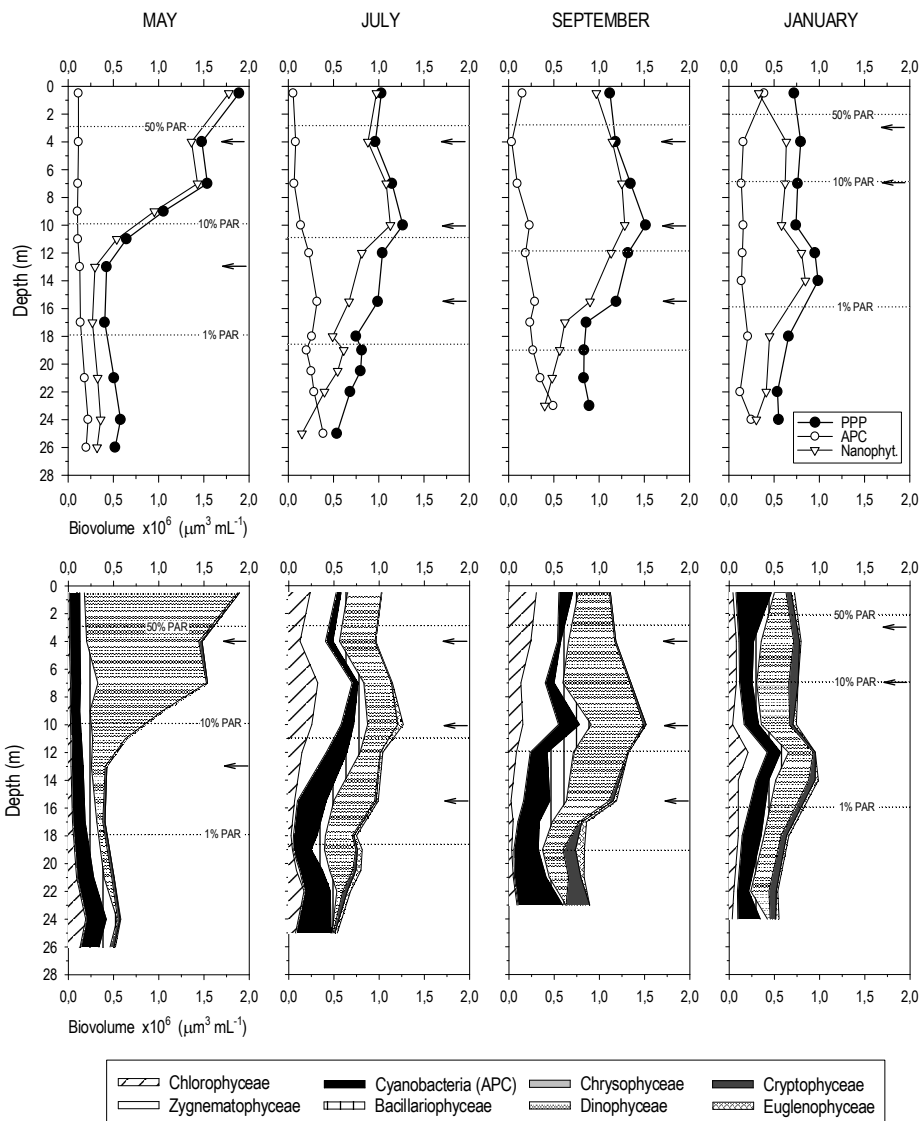


Figura 7.2. Fila superior: Perfiles verticales de biovolumen total del fitoplancton (PPP: productores primarios planctónicos; círculo negro), biovolumen de la fracción de las APC (círculo blanco) y biovolumen de la fracción del nanofitoplancton (triángulo blanco). Fila inferior: Perfiles verticales del biovolumen total del fitoplancton desglosado en los diferentes grupos algales. Perfiles obtenidos en la Laguna de El Tejo en Mayo-Julio-Septiembre de 2003 y Enero de 2004. Las líneas horizontales punteadas indican respectivamente 50 %, 10 % y 1 % de la radiación superficial (PAR). Las flechas negras señalan las profundidades seleccionadas en cada experiencia de enriquecimiento *in situ*.

Figure 7.2. Upper row: Vertical profiles of total phytoplankton biovolume (PPP: Planktonic primary producers; black circle) as well as their fractions concerned to APC (white circle) and nanophytoplankton (white triangle). Bottom row: Vertical profiles of total phytoplankton biovolume separated in the different algal groups. Vertical profiles obtained in Lake El Tejo in May-July-September 2003 and January 2004. Dashed horizontal lines indicated 50 %, 10 % and 1 % of surface irradiance (PAR) respectively. Black arrows show the select depths of each *in situ* bioassay.

La variabilidad de la composición fitoplanctónica a nivel de los grandes grupos algales explica las diferencias entre abundancia y biovolumen (Figs. 7.1 y 7.2, fila inferior). Tal y como comentamos anteriormente, las APC en abundancia eran dominantes en la Laguna de El Tejo durante todo el periodo de estudio y en toda la columna de agua, pero no en biomasa. Al inicio de la estratificación (mayo) en números de individuos en la fracción nanoplanctónica dominaban las diatomeas en todo el perfil, las dinofíceas en el epilimnion y las clorofíceas y criptofíceas en aguas profundas, lo que se tradujo en un marcado pico de biovolumen constituido por las grandes dinofíceas en las aguas epilimnéticas y un menor biovolumen total en las aguas profundas más o menos repartido entre APC, clorofíceas y diatomeas. Bien entrada la estratificación (julio y septiembre) las aguas epi- y metalimnéticas mostraban como nanofitoplancton dominante en abundancia las zygnematofíceas, clorofíceas y diatomeas, éstas últimas con máximos más profundos. Sin embargo, en términos de biovolumen se observaba una gran preponderancia de las dinofíceas. Por otra parte, el hipolimnion especialmente en septiembre se diferenciaba por una importante contribución de las criptofíceas en número y también en biovolumen. El biovolumen en este estrato estaba constituido también, en gran parte por las APC y en menor proporción por las euglenofíceas. En la mezcla invernal, la densidad nanofitoplanctónica de la columna de agua estaba dominada por diatomeas, clorofíceas, zygnematofíceas y criptofíceas con una contribución entre ellas relativamente más homogénea y con poca diferenciación en el perfil vertical. Sin embargo el biovolumen, mucho más reducido que en las otras épocas del año, estaba constituido principalmente por dinofíceas y APC.

A nivel específico la dinámica temporal y vertical que mostraron las especies del nanofitoplancton se puede resumir como sigue: las pequeñas diatomeas céntricas del género *Cyclotella* (principalmente pertenecientes al conjunto denominado *Cyclotella delicatula* group; véase capítulo 5) estuvieron presentes en toda la

columna en todas las estaciones. En aguas superficiales al inicio de la estratificación la comunidad era sustentada por dichas diatomeas y las dinofíceas *Ceratium hirundinella* y *Parvodinium umbonatum*. Con el avance de la estación *P. umbonatum* fue más importante hacia aguas metalimnéticas, siendo sucedido por las clorofíceas unicelulares *Tetraëdron minimum*, *Oocystis lacustris*, y varias especies de zygmatofíceas del género *Cosmarium*. Éstas desplazaron su pico de población en el perfil vertical siguiendo la profundización de la termoclina con el avance del verano. Por otra parte, en las aguas de la oxiclina durante la estratificación, las especies dominantes fueron varias criptofíceas de los géneros *Plagioselmis* y *Cryptomonas* y las APC del género *Synechococcus*, si bien al inicio de la estratificación en la oxiclina la densidad de *Cyclotella* spp. y clorofíceas (principalmente *T. minimum*) fue destacable. Durante la mezcla invernal, se produjo un descenso de las especies nanofitoplanctónicas, siendo las más abundantes especies pequeñas, como *C. delicatula*, *T. minimum* y *Cosmarium abbreviatum*.

La diversidad algal en la Laguna de El Tejo durante el periodo de estudio también presentó variaciones tanto temporales como verticales (Fig. 7.3). En términos de riqueza (S), y sin considerar las APC, el número de especies por muestra habitualmente se encontraba en torno a las 30 especies. No obstante durante la estratificación térmica vertical la mayor riqueza se obtuvo en aguas metalimnéticas, mientras que disminuyó en aguas de profundidad media durante la mezcla invernal. A lo largo del periodo estudiado la menor riqueza siempre se detectó en las muestras de agua más superficiales y en las más profundas.

En general, el índice de diversidad de Shannon (H) para el nanofitoplancton se encontró en torno a 2-3 bits ind⁻¹ al inicio de la estratificación, cuando se produjeron los máximos de crecimiento fitoplanctónico. La diversidad aumentó a 3-4 bits ind⁻¹ durante la estratificación y alcanzó los mayores valores durante la

mezcla invernal. Por otra parte, respecto a la escala espacial las variaciones son más pequeñas y sólo durante la estratificación se detectó mayor diversidad en las aguas epi-metalimnéticas. Fue frecuente un aumento en las capas profundas debido al menor número de individuos y en su mayoría procedentes de la sedimentación de las poblaciones.

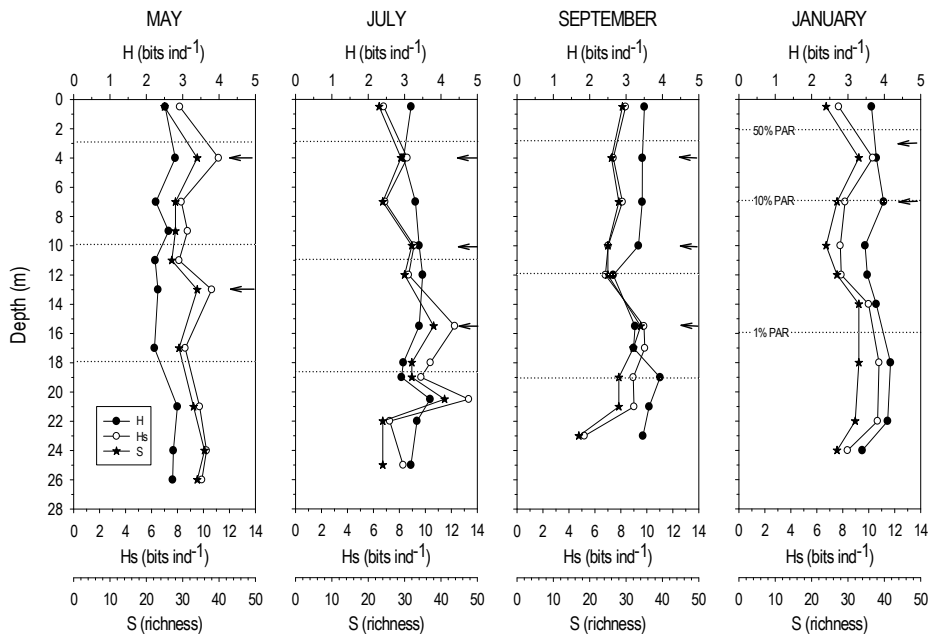


Figura 7.3. Perfiles verticales de riqueza específica (S), índice de diversidad de Shannon (H) e índice de diversidad de Margalef (Hs) del nanofitoplancton para la Laguna de El Tejo en Mayo-Julio-Septiembre de 2003 y Enero de 2004. Las líneas horizontales punteadas indican respectivamente 50 %, 10 % y 1 % de la radiación superficial (PAR). Las flechas negras señalan las profundidades seleccionadas en cada experiencia de enriquecimiento *in situ*.

Figure 7.3. Vertical profiles of nanophytoplankton richness (S), Shannon's diversity index (H) and Margalef's diversity index (Hs) in Lake El Tejo obtained in May-July-September 2003 and January 2004. Dashed horizontal lines indicated 50 %, 10 % and 1 % of surface irradiance (PAR) respectively. Black arrows show the select depths of each *in situ* bioassay.

En cuanto al índice de diversidad de Margalef (Hs), los valores para el nanofitoplancton fueron de 8 a 10, presentando una mayor variabilidad en el perfil vertical paralela a la riqueza de especies (Fig. 7.3), siendo la diversidad mayor en aguas epi-metalimnéticas al inicio de la estratificación y en el metalimnion profundo bien entrada la estratificación térmica vertical.

Efectos de la adición de nutrientes sobre el biovolumen y abundancia de los PPP

En el presente apartado se detallan las posibles variaciones en la limitación de nutrientes para el crecimiento fitoplanctónico tras las experiencias de enriquecimiento llevadas a cabo en la Laguna de El Tejo durante el periodo de estudio 2003-04, tanto a nivel de biovolumen y abundancia total (PPP), como a nivel de las fracciones del picoplancton (APC) y nanofitoplancton, así como respecto de los diferentes grupos algales a nivel taxonómico y de las especies de presencia relevante (>5%).

En el caso de la respuesta del biovolumen total de los PPP al enriquecimiento de nutrientes (Fig. 7.4, Tabla 7.1) se obtuvo una significación estadística en pocas ocasiones debido a que el experimento se llevó a cabo con plancton natural consistente en una mezcla de algas cuyas respuestas podría compensarse entre unas y otras. Así, la respuesta únicamente resultó significativa en estos casos: (1) En los ensayos del estrato profundo durante la mezcla vertical (enero) el biovolumen fitoplanctónico total se incrementó significativamente en algunos tratamientos, separando el análisis *post-hoc* los tratamientos NP y NPSi por un lado y NSi por otro. (2) Durante la estratificación al final del periodo (septiembre) en el metalimnion pero sólo cuando este agua profunda era incubada en condiciones de mayor disponibilidad lumínica (>13 % PAR). En este caso, el

análisis *post-hoc* señaló como significativamente diferentes respecto al control (C) los tratamientos Si y NP.

Para el resto de épocas del año y profundidades de ensayo no se obtuvo discriminación estadística que mostrara diferencias significativas entre tratamientos en cuanto al biovolumen, si bien es cierto que en muchos de los casos el solapamiento de las desviaciones típicas entre réplicas fue destacable (e.g. epilimnion en mayo) lo que permite suponer el enmascaramiento de otras posibles diferencias entre tratamientos (Fig. 7.4). En este caso, aunque sin evidencia estadística, se observa que en las aguas superficiales en los tratamientos que incluían adición de P sólo se indujo un aumento del biovolumen fitoplanctónico en mayo, julio y enero, mientras que en septiembre dicho aumento se produjo en los tratamientos combinados NP y NPSi. Por otra parte, en aguas profundas la adición de P estimuló el aumento de biovolumen fitoplanctónico en mayo y septiembre, mientras que tanto en julio como en enero el aumento se observó en tratamientos combinados NP y NPSi y siendo destacable el efecto negativo de la adición de P en estas fechas y profundidad. En los casos dónde adicionalmente se ensayó el efecto de un aumento de radiación lumínica (julio y septiembre) los resultados obtenidos indican que siempre fue el tratamiento combinado NPSi (y también el tratamiento NP en septiembre) el que estimulaba un crecimiento fitoplanctónico en términos de biovolumen.

En cuanto a la abundancia total de los PPP (Fig. 7.5, Tabla 7.1), durante la estratificación y tras la fertilización se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas más notables y en muchas más ocasiones que en el caso anterior. La adición de nutrientes favoreció un aumento significativo de la densidad en todos los bioensayos realizados en el epilimnion, excepto en mayo, y del mismo modo que sucedía con el biovolumen, en profundidad en enero y en septiembre cuando el agua metalimnética era incubada en condiciones de mayor

disponibilidad lumínica. Los grupos de nutrientes discriminados por el test *post-hoc* para la variable abundancia fitoplanctónica total se detallan en la tabla 7.1, observando que fueron los tratamientos con P añadido los que estimulaban un incremento de densidad del fitoplancton tras la incubación. Así mismo, es interesante señalar que en la mayoría de ensayos, independientemente de la estación o de la profundidad, los tratamientos que incluían Si resultaron en un descenso de densidad total tras el periodo de incubación. Como hemos indicado, la densidad total fue prácticamente igual a la de las APC, por lo que estos resultados en realidad no son más que la respuesta de las APC a los tratamientos y posiblemente el Si no estimulaba a las APC, pero sí a las diatomeas en competencia con ellos por los nutrientes N y/o P.

Tanto en el caso de la variable biovolumen fitoplanctónico total como de la abundancia total, la adición de nutrientes indujo crecimiento de los PPP en los bioensayos realizados durante el periodo de estratificación en septiembre (véase última fila de las Figs. 7.4 y 7.5) cuando las aguas metalimnéticas se incubaban en condiciones de mayor disponibilidad lumínica, resultado similar al obtenido para la variable concentración de chl-*a* (Fig. 6.3), aunque para dicha variable también se encontró idéntica evidencia estadística en las experiencias llevadas a cabo en julio. Además, tanto para la concentración de chl-*a* (véase capítulo 6) como para la abundancia y el biovolumen del fitoplancton, la fertilización no produjo un incremento significativo de dichas variables en los casos donde la incubación se llevó a cabo en la propia profundidad de extracción del agua (fila media de las Figs. 6.3, 7.4 y 7.5; Tablas 6.1 y 7.1).

La elaboración de estas experiencias de enriquecimiento de nutrientes con muestras de agua natural lleva implícito algunos problemas inherentes al hecho de tratar con una mezcla de algas de diferentes fisiologías y tamaños. Es por ello que realizamos distintos niveles de análisis para conocer en profundidad la

respuesta de la adición de nutrientes, como por ejemplo separando picoplancton y nanofitoplancton, así como para los distintos grupos algales. A nivel funcional, las pequeñas procariotas unicelulares pueden diferir en su respuesta respecto al resto del nanofitoplancton (prácticamente todas ellas eucariotas durante el periodo de estudio), situación que podemos evaluar separando ambas fracciones. Los análisis estadísticos para las APC mostraron un patrón similar al obtenido para la abundancia total del fitoplancton, puesto que representaban el 95% en densidad en todas las muestras. Sin embargo, sobre la fracción del nanofitoplancton considerado como un total, no hubo efecto significativo tras el enriquecimiento sobre su abundancia o biovolumen y en ninguna fecha ni profundidad (datos no mostrados). Para evaluar las diferencias funcionales entre pico- y nanofitoplancton se analizó la relación biovolumen APC: biovolumen PPP en los diferentes bioensayos (Fig. 7.6). A pesar de la ausencia de evidencia estadística (debido a una excesiva desviación entre réplicas), al inicio de la estratificación en el metalimnion el aumento de biovolumen de las APC frente al biovolumen fitoplanctónico total parece darse en aquellos tratamientos donde se añadía N, mientras que por lo general la adición de P sólo y/o combinado aumentó dicha razón durante la estratificación y en la mezcla invernal, y tanto en aguas superficiales como de profundidad media. Sin embargo, estos resultados vienen a indicar que los diferentes tratamientos no favorecían especialmente a las APC frente al nanofitoplancton o viceversa, puesto que es difícil detectar una respuesta clara dado que, como comentábamos, el nanofitoplancton es una mezcla de organismos de diferentes tamaños y fisiologías.

Con objeto de continuar discriminando con mayor detalle los posibles efectos del enriquecimiento sobre el crecimiento en los PPP, se analizaron los resultados para los diferentes grupos taxonómicos, tanto en cuanto a biovolumen como densidad, tal y como se representa con los datos de las figuras 7.7 y 7.8, simplificando dicha

representación gráfica al no incluir las desviaciones típicas para cada grupo en cada bioensayo.

El análisis por grupos nanofitoplanctónicos se presenta en las figuras 7.7, 7.8 y la tabla 7.2. La adición de nutrientes sobre el biovolumen de las APC, al ser considerados globalmente, como es de esperar nos aportó prácticamente el mismo resultado cuando consideramos su densidad (Fig. 7.9) o la densidad total de los PPP (Fig. 7.5). A continuación se exponen los resultados de este análisis por grupos, estructurados según la profundidad y época del año. La adición de nutrientes en aguas superficiales tuvo un efecto positivo significativo sobre la abundancia de clorofíceas al inicio de la estratificación, de criptofíceas durante plena estratificación y de zygnematofíceas al avanzar la estación. En términos de biovolumen, los efectos se enmascaran por las diferencias en tamaño de los diferentes grupos y sólo las dinofíceas mostraron variaciones significativas en julio, que fueron en realidad disminuciones claras en los tratamientos que favorecían a las diatomeas, puesto de manifiesto cuando se analizan las abundancias relativas de éstas. Asimismo se incrementaron significativamente las APC en el epilimnion de verano (julio y septiembre). En aguas profundas y al inicio de la estratificación la fertilización produjo los mismos cambios significativos y contrarios entre diatomeas y dinofíceas tanto en biovolumen como en densidad. Bien entrada la estratificación (septiembre) en el agua profunda pero sólo si era incubada en condiciones de mayor disponibilidad lumínica, la adición de nutrientes indujo significativamente el crecimiento de las APC y un aumento en el biovolumen de las criptofíceas, mientras que en idénticas condiciones, pero en términos de densidad, sólo mostraban respuestas significativas las dinofíceas que disminuían en los tratamientos donde aumentaban las diatomeas. Durante la mezcla invernal, la adición de nutrientes tanto en aguas superficiales como en profundidades medias, incrementó el biovolumen de las APC. Para cada uno de estos casos se realizó el

correspondiente análisis *post-hoc*, obteniendo las agrupaciones de tratamientos de nutrientes según se detalla en la tabla 7.2. Dichos resultados indican que por lo general la adición de P sólo o combinado inducía el aumento de la abundancia de algunos grupos algales. A este respecto, indicar que los tratamientos que contenían Si (en especial la combinación P_{Si}) eran los que más estimulaban el crecimiento de las diatomeas.

Para profundizar en el estudio del efecto de la adición de nutrientes en los grupos algales del nanofitoplancton (algae), se realizaron idénticos análisis estadísticos utilizando en este caso sus frecuencias relativas (porcentaje respecto al total tras eliminar las APC, tanto en biovolumen como en densidad; Fig.7.8). Los resultados simplificados de dichos análisis se muestran en la tabla comparativa 7.3, donde se han incluido los resultados anteriormente comentados de los ANOVAs de biovolumen y abundancia por grupos taxonómicos, incluyendo las APC (y que corresponden a un extracto de los resultados de la tabla 7.2). De este modo, se obtuvieron las mismas respuestas significativas que considerando las medidas absolutas, pero el análisis puso de manifiesto más respuestas significativas. Especialmente en el caso de las diatomeas, concretamente en las aguas epi- y metalimnéticas de verano (julio y septiembre; las metalimnéticas incubadas a mayor disponibilidad lumínica), tanto en su contribución al biovolumen como a la abundancia. Por otro lado las respuestas de las clorofíceas en el epilimnion de julio y las criptofíceas en las aguas superficiales invernales resultaron también significativas (en su contribución a la abundancia o al biovolumen respectivamente).

Por último, para continuar profundizando en los efectos de la adición de nutrientes sobre el crecimiento del fitoplancton en esta laguna, se realizaron similares análisis estadísticos a nivel específico, esto es, teniendo en cuenta los resultados de abundancia y biovolumen para aquellas especies con una presencia

superior al 5% en todos los bioensayos. Las APC no se han considerado en estos análisis puesto que por su pequeño tamaño se recontaron globalmente sin diferenciar especies y consideramos que este grupo está formado principalmente por un conjunto de especies del género *Synechococcus*. Debido a la gran cantidad de datos generados con todos estos análisis, a continuación exponemos los resultados más relevantes y estadísticamente significativos.

Tal y como hemos descrito anteriormente, la composición de la comunidad fitoplanctónica en esta laguna fue diferente en las distintas épocas del año (Figs. 7.1 y 7.2) y en relación a las experiencias de enriquecimiento llevadas a cabo *in situ* dicha composición correspondía con el tiempo inicial ($t=0$) para los experimentos (Figs. 7.7 y 7.8; véase tabla con la abundancia de las principales especies para cada época y profundidad en *Anexo II*). En estos bioensayos, cuando dicha agua inicial era incubada sin adición de nutrientes (control-C) por lo general se detectó un ligero descenso en abundancia y biovolumen, aunque los análisis estadísticos indicaron que esas diferencias no fueron significativas en ninguna época o profundidad, tanto en el caso de los totales, de los diferentes grupos algales o de las especies (en algunos casos tal vez enmascarada por la desviación entre réplicas). A continuación detallaremos los resultados del efecto de la fertilización en las especies de nanofitoplancton ordenándolos para las diferentes épocas del año y comparándolos con la situación inicial:

- Al inicio de la estratificación (mayo), en el epilimnion la comunidad algal era sustentada principalmente por *Cyclotella* spp. y *P. umbonatum*. Tras la adición de nutrientes esta situación se mantuvo en todos los casos (incluido el C sin nutrientes añadidos). Por otra parte, los tratamientos con N, P y NP combinados aumentaron significativamente la abundancia de la cloroficea *O. lacustris*. En el metalimnion, dominado sobre todo por diatomeas, los cambios significativos tras la fertilización, fueron el

aumento de las diatomeas con la fertilización, especialmente en los tratamientos con adiciones de Si y P, y una disminución de la dinofíceas (véase tabla correspondiente a los resultados más relevantes en los bioensayos para los PPP en *Anexo II*).

- Durante la estratificación en el epilimnion junto con *C. delicatula* adquirieron preponderancia *T. minimum*, *O. lacustris* y 3 especies de *Cosmarium*. Los tratamientos con adición de Si y P Si estimularon significativamente la diatomea *C. delicatula*, mientras que *O. lacustris*, *T. minimum* y especialmente las especies de *Cosmarium* fueron estimuladas por el enriquecimiento con NP. Por otro lado se observaba la respuesta antagónica de las especies de *Cyclotella* y las de *P. umbonatum*. A lo largo de la estratificación en el metalimnion eran dominantes, *C. delicatula* y *Cryptomonas* spp. Tras la adición de nutrientes no hubo estimulación significativamente positiva del crecimiento algal a excepción de septiembre en agua incubada bajo condiciones de aumento de la radiación incidente. En ese caso, y en tratamientos que combinaban N y P (NP y NP Si), aumentó el biovolumen de la criptofíceas *C. phaseolus*. Por otra parte se hizo evidente una vez más las respuestas opuestas de *C. delicatula* y *P. umbonatum*. Cuando el agua era incubada a su profundidad de extracción en general disminuyeron todas las especies a excepción de *C. phaseolus*, tal y como ocurría al inicio de la estratificación.
- En la mezcla invernal la comunidad algal de esta laguna se encontraba sustentada por *C. delicatula*, *T. minimum* y en menor proporción por *C. erosa* y *C. phaseolus*. En esta época los tratamientos con P indujeron a un aumento significativo del biovolumen de *C. phaseolus*.

Efectos de la adición de nutrientes sobre la diversidad

Las posibles variaciones en diversidad del fitoplancton constituyeron otro nivel de análisis de los resultados de las experiencias de enriquecimiento de nutrientes realizadas en la Laguna de El Tejo. Dado que el cálculo de los habituales índices de diversidad ecológicos se basa en los datos de abundancia, y puesto que nuestros resultados mostraron que la densidad de las APC suponía alrededor del 95% para todas las muestras y no se pudo diferenciar entre las distintas especies dentro de dicho grupo, se calcularon estos índices para la fracción del nanofitoplancton (que además, y tal como se ha comentado, son un grupo funcional diferente al de las APC).

La adición de nutrientes afectó de forma significativamente positiva al índice de diversidad de Shannon H (Fig. 7.10; Tabla 7.4) en aguas metalimnéticas al inicio de la estratificación en los tratamientos con adición de N. En la estratificación de julio en el epilimnion la fertilización indujo aumento de H en los tratamientos que incluían P añadido. Así mismo, durante la estratificación (julio y septiembre) las muestras de agua profunda incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica mostraron variaciones significativas para el índice de diversidad H tras el enriquecimiento, en los tratamientos con adición de N y P combinados. Prácticamente los mismos resultados se obtuvieron con la equitatividad (E ; Fig. 7.11, Tabla 7.4) ya que está muy relacionada con el índice de diversidad de Shannon H , que incluye la importancia relativa de cada especie en relación al total. En cuanto al índice de diversidad de Margalef (H_s), que contempla la abundancia global frente al número total de especies (Fig. 7.12), se obtuvieron diferencias significativas en general no coincidentes con el otro índice, ya que este último da más importancia a la equitatividad. Las diferencias significativas tras la fertilización se dieron al inicio de la estratificación, tanto en epilimnion como metalimnion y en tratamientos a los que se añadía N y P combinados, así

como en las aguas superficiales durante la mezcla invernal para los tratamientos con adición de N, P y Si.

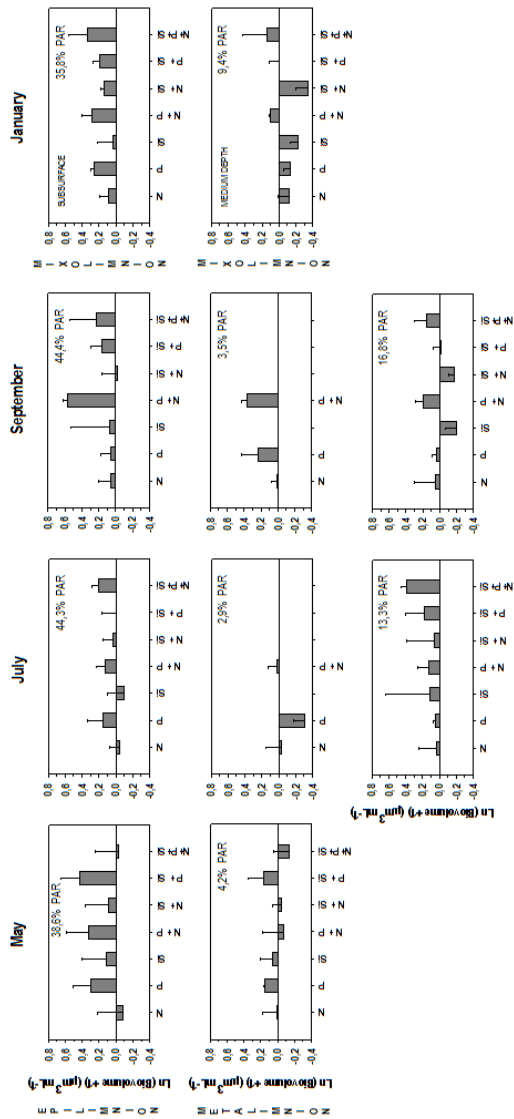


Figura 7.4. Variación de los datos normalizados ($\ln x+1$) para el biovolumen fitoplanctónico total-PPP (medias \pm SD de tres réplicas) respecto al control en los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica (profundidades relativamente más someras).

Figure 7.4. Variations of the normalized data ($\ln x+1$) of total phytoplankton-PPP biovolume (means \pm SD of three replicates) with respect to control conditions in the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

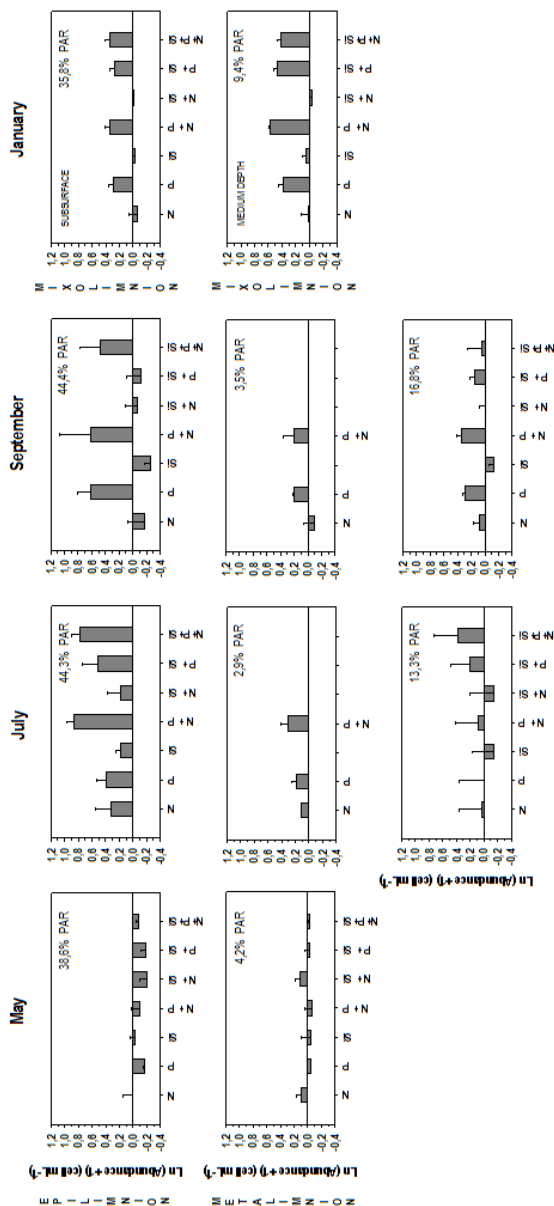


Figura 7.5. Variación de los datos normalizados ($\ln x+1$) para la abundancia fitoplanctónica total-PPP (medias \pm SD de tres réplicas) respecto al control en los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica (profundidades relativamente más someras).

Figure 7.5. Variations of the normalized data ($\ln x+1$) of total phytoplankton-PPP abundance (means \pm SD of three replicates) with respect to control conditions in the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

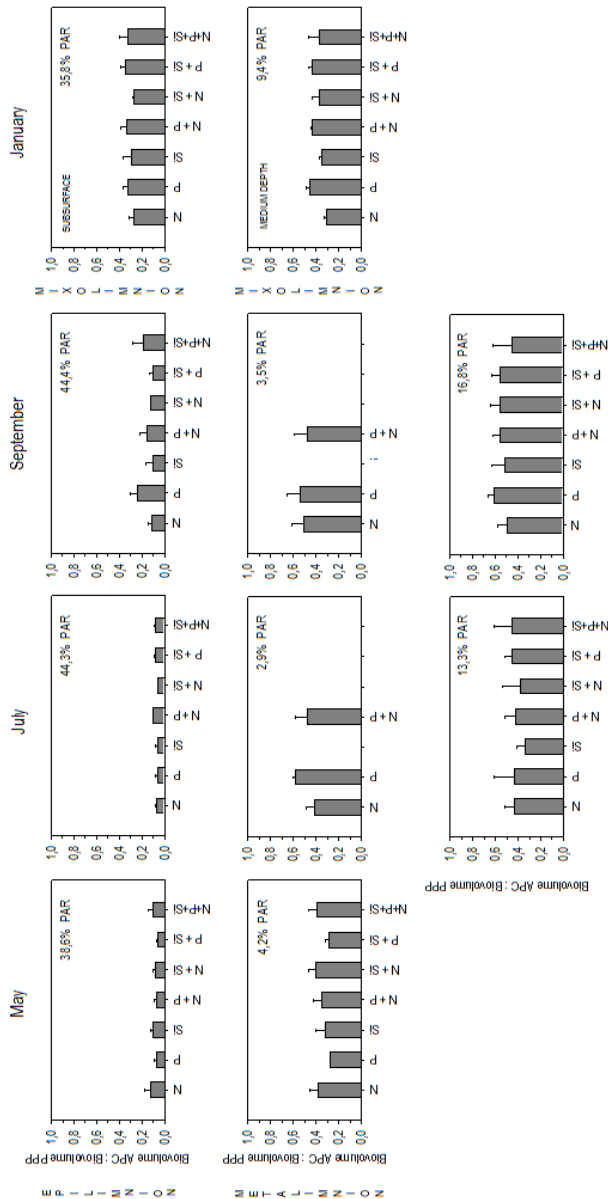


Figura 7.6. Variación de la razón biovolumen picocianobacterias autótrofas (APC) : biovolumen fitoplancton total (PPP) (medias \pm SD de tres réplicas) respecto al control en los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica.

Figure 7.6. Variations of autotrophic picocyanobacteria (APC) to total phytoplankton (PPP) biovolume ratio (means \pm SD of three replicates) with respect to control conditions in the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

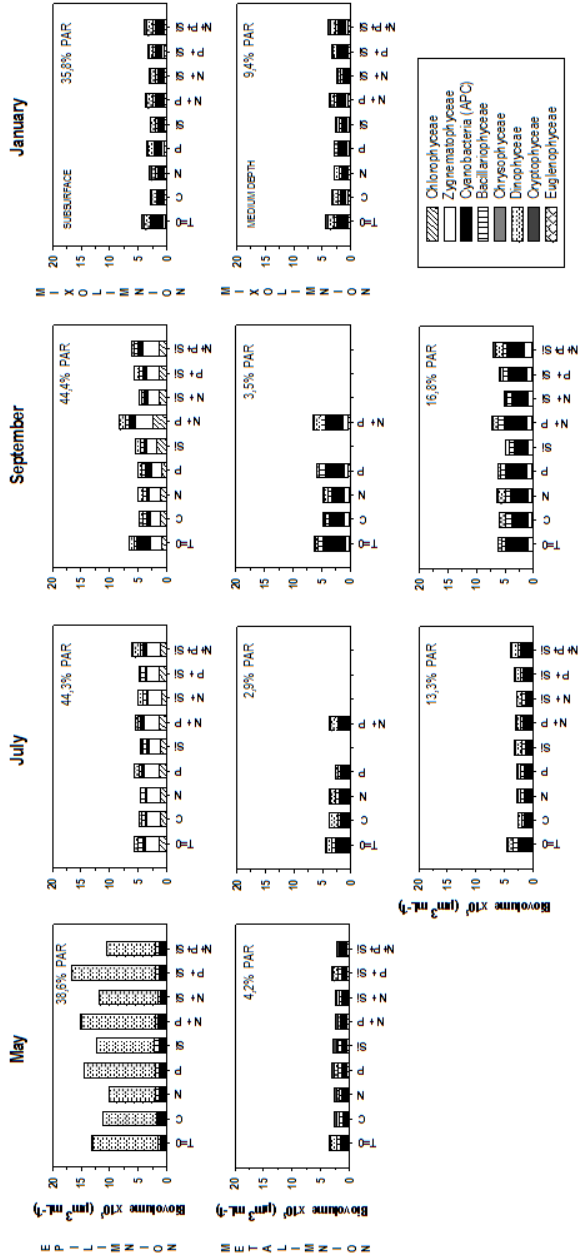


Figura 7.7. Biovolumen para cada grupo fitoplanctónico (medias de tres réplicas; SD no representadas) en el tiempo inicial ($t=0$), control y los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica.

Figure 7.7. Biovolume of each phytoplankton group (means of three replicates; SD not shown) at initial time ($t=0$), control and the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

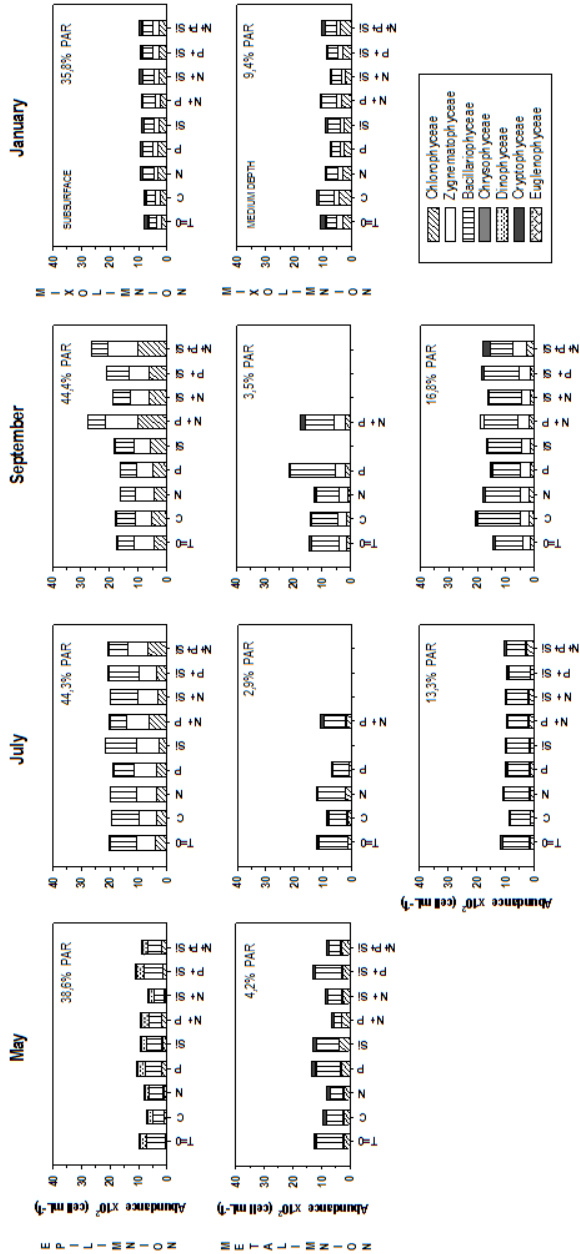


Figura 7.8. Abundancia del nanofitoplancton (medias de tres réplicas; SD no representadas) en el tiempo inicial ($t=0$), control y los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica.

Figure 7.8. Nanophytoplankton abundance (means of three replicates; SD not shown) at initial time ($t=0$), control and the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

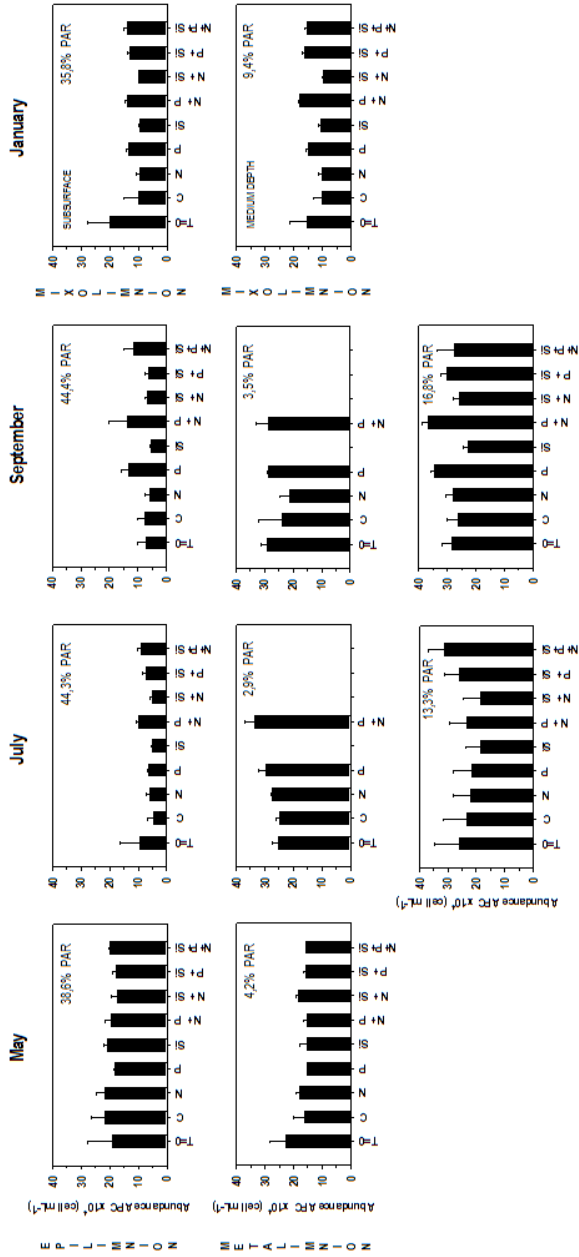


Figura 7.9. Abundancia de las APC (medias \pm SD de tres réplicas) en el tiempo inicial ($t=0$), control y los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad luminica.

Figure 7.9. APC abundance (means \pm SD of three replicates) at initial time ($t=0$), control and the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

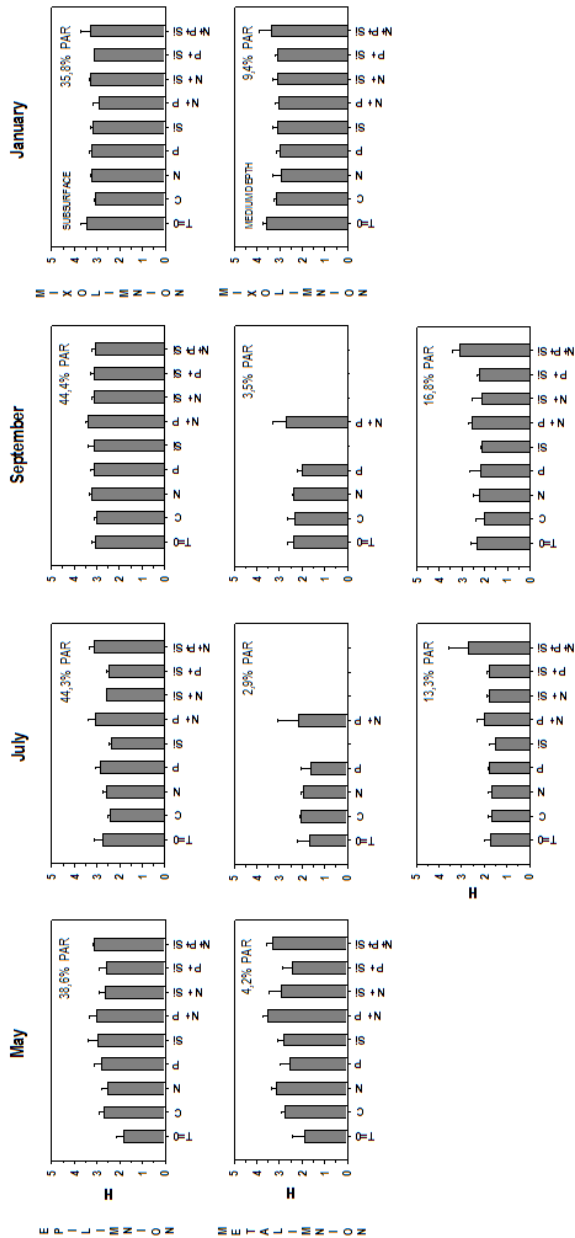


Figura 7.10. Índice de diversidad de Shannon H (medias \pm SD de tres réplicas) para el nanofitoplancton en el tiempo inicial ($t=0$), control y los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad lumínica.

Figure 7.10. Shannon's diversity index H (means \pm SD of three replicates) for nanophytoplankton at initial time ($t=0$), control and the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

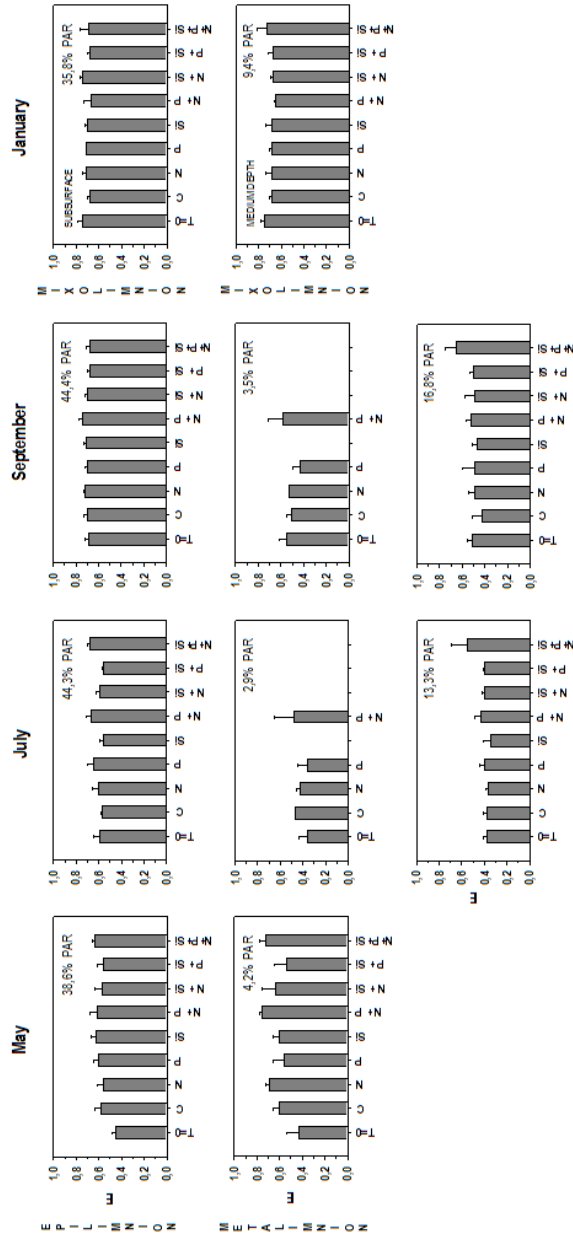


Figura 7.11. Equitatividad E (medias \pm SD de tres réplicas) para el nanofitoplancton en el tiempo inicial ($t=0$), control y los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad luminica.

Figure 7.11. Equitability or evenness E (means \pm SD of three replicates) for nanophytoplankton at initial time ($t=0$), control and the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

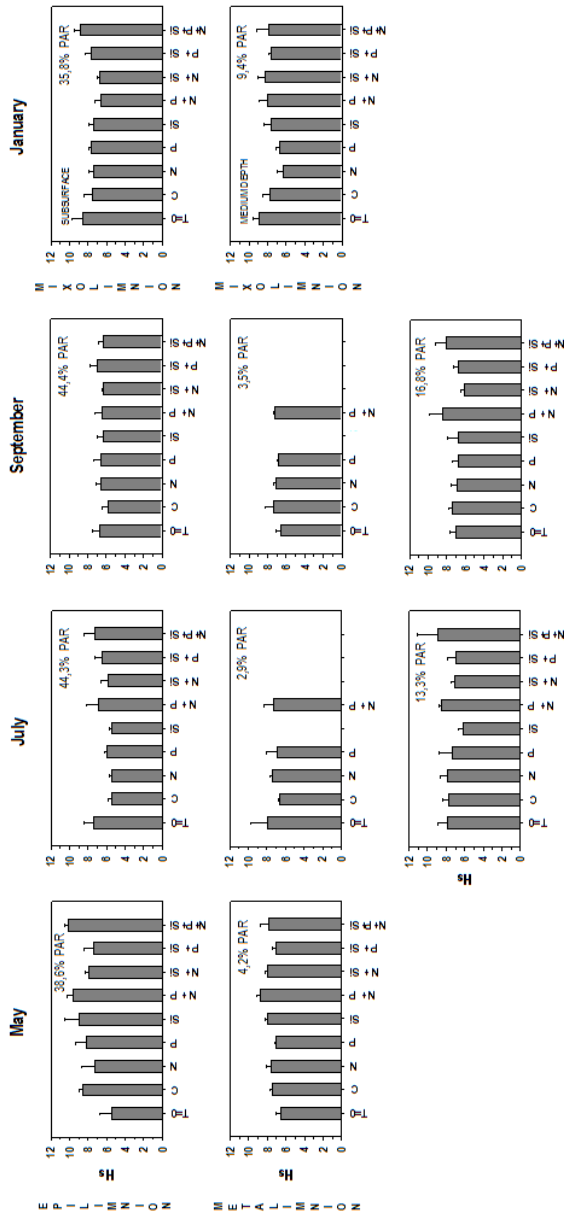


Figura 7.12. Índice de diversidad de Margalef Hs (medias \pm SD de tres réplicas) para el nanofitoplancton en el tiempo inicial ($t=0$), control y los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo en cada uno de los cuatro experimentos estacionales. La última fila muestra los resultados de las muestras de agua metalimnética cuando eran incubadas en condiciones de mayor disponibilidad luminica.

Figure 7.12. Margalef's diversity index Hs (means \pm SD of three replicates) for nanophytoplankton at initial time ($t=0$), control and the nutrient amendment treatments for each assayed depths in four seasonal experiments. Last row shows the results of the metalimnetic samples when incubated at higher light availability (shallower depth).

Tabla 7.1. Resultados de ANOVAs de una vía para los datos normalizados (ln x+1) de biovolumen y abundancia fitoplanctónica total (PPP) en cada fecha y profundidad ensayada en las experiencias de adición de nutrientes. Se muestran entre paréntesis los grupos de tratamientos homogéneos obtenidos tras los contrastes *post-hoc* de Tukey. Nótese que las profundidades de enero no corresponden a epi- y metalimnion puesto que el lago no estaba estratificado, y por tanto los ensayos se llevaron a cabo en aguas superficiales y medias del mixolimnion.

Table 7.1. Results from one-way ANOVAs on normalized data (ln x+1) for total phytoplankton biovolume and abundance (PPP) at each date and assayed depth in the enrichment experiences. Homogeneous groups of treatments assayed are show between brackets, obtained after *post-hoc* Tukey contrasts. Note that January depths do not correspond to the epi- and metalimnion, but to the shallowest and deepest samples assayed in the mixolimnion, since the lake was not stratified.

	Nutrient groups		Nutrient groups	
	Total PPP biovolume		Total PPP abundance	
	<i>P</i>	Tukey groups	<i>P</i>	Tukey groups
EPILIMNION				
May	n.s.		n.s.	
July	n.s.		***	(NSi, Si, N, P, PSi) (P, PSi, NPSi) (PSi, NPSi; NP) (Si, N, PSi, NSi)
September	n.s.		***	(N, PSi, NSi, NPSi) (NSi, NPSi; P, NP)
January (superficial depth)	n.s.		***	(N, Si, NSi) (PSi, P, NP, NPSi)
METALIMNION (incubated at its depth)				
May	n.s.		n.s.	
July	n.s.		n.s.	
September	n.s.		n.s.	
January (medium depth)	*	(NSi, Si, P, N, PSi) (Si, P, N, PSi, NP, NPSi)	***	(NSi, N, Si) (P, NPSi, PSi) (NPSi, PSi, NP)
METALIMNION (incubated at increased light availability)				
July	n.s.		n.s.	
September	*	(Si, NSi, PSi, P, N, NPSi) (NSi, PSi, P, N, NPSi, NP)	***	(Si, NSi, NPSi, N, PSi) (NPSi, N, PSi, P) (N, PSi, P, NP)

ANOVA *P*-values are: * *P*< 0.05; ** *P*<0.01; *** *P*<0.001; n.s., not significant

Table 7.2. Resultados de ANOVAs de una vía para los datos normalizados ($\ln x+1$) de biovolumen y abundancia a nivel de los grupos fitoplanctónicos en cada fecha y profundidad ensayada en las experiencias de adición de nutrientes. Se muestran entre paréntesis los grupos de tratamientos homogéneos obtenidos tras los contrastes *post-hoc* de Tukey.

Table 7.2. Results from one-way ANOVAs on normalized data ($\ln x+1$) for biovolume and abundance of phytoplankton groups at each date and assayed depth in the enrichment experiences. Homogeneous groups of treatments assayed are show between brackets, obtained after *post-hoc* Tukey contrasts.

	Nutrient groups		Nutrient groups	
	Phytoplankton groups biovolume		Phytoplankton groups abundance	
	<i>P</i>	Tukey groups	<i>P</i>	Tukey groups
EPILIMNION				
May	n.s.		*Chlorophyceae	(NSi, N, Si, PSi, NP, NPSi)
July	***APC	(NSi, Si, N, P, PSi) (P, PSi, NPSi) (PSi, NPSi, NP)	***APC	(N, Si, PSi, NP, NPSi, P) (NSi, Si, N, P, PSi) (P, PSi, NPSi) (PSi, NPSi, NP)
September	***APC	(N, Si, PSi, NP, P, NSi) (Si, PSi, NP, P, NSi, NPSi)	*Cryptophyceae	(Si, NSi, P, N, NP, PSi) (NSi, P, N, NP, PSi, NPSi)
January	***APC	(Si, N, PSi, NSi, NPSi) (NSi, NPSi, NP, P)	***APC	(Si, N, PSi, NSi, NPSi) (NSi, NPSi, NP, P)
January (superficial depth)	***APC	(N, Si, NSi) (PSi, P, NP, NPSi)	***APC	(Si, P, NSi, N, PSi, NPSi) (NSi, N, PSi, NP)
METALIMNION (incubated at its depth)				
May	**Bacillariophyceae	(NP, NPSi, N, NSi) (NPSi, N, NSi, Si, PSi, P)	*Bacillariophyceae	(NP, NPSi, N, NSi) (NPSi, N, NSi, Si, PSi, P)
July	*Dinophyceae	(NPSi, Si, NSi, N, NP, P) (Si, NSi, N, NP, P, PSi)	*Dinophyceae	(NPSi, NSi, Si, NP, N) (NSi, Si, NP, N, PSi, P)
September	n.s.		n.s.	
January (medium depth)	***APC	(NSi, N, Si) (P, NPSi, PSi) (NPSi, PSi, NP)	***APC	(NSi, N, Si) (P, NPSi, PSi) (NPSi, PSi, NP)
METALIMNION (incubated at increased light availability)				
July	n.s.		n.s.	
September	***APC	(Si, NSi, NPSi, N, PSi) (NPSi, N, PSi, P) (N, PSi, P, NP)	***APC	(Si, NSi, NPSi, N, PSi) (NPSi, N, PSi, P) (N, PSi, P, NP)
	**Cryptophyceae	(Si, P, NSi, PSi, N) (P, NSi, PSi, N, NP) (NSi, PSi, N, NP, NPSi)	*Dinophyceae	(NSi, N, Si, PSi, P, NP) (N, Si, PSi, P, NP, NPSi)

ANOVA *P*-values are: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s., not significant

Tabla 7.3. Resultados de P-valor de los ANOVAs de una vía para los datos normalizados (ln x+1) de biovolumen y abundancia a nivel de los grupos fitoplanctónicos en cada fecha y profundidad ensayada en las experiencias de adición de nutrientes. Se muestran los resultados para el fitoplancton total (PPP; sombreado; datos correspondientes a la tabla 7.2) y para el nanofitoplancton (algae) en porcentaje respecto al total (frecuencias relativas).

Table 7.3. P-values from one-way ANOVAs on normalized data (ln x+1) for biovolume and abundance of phytoplankton groups at each date and assayed depth in the enrichment experiences. Data shown for total phytoplankton (PPP; shaded; data shown in table 7.2) and nanophytoplankton (algae) in relative frequencies.

	Phytoplankton groups (PPP = Algae+APC)		Phytoplankton groups (Algae)	
	Biovolume	Abundance	% Biovolume	% Abundance
EPILIMNION				
May	n.s.	0.041 (*) Chlorophyceae	n.s.	0.042 (*) Chlorophyceae
July	0.000 (***) APC	0.000 (***) APC	0.009 (**) Bacillariophyceae	0.000 (***) Bacillariophyceae
	0.038 (*) Dinophyceae	0.018 (*) Cryptophyceae		0.009 (**) Chlorophyceae
				0.020 (*) Cryptophyceae
September	0.002 (**) APC	0.002 (**) APC	0.041 (*) Bacillariophyceae	0.000 (***) Bacillariophyceae
		0.014 (*) Zygnematophyceae		
January (superficial depth)	0.000 (***) APC	0.000 (***) APC	0.040 (*) Cryptophyceae	n.s.
METALIMNION (incubated at its depth)				
May	0.008 (**) Bacillariophyceae	0.011 (*) Bacillariophyceae	0.040 (*) Bacillariophyceae	0.003 (**) Bacillariophyceae
	0.045 (*) Dinophyceae	0.029 (*) Dinophyceae	0.028 (*) Chlorophyceae	0.006 (**) Chlorophyceae
			0.042 (*) Zygnematophyceae	0.026 (*) Zygnematophyceae
July	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
September	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
January (medium depth)	0.000 (***) APC	0.000 (***) APC	n.s.	n.s.
METALIMNION (incubated at increased light availability)				
July	n.s.	n.s.	n.s.	0.006 (**) Bacillariophyceae
September	0.001 (**) APC	0.001 (**) APC	0.005 (**) Bacillariophyceae	0.017 (*) Bacillariophyceae
	0.006 (**) Cryptophyceae	0.035 (*) Dinophyceae	0.040 (*) Cryptophyceae	0.014 (*) Dinophyceae

ANOVA P-values are: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s., not significant

Tabla 7.4. Resultados de P-valor de los ANOVAs de una vía para el índice de diversidad de Shannon (H), el índice de diversidad de Margalef (Hs), la riqueza (S) y la equitatividad (E) en cada fecha y profundidad ensayada en las experiencias de adición de nutrientes. Los resultados se refieren al nanofitoplancton (algae), a excepción del índice H que se muestra para dicha fracción de algas y para el total fitoplanctónico (PPP = Algae + APC). **Table 7.4.** P-values from one-way ANOVAs of Shannon's diversity index (H), Margalef's diversity index (Hs), richness (S) and equitability or evenness (E) at each date and assayed depth in the enrichment experiences. Data shown for nanophytoplankton (algae) except H index, with H calculated for algae and for total phytoplankton (PPP = Algae + APC).

	H (PPP)	H (algae)	Hs (algae)	S (algae)	E (algae)
EPILIMNION					
May	n.s.	n.s.	0.040 (*)	0.035 (*)	n.s.
July	0.000 (***)	0.001 (**)	n.s.	n.s.	0.003 (**)
September	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
January (superficial depth)	0.015 (*)	n.s.	0.003 (**)	0.005 (**)	n.s.
METALIMNION (incubated at its depth)					
May	n.s.	0.014 (*)	0.008 (*)	n.s.	0.034 (*)
July	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
September	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
January (medium depth)	0.046 (*)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
METALIMNION (incubated at increased light availability)					
July	n.s.	0.041 (*)	n.s.	n.s.	0.047 (*)
September	n.s.	0.011 (*)	n.s.	n.s.	n.s.

ANOVA P-values are: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s., not significant

DISCUSIÓN

Características generales y cambios en el tiempo de la comunidad fitoplanctónica durante 2003-04

La comunidad fitoplanctónica (composición y dinámica) de la Laguna de El Tejo durante el periodo 2003-04 muestra una marcada variación estacional controlada por la alternancia entre un periodo de relativa estabilidad durante la estratificación térmica estival y una única mezcla vertical invernal de la totalidad de la columna de agua (laguna monomíctica). Por otro lado, la laguna presentó una baja disponibilidad de nutrientes inorgánicos (capítulo 6). Dicho funcionamiento cíclico de naturaleza monomíctica unido a su condición de sistema oligo-mesotrófico (constatado también para los años 1997-98 y reflejado en la primera parte de esta tesis) se viene detectando desde hace décadas para este sistema (Miracle et al., 1992; Morata et al., 2003; Morata et al., remitido).

En cuanto a la descripción y distribución de la comunidad fitoplanctónica de la Laguna de El Tejo, a lo largo de todo el periodo de estudio 2003-04 destaca la abundancia de picocianobacterias (APC) y la baja abundancia relativa y baja diversidad del fitoplancton total (PPP). En todas las épocas del año y toda la columna de agua, las APC dominaron en términos de abundancia, si bien considerando el biovolumen se ponen de manifiesto las diferencias en la preponderancia de los diferentes grupos algales en la composición de la biomasa fitoplanctónica tanto a escala temporal como vertical.

A nivel de estructura de tamaños y fisiología la fracción de picoplancton (APC) presentó dinámicas diferentes a las algas del nanofitoplancton (en su mayoría eucariotas). Durante la estratificación térmica de la laguna el nanofitoplancton (algae) tuvo mayor relevancia (al menos a efecto de biovolumen) en estratos de

la columna de agua con una incidencia de radiación fotosintéticamente activa (PAR) superior al 10%, sin embargo por debajo de ese valor (PAR < 10%) las APC adquirirían valores de hasta el 90-95% en abundancia gracias a su contenido en pigmentos accesorios (e.g. ficoeritrina) que permiten un eficiente aprovechamiento de la escasa radiación disponible a dichas profundidades (e.g. Vörös et al., 1998; Schallenberg & Burns, 2001; Camacho et al., 2003b). Por consiguiente, la distribución funcional (procariota vs. eucariota) de organismos productores primarios a lo largo de la columna de agua no está únicamente condicionada a su tamaño (picoplancton vs. nanofitoplancton) sino también a la presencia y ajuste de los pigmentos accesorios específicos en ciertas condiciones ambientales para aprovechamiento del espectro lumínico (Litchman & Klausmeier, 2008; Descy et al., 2009). Estos resultados son confirmados por el hecho de que durante la estratificación térmica las mayores concentraciones de oxígeno disuelto en los perfiles verticales (capítulo 6) se correspondían a activos procesos de fotosíntesis oxigénica en estratos epi- y metalimnéticos relacionados con mayores densidades (en biovolumen) de la fracción del nanofitoplancton, mientras que en aguas de la oxiclina con mayor concentración de nutrientes el máximo profundo de clorofila (DCM) se debía a importantes poblaciones de APC. Dicha diversificación en la distribución vertical entre algas nanofitoplanctónicas y picocianobacterias por el uso diferencial de los recursos (radiación y nutrientes) se había descrito para la Laguna de El Tejo (Camacho et al., 2003c; Morata et al., 2003) y para otros sistemas con marcada estratificación térmica vertical, como la cercana Laguna de La Cruz (Camacho et al., 2003a,b) y otros lagos cársticos (Camacho, 2006). Sin embargo, durante la mezcla invernal la mayor disponibilidad de nutrientes en el medio no se traduce en un aumento en beneficio del fitoplancton debido al descenso en la radiación diaria (en tiempo e intensidad), es decir menor temperatura y menor luz incidente, cuya penetración en la columna de agua es disminuida por la mezcla vertical que aumenta la turbidez (Kirk, 1985). Existen estudios que demuestran que algunos grupos

algales, además de las APC, son capaces de funcionar de forma eficiente ante situaciones de baja radiación y mayor disponibilidad de nutrientes, como se demostró para las criptofíceas en las laguna cárstica-sulfatada del Cisó (e.g. Gasol et al, 1990). Así mismo hay registros de presencia conjunta de APC y criptofíceas en otros lagos cársticos-carbonatados como las lagunas de La Cruz, La Parra y El Tobar (Camacho, 2006). Esto indica que hay una cierta similitud funcional entre estos dos grupos que se manifiesta también en la Laguna de El Tejo, donde hemos constatado la presencia conjunta de APC y criptofíceas en aguas profundas durante la estratificación y en toda la columna de agua durante la mezcla invernal.

Finalmente, en el periodo 2003-04 la distribución vertical y estacional de la diversidad de la comunidad fitoplanctónica confirma también la constancia o poca variación del ciclo anual de esta comunidad en la Laguna de El Tejo. Los resultados coinciden con el estudio mensual llevado a cabo en el periodo 1997-98 en el que se observó que la diversidad va aumentando desde la primavera hacia el verano, con las mayores diversidades al final de la estratificación cuando el sistema alcanza momentos de mayor estabilidad (Morata et al., 2003; capítulo 5). Se dan valores altos en invierno, especialmente del índice de Shannon H, que no son esperables, pero que son efecto de las bajas densidades de población en esta época y de la mezcla de comunidades. Se observa además una cierta tendencia de la diversidad a aumentar especialmente en el estrato final del metalimnion cada vez más profundo y estable a medida que avanza el año (de julio a septiembre, coincidiendo con la situación de máximos de abundancia fitoplanctónica). Esta zona se puede definir como zona de transición espacio-temporal para la dinámica del fitoplancton de esta laguna. En esa franja podrían estar operando mecanismos que promueven una situación de perturbación intermedia en intensidad (Elliott et al., 2001) y donde se cumpliría la hipótesis de la inestabilidad intermedia (IDH) sugerida por Connell (1978) que se traduce en mayores diversidades y abundancias (e.g. Padisák et al., 1993).

Con objeto de profundizar en el funcionamiento de la propia dinámica de los PPP, se llevaron a cabo una serie de experiencias de enriquecimiento de nutrientes *in situ* en la Laguna de El Tejo durante 2003-04, cuyos resultados permiten concluir que en algunos casos existió efecto de la adición de nutrientes y/o de la limitación de PAR sobre el fitoplancton. De este modo, la producción primaria del sistema está controlada primeramente por la radiación (principalmente en aguas profundas) junto con la interacción entre la disponibilidad de macronutrientes inorgánicos y la demanda por parte de los productores primarios. En el caso de las aguas metalimnéticas, en el capítulo anterior se detalló que durante la estratificación (julio y septiembre) sólo se obtuvieron resultados positivos de crecimiento fitoplanctónico (en términos de concentración de chl-*a*) tras adición de N cuando dichas aguas eran incubadas en condiciones ligeramente superiores al 10% de PAR, en contraposición a un nulo efecto ante el enriquecimiento tras la incubación del agua a su propia profundidad (<5% PAR). Considerando la abundancia y biovolumen del fitoplancton, en aguas profundas únicamente hubo estimulación del crecimiento en la estratificación de septiembre tras la adición de nutrientes y en condiciones de mayor disponibilidad lumínica, siendo el P limitante en cuanto a abundancia fitoplanctónica y habiendo co-limitación NP en el caso del biovolumen. De esta manera los datos manifiestan que para aguas profundas la limitación en el crecimiento del fitoplancton se debe primeramente a la disponibilidad de PAR, luego es el factor limitante clave en el crecimiento de estos organismos (e.g. Kirk, 1994; Petersen et al., 1997; Sterner et al., 1997; Kunz & Diehl, 2003). Así mismo, hágase notar que estos bioensayos permiten establecer como límite para el crecimiento fitoplanctónico durante momentos de estratificación de las aguas una luminosidad no muy inferior al 10% de la PAR, el mismo valor que se concluyó que en parte determinaba la distribución vertical entre el nanofitoplancton (>10% PAR) y las APC (<10% PAR) en la laguna. Para

aguas profundas incubadas sobre un ligero valor superior al 10% de PAR, la adición de nutrientes en julio no promovió el crecimiento ni del nanofitoplancton ni de las APC, en todo caso hizo aumentar la proporción de diatomeas. En cambio, en septiembre la fracción de las APC sí que aumentó, a la vez que ciertos grupos del nanofitoplancton (e.g. criptofíceas) con contenido en pigmento accesorio ficoeritrina o con posibilidades mixotróficas en condiciones de poca luz. Septiembre coincide con el agotamiento de nutrientes en aguas profundas al final de la marcada estratificación estival, y es por ello que dicho enriquecimiento artificial junto con el incremento de la PAR indujo la división celular en las APC, así como en *P. umbonatum*, *C. phaseolus* y *C. delicatula*. De igual modo, la dinámica fitoplanctónica de esta laguna nos mostró que por debajo del 10% de PAR las APC son más eficaces que el nanofitoplancton en la explotación de recursos y de esta manera en los bioensayos llevados a cabo durante la estratificación se esperaba un efecto de la adición de nutrientes para este grupo de organismos en aguas profundas (< 5% PAR) al menos cuando los nutrientes del medio estaban agotados (septiembre), pero sin embargo no hubo evidencia estadística que apoyara esta hipótesis posiblemente debido al solapamiento de las desviaciones entre réplicas. Por otra parte, en las aguas profundas incubadas a >10% de PAR durante la estratificación (julio y septiembre) la concentración de chl-*a* sí aumentó significativamente tras la adición de nutrientes, remarcando así que en julio un incremento experimental de nutrientes y radiación indujo un aumento en contenido celular de chl-*a* que no se correspondía con mayores densidades (abundancia y/o biovolumen) en el nanofitoplancton o en las APC, y en septiembre la mayor concentración de chl-*a* sí se correlaciona con el comentado incremento en la división celular de las APC. Estas observaciones revelan que la radiación es el factor primordial para la producción del sistema, en particular para las APC (Camacho et al., 2003a,b), siendo en este caso el 10% de PAR el que marca el límite funcional de la zona fótica.

Durante la mezcla invernal en aguas superficiales y de profundidad media la adición de nutrientes no produjo un cambio significativo en la concentración de chl-*a* y en cambio sí hubo un efecto positivo cuando se contempló la abundancia fitoplanctónica total, siendo el P el nutriente limitante. En el periodo invernal la inestabilidad del medio promueve la completa mezcla de la columna de agua, poniendo en circulación los nutrientes acumulados en aguas muy profundas (sedimentación de la columna y los aportes del acuífero) y de este modo el crecimiento del fitoplancton se encuentra más limitado por la disminución del fotoperiodo y las menores temperaturas. En esta situación, la adición artificial de P activó la replicación celular (principalmente de las APC) puesto que posiblemente el nanofitoplancton ya había agotado el P biológicamente disponible del medio (a pesar de estar en concentraciones superiores a los momentos de estratificación). Así, nuestros resultados apoyan la idea de que en invierno el crecimiento de los PPP se encuentra principalmente controlado por la radiación y la temperatura (y probablemente la turbulencia, aunque no tenemos constancia experimental) mientras que en verano la limitación es debida a los nutrientes (Delgado-Molina et al., 2009; Helbling et al., 2013) en aguas superficiales y principalmente por la radiación en aguas profundas (véase esquema de la Fig. 7.13).

Tal y como argumentamos en el capítulo anterior, el crecimiento del fitoplancton en los sistemas acuáticos está limitado por nutrientes inorgánicos (Hecky & Kilham, 1988; Elser et al., 1990) siendo la relativa disponibilidad de los mismos la fuerza principal que estructura la comunidad fitoplanctónica (e.g. Tilman, 1977). Estos nutrientes principalmente son P y/o N inorgánico (e.g. Guildford & Hecky, 2000), y es el P el elemento que habitualmente se ha considerado como el factor clave en el desarrollo de la comunidad fitoplanctónica (e.g. Schindler, 1978; Sterner, 2008) como muestra el alto porcentaje de lagos (27%) del hemisferio norte en los cuales se ha determinado limitación por P inorgánico

(Dodds, 2002). Sin embargo, nuestros resultados evidencian que existen cambios temporales y verticales en cuanto al nutriente limitante (Morata et al., remitido), y en el capítulo anterior se ha mostrado la importancia de la limitación por N durante la estratificación estival, apoyando la idea de que la limitación por N es más habitual de lo que tradicionalmente se había estimado (Lewis & Wurstbaugh, 2008). Sin embargo en términos de biovolumen o de abundancia esta conclusión no es tan evidente.

Concretamente, en términos de abundancia total los resultados son los marcados por las APC debido a su densidad dos órdenes de magnitud mayores que las del nanofitoplancton y en los bioensayos que mostraron significación fueron siempre estimulados por los tratamientos conteniendo P (*post-hoc*, Tablas 7.1 y 7.2). Esto explica los resultados divergentes ya que las APC están constituidas por varias especies de *Synechococcus* y es conocido que pueden utilizar diversas fuentes de N, incluyendo aminoácidos, y en caso de estar privados de N degradan su propio pigmento proteínico ficoeritrina (Wyman et al., 1985).

Para el biovolumen algal, al ser una variable resultante de una suma de especies muy diferentes, los resultados para aguas superficiales no fueron significativamente concluyentes referente a efectos concretos de la fertilización, si bien el solapamiento entre las desviaciones obtenidas en este caso podrían enmascarar algunas diferencias; dejando a un lado dichas desviaciones, se podría decir que al inicio de la estratificación (mayo) el P limitó el crecimiento fitoplanctónico a nivel de biovolumen, y durante la estratificación de septiembre habría co-limitación NP. Esto difiere con la discusión del capítulo anterior que tenía en cuenta la concentración de chl-*a* como medida del crecimiento del fitoplancton (véase capítulo 6, Fig. 6.3) y donde argumentábamos que en el epilimnion al inicio de la estratificación (mayo) había limitación de P para el crecimiento mientras que durante la estratificación marcada (julio y septiembre)

el N era el nutriente limitante. Esta discordancia se puede esclarecer teniendo en cuenta el análisis por grupos algales y/o especies.

Limiting factors		SEASON			
		Spring	Summer stratification (July) (September)		Winter mixing
DEPTH	Superficial layers	P (NP)	N (NP)	NP	NP Light Turbulence?
	Deeper layers	Light	Light	Light	NP Light Turbulence?
	Deep layers (incubated at an increased upper depth to avoid light limitation)	not tested	N (NP)	N (NP)	not tested

Figura 7.13. Factores limitantes para el crecimiento del fitoplancton en la Laguna de El Tejo obtenidos tras la realización de experiencias de enriquecimiento de nutrientes *in situ* durante 2003-04, combinando los resultados para la concentración de chl-*a* y los PPP (capítulos 6 y 7). El silicato no se ha incluido al afectar sólo a determinados grupos algales.

Figure 7.13. Limiting factors for phytoplankton growth in Lake El Tejo obtained after *in situ* bioassays performed in 2003-04, combining results for chl-*a* and PPP (chapters 6 and 7). Silicate is not included because only affects several algal groups.

A este nivel de análisis, los bioensayos llevados a cabo en la Laguna de El Tejo evidenciaron efectos de la fertilización sobre los distintos grupos algales y sobre las principales especies, que clarifican la respuesta del fitoplancton a los tratamientos al analizarlas más detalladamente. De esta manera, además del P, se puso de manifiesto la importancia del N y del Si como nutrientes limitantes. En

realidad las respuestas significativas se deben a las interacciones entre las diatomeas y los otros grupos algales, fundamentalmente clorofíceas, criptofíceas y dinofíceas. En las aguas superficiales al inicio de la estratificación las clorofíceas estaban co-limitadas en su crecimiento, puesto que al añadir N y P combinados se produjo un significativo aumento en su abundancia y concretamente para la pequeña chlorococcal *O. lacustris*, también reflejado en el aumento de concentración de chl-*a* para esta fecha y profundidad, así como un incremento del índice de diversidad de Margalef (Hs) al favorecer a los grupos minoritarios como estas clorofíceas. En el metalimnion las diatomeas experimentaron crecimientos significativos con las adiciones de Si y P, al tiempo que reducían su importancia significativamente las dinofíceas. Durante la estratificación estival de julio, prácticamente todos los grupos algales identificados estaban limitados por N además de P, observando que la adición de NP indujo el aumento significativo de pequeñas clorofíceas (como *O. lacustris* y *T. minimum*), de criptofíceas y también de las zygmatofíceas del genero *Cosmarium*, aunque las respuesta de éstas últimas no resultara significativa como grupo. Por otra parte, fue significativo el efecto en la abundancia relativa de las diatomeas, debido a su aumento en los tratamientos con Si y N, mientras que las dinofíceas experimentaban una reducción en estos tratamientos más visible en biovolumen (que resultó significativo) ya que se afectaba, junto a *P. umbonatum* a *Peridinium cinctum*, ambos de gran tamaño. Con el avance de la estación, durante la marcada estratificación se pasó de limitación por N en julio para la mayoría de los grupos algales a co-limitación de N y P en septiembre de las zygmatofíceas (principalmente la relativamente pequeña desmidial *C. abbreviatum*) que se hicieron co-dominantes en esta época, superando en abundancia a las clorofíceas. La abundancia relativa de las diatomeas también se vio favorecida por los tratamientos con Si, especialmente en el metalimnion. Estos resultados para el periodo de estratificación marcada (julio y septiembre) se correlacionan claramente con incrementos de concentración de chl-*a*. Las

respuestas diferenciales de los grupos algales influenciaron el índice de diversidad (H), cuya variación con la fertilización resultó significativa, ya que disminuía en aquellos tratamientos en que se favorecía a la especie dominante *C. delicatula* (y a las APC en el caso de la diversidad de los PPP) y crecía en los tratamientos en donde se estimulaba a las algas minoritarias. Respecto a las aguas metalimnéticas, al inicio de la estratificación se vuelve a poner de manifiesto la respuesta antagónica de diatomeas y dinofíceas junto a la significativa respuesta de diversidad (H y Hs), tal como se ha discutido anteriormente. Durante la estratificación sólo hubo respuestas significativas en condiciones de aumento de radiación, como se comentó al inicio de este apartado. Los resultados confirman que en caso de no haber limitación por la luz, existía una marcada co-limitación de N y P en el crecimiento de las criptofíceas (principalmente la relativamente grande y flagelada *C. phaseolus*), que adquirieron importancia al final de la estratificación. Por otro lado, de nuevo se puede observar la interacción entre diatomeas y dinofíceas, así como también la interacción entre diatomeas y criptofíceas, que redundan en una respuesta significativa de la diversidad. Para ambas fechas (julio y septiembre) en aguas profundas también se produjo una respuesta significativa de la concentración de chl-*a*. Es destacable que en las muestras de agua metalimnética incubada a su profundidad de extracción se produjo un descenso comparando el agua control respecto al tiempo inicial para todos los grupos algales a excepción de criptofíceas y *C. meneghinii*, evidenciando su adaptación a condiciones de una menor PAR. Por último, en la mezcla invernal se determinó co-limitación de NP para criptofíceas (*C. phaseolus*). Nuestros resultados muestran que la respuesta a la limitación por nutrientes y/o luz difiere entre los distintos grupos algales, tal como señalan otros autores (Morel, 1987; Litchman et al., 2004, 2007). A modo de síntesis, los resultados obtenidos en las experiencias de enriquecimiento de nutrientes a nivel de las variables consideradas y de los grupos algales se encuentra esquematizado en la figura 7.14.

Enrichment-light responses (PPP variables)		SEASON			
		Spring	Summer stratification		Winter mixing
			(July)	(September)	
DEPTH	Superficial layers	Chl-<i>a</i>	Chl-<i>a</i>	Chl-<i>a</i>	-
		-	TA	TA	TA
		H	H	-	-
	Deeper layers	-	Chl-<i>a</i>*	Chl-<i>a</i>*	-
		-	-	TA/TB*	TA/TB
		H	H*	H*	-

Enrichment-light responses (PPP groups)		SEASON			
		Spring	Summer stratification		Winter mixing
			(July)	(September)	
DEPTH	Superficial layers		APC		
			CRYP	APC	APC
		CHLO	DINO	ZYG	CRYP
			BACILL	BACILL	
			CHLO		
	Deeper layers			APC*	
		BACILL	BACILL*	CRYP*	APC
		DINO		DINO*	
				BACILL*	

*Incubated in an upper depth to avoid light limitation

Chl-*a*: Chlorophyll-*a* concentration; **TA**: Total phytoplankton abundance; **TB**: Total phytoplankton biovolume; **H**: Shannon's diversity index and Margalef's diversity index

APC = Autotrophic picocyanobacteria; **BACILL** = Bacillariophyceae; **CHLO** = Chlorophyceae; **CRYP** = Cryptophyceae; **DINO** = Dinophyceae; **ZYG** = Zygnematophyceae

Figura 7.14. Respuestas significativas estadísticamente sobre las variables del fitoplancton (PPP) consideradas (recuadro superior: concentración de clorofila *a*, abundancia total del fitoplancton, biovolumen total del fitoplancton y diversidad) y sobre los grandes grupos fitoplanctónicos (cuadro inferior; combinando resultados de abundancia y biovolumen) tras la realización de experiencias de enriquecimiento de nutrientes *in situ* en la Laguna de El Tejo durante 2003-04.

Figure 7.14. Statistically significant responses to phytoplankton (PPP) variables (upper box: chlorophyll-*a* concentration, total phytoplankton abundance, total phytoplankton biovolume and diversity) and to major phytoplankton groups (bottom box; abundance and biovolume results combined) after *in situ* bioassays performed in Lake El Tejo during 2003-04.

Por lo general los grupos taxonómicos y las especies relevantes implicadas en estos bioensayos son las que se detallaron en la composición y dinámica del fitoplancton de esta laguna, no obstante es interesante observar que el grupo y/o especie que se mostró limitada por determinado nutriente y/o luz en cierta fecha o profundidad era aquel grupo (o especie) que justo fue dominante o bien en la fecha precedente o bien en esa misma fecha pero a otra profundidad. En este sentido, durante la estratificación de julio en aguas epilimnéticas con baja disponibilidad de nutrientes por agotamiento es destacable el incremento de *C. delicatula* tras la adición de nutrientes (principalmente Si y N), diatomea que era dominante previamente coincidiendo con una mayor disponibilidad de nutrientes en el medio. En relación a esto, los bioensayos demuestran que el descenso en importancia relativa de esta diatomea durante la estratificación pudo ser debido a limitación de Si y N. Respecto al inicio de la estratificación, con dominancia en el medio de diatomeas, la adición de N y P favoreció a las clorofíceas. Las experiencias realizadas en esta fecha apuntan la existencia de co-limitación NP, y puesto que las pequeñas diatomeas céntricas parecen estar limitadas por Si, posiblemente el enriquecimiento indujo el crecimiento de pequeñas clorofíceas que están limitadas por P y/o NP en los ensayos donde no se añadió Si, por lo que se redujo la competencia de las diatomeas. La abundancia de dichas clorofíceas y el biovolumen de dinofíceas eran relativamente importantes en la laguna en la estratificación de julio, y los diferentes tratamientos influenciaron de distinta manera a las diversas especies de algas, por lo que las respuestas significativas eran fruto de las interacciones entre dichas especies algales. Por otra parte, la adición de nutrientes en aguas superficiales en esta fecha también estimuló a criptofíceas y APC, grupos que son dominantes en el medio en aguas profundas. Tal y como se refirió anteriormente, ambos grupos son muy eficientes en el uso de recursos en condiciones de baja radiación y alta concentración de nutrientes, luego los resultados del bioensayo vienen a indicar que en aguas epilimnéticas durante la estratificación (con alta radiación y baja disponibilidad de nutrientes)

el crecimiento de criptofíceas y APC está limitado por nutrientes, pero es fruto de la competencia con las otras algas. La escasa respuesta de las diatomeas en el tratamiento NPSi, puede ser debida también a la mayor eficiencia de las clorofíceas y zygnematofíceas en captar N y P, cuando ambos nutrientes están disponibles. Los bioensayos revelaron que hay co-limitación NP para el crecimiento de las zygnematofíceas, en concreto para *C. abbreviatum* que en esa fecha presentaba máximos en estratos inferiores, y por tanto es posible confirmar la existencia de limitación lumínica. En referencia a esta especie, y tal y como comentamos al describir la dinámica de esta laguna, Spijkerman y Coesel (1997, 1998) demostraron que *C. abbreviatum* var. *planctonicum* es una especie de lagos oligo-mesotróficos que presenta una alta APA (*alkaline phosphatase activity*), hecho que evidencia su alta eficiencia en la explotación del P del medio y que le confiere cierta ventaja competitiva frente a otras especies en condiciones de escasez de nutrientes, como sucede a finales de verano en aguas epilimnéticas de lagos estratificados verticalmente. Así mismo, estos autores señalan que, al menos en cultivo, algunas especies del género *Cosmarium* procedentes de sistemas oligotróficos siempre presentan un mucílago extracelular alrededor de la célula cuya función podría relacionarse con la captura de nutrientes en estos medios (Coesel, 1994; Spijkerman & Coesel 1997, 1998). Por otra parte, aunque las desmidiales constituyen *per se* un grupo funcional (FG) asociado con el epilimnion en periodos de estabilidad térmica de las aguas y tolerancia a deficiencia de nutrientes (Reynolds et al., 2002) algunas especies presentan una adaptación a bajas intensidades lumínicas y a perturbaciones por mezcla (Coesel & Wandenaar, 1990; Reynolds et al., 2002; Barbosa et al., 2013), y por tanto se trata de un grupo taxonómico y funcional (*sensu* Reynolds et al., 2002 y Padisák et al., 2009) con alta capacidad competitiva en el epilimnion. Todas estas evidencias podrían explicar la floración masiva (*bloom*) de varias especies del género *Cosmarium* a finales de la estratificación de 1998 (capítulo 5; Morata et al., 2003).

Al inicio de la estratificación en aguas metalimnéticas diatomeas y dinofíceas activaron su crecimiento tras el enriquecimiento, pero con respuestas muy diferentes a los distintos tratamientos. En el caso concreto de las dinofíceas, su gran tamaño habitualmente condiciona una baja tasa de crecimiento y baja afinidad por los nutrientes (Tang, 1996), lo que les confiere una ventaja en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (Raven, 1997). Como comentamos anteriormente, durante la estratificación la ausencia de respuesta al enriquecimiento en aguas profundas unido al afecto positivo de la adición de nutrientes cuando dichas aguas eran incubadas en estratos superiores indica que es la disponibilidad de radiación lumínica la que primeramente limita el crecimiento del fitoplancton en todos los grupos. En la estratificación de julio las diatomeas en aguas profundas estaban limitadas por la luz y por Si y N, nutrientes limitantes también para el desarrollo de este grupo en aguas superficiales. Con el avance de la estación (septiembre) y en situación de mayor agotamiento de los nutrientes en toda la columna de agua, también el metalimnion tuvo un déficit de nutrientes. Previamente argumentamos que en el caso concreto de las APC la no respuesta tras el enriquecimiento en los bioensayos en julio pero sí en septiembre probablemente sea debido a que en julio la concentración de nutrientes en el medio no esté limitando a este grupo (dado que son muy eficientes en la explotación de los recursos o que pueden acumular reservas de P), y sin embargo al avanzar la estación el agotamiento de los mismos finalmente les induce a presentar una respuesta positiva, como sucede en todos los tratamientos con adiciones de P. En cuanto a la mezcla invernal, a pesar de que se vuelven a poner en circulación nutrientes en toda la columna de agua, hay limitación lumínica al aumentar la turbidez por mayor cantidad de partículas en suspensión (Kirk, 1985; Diehl, 2002; Kunz & Diehl, 2003) y por la disminución del fotoperiodo (Reynolds & Irish, 1997), y en este contexto los bioensayos mostraron que las APC están limitadas principalmente por P. En invierno aumentó la abundancia relativa de las criptofíceas en toda la columna de agua y por ello los resultados de

los bioensayos muestran que hay una respuesta de la abundancia relativa a los diferentes tratamientos contrapuesta a la de los otros grupos algales (especialmente a las diatomeas) más dependientes de la disponibilidad de N. Además podrían ser más eficientes en el uso de los recursos a pesar del menor fotoperiodo. Dichas perturbaciones se relacionan con un reinicio (*reset*) estructural que favorece el desarrollo de comunidades fitoplanctónicas emergentes menos selectivas y más eficaces en el aprovechamiento de los recursos (Reynolds, 2001; Huisman et al., 2004). En general los bioensayos avalaron la idea de que las APC son más eficientes que el nanofitoplancton en la aprovechamiento de los recursos ambientales en condiciones de escasez lumínica y de N y Si (e.g. Schallenberg & Burns, 2001; Winder, 2009), lo que confirma la idea de que estas pequeñas procariontas habitualmente dominan la producción primaria en sistemas acuáticos oligotróficos (e.g. Camacho et al., 2003b; Camacho, 2006; Sawatzky et al., 2006), si bien nuestros resultados también revelan que en términos de biovolumen el nanofitoplancton es más importante.

La disparidad de resultados al comparar las variables chl-*a*, abundancia y biovolumen fitoplanctónico para distintas fechas y profundidades y dentro de los distintos niveles de análisis (totales, nanofitoplancton vs. picoplancton, grupos algales, especies, diversidad) es debido a que el efecto de la adición de nutrientes difiere entre los grupos taxonómicos (Morel, 1987; Litchman et al., 2004, 2007), bien a nivel de los rasgos propios de cada grupo (tamaño, forma, concentración de chl-*a*, tiempo de división, senescencia) así como provocar variaciones dentro de cada especie (cambio de la tasa de replicación, variación fisiológica del nutriente limitante, alteración de la APA, cambio en las tasas de almacenamiento- uso del nutriente) e incluso producir interferencias con otros organismos del medio como bacterias heterótrofas debido a que sus altas tasas de consumo de nutrientes (e.g. Cotner & Biddanda, 2002) podrían suponer una menor respuesta por parte del fitoplancton. Estos desajustes, unidos a posibles efectos de sinergias

y/o antagonismos entre los factores que determinan el crecimiento fitoplanctónico, indican que posiblemente considerar cada una de las variables de estudio por separado no sea adecuado para describir los mecanismos que gobiernan dicha dinámica. Si bien gran número de trabajos sobre ecología del fitoplancton muestran la relativa correspondencia entre concentración de chl-*a* y la biomasa fitoplanctónica total (e.g. Hecky & Kilham, 1988), de modo que la concentración de chl-*a* es utilizada habitualmente como una medida indirecta de biomasa del fitoplancton, nuestros resultados presentaron una mayor analogía entre los perfiles verticales de abundancia fitoplanctónica total y concentración de chl-*a* que respecto al biovolumen total. Tal y como comentamos anteriormente, este desfase entre clorofila y biomasa podría ser debido a que el contenido celular de chl-*a* puede variar en función de la luz y los nutrientes para cada grupo taxonómico debido a su fisiología, tamaño y potencial capacidad mixotrófica (Richardson et al., 1983; Geider et al., 1998; Descy et al., 2009). De este modo, aunque el contenido en chl-*a* de las APC es pequeño, su abundancia en un 95% respecto al total del fitoplancton en todas las muestras podría explicar dicha correlación clorofila *a* -abundancia fitoplanctónica. Así mismo, diversos experimentos demuestran que la concentración celular de chl-*a* disminuye en condiciones de limitación por P (Litchman et al., 2003) luego en esa situación los casos de adición de nutrientes que no contienen P podrían estar sobrestimados respecto a la concentración de este pigmento. Por otra parte, la adición de nutrientes y/o aumento de PAR estimula más activamente la división celular de organismos pequeños (e.g. Banse, 1976; Hecky & Kilham, 1988; Delgado et al., 2009) como APC y clorofíceas unicelulares frente a algas de mayor tamaño y/o de organización compleja, puesto que la tasa de replicación decrece de forma exponencial en relación al tamaño celular (Reynolds, 1984; Tang, 1996). Además, la capacidad de asimilación de los recursos (*nutrient uptake*) y generación de biomasa es mayor en organismos con mayor relación S:V (Reynolds, 2001). En relación a esto, el tiempo de incubación de los bioensayos

podría no ser suficiente para detectar efectos sobre algas más grandes y/o más complejas, mientras que aumentar la incubación podría afectar negativamente a dichos organismos que se dividen más rápidamente y hubieran alcanzado antes su máximo crecimiento exponencial, unido a una mayor incidencia de otros factores (presión de pastoreo por presencia de zooplancton, competencia por los recursos, reciclado de nutrientes). Por otra parte, el efecto del enriquecimiento puede ser negativo cuando determinado nutriente (o combinaciones de ellos) afecte al desarrollo de los organismos, como un estrés oxidativo en condiciones de baja radiación, lo que puede explicar el descenso en abundancia al inicio de la estratificación tras la mayoría de tratamientos. En el caso concreto de las cianobacterias existen trabajos experimentales que muestran inhibición del crecimiento tras adición de P (Ernst et al., 2005). Sin embargo, posiblemente no exista un efecto negativo de la adición de nutrientes, más bien podría deberse a que al efectuar ensayos con una mezcla de algas, existan interacciones entre ellas y el aumento de unas pueda redundar en la disminución de otras, de modo que en el cómputo global de la comunidad fitoplanctónica se producen compensaciones que amortiguan las diferencias entre tratamientos. También es posible que la adición de nutrientes no induzca respuesta si los organismos requieren de otro elemento (Fe, Cu, etc.) para su desarrollo (Kalff, 2002) o por efecto de control por parte del zooplancton herbívoro (Elser & Kimmel, 1986; Beardall et al., 2001; Thingstad et al., 2005). Otro caso que puede explicar la disparidad en los resultados es que los mayores biovolúmenes se debieron a dinofíceas cuyo contenido en chl-*a* es pequeño en relación a su gran volumen, y por tanto cuando este grupo algal tiene presencias relevantes la correspondencia entre clorofila *a*-biovolumen fitoplanctónico no es óptima. Respecto al biovolumen también es interesante detallar que bajo microscopio de fluorescencia se observó que para los bioensayos realizados durante la estratificación en aguas metalimnéticas el tamaño celular de las APC se incrementaba respecto al inicio de la incubación en aquellos tratamientos que incluían P, debido a la acumulación en su interior de

gránulos de polifosfatos, actividad que modifica el biovolumen pero que no se puede relacionar directamente con los mecanismos que limitan su actividad como productor primario. En cuanto al N, algunas experiencias muestran que la capacidad de almacenar este nutriente por parte de los organismos es menor que frente al P (White et al., 1985) y que además las algas cuando están en limitación de N lo toman muy rápido (Fitzgerald, 1969; Lean et al., 1982). El almacenamiento de P generando gránulos de polifosfato se ha descrito para cianobacterias en aguas oligotróficas (Whitton et al., 2005) y supone una estrategia ventajosa para el aprovechamiento del nutriente en condiciones de deficiencia de P. Es así que esta acumulación de P por parte de ciertas especies no sólo cambia el biovolumen, sino que también se relaciona con la capacidad de dichos organismos en asimilar, almacenar y procesar los recursos en función de las necesidades metabólicas de cada momento (*luxury uptake*) y que varían dependiendo de cada especie y condiciones del entorno (Morel, 1987; Dodds & Priscu, 1990; Grover, 1991; Reynolds, 2001) incluso produciendo variaciones instantáneas frente al requerimiento (Beardall et al., 2001). En este sentido, sería de interés determinar la APA como método de estima de la limitación de P para cada especie (Rengefors et al., 2003) y de la concentración celular de P (Litchman & Nguyen, 2008), siendo particularmente importante para la Laguna de El Tejo dada la comentada alta actividad de esta enzima en las zygmatofíceas desmidiales que le permite mantener relativamente abundantes poblaciones epi- y metalimnéticas cuando la disponibilidad de P en el medio es baja (Morata et al., 2003). Dicha eficiencia en el aprovechamiento del P ante su baja disponibilidad en el medio se ha encontrado en pequeñas diatomeas céntricas (*Cyclotella*), desmidiales (*Cosmarium*) y crisofíceas (Reynolds, 2001). Por último, si en determinados casos ciertas algas estaban funcionando con metabolismo heterótrofo (y dado que en los recuentos no es posible discriminar su fisiología), abundancia y biovolumen del fitoplancton se encontrarían sobreestimados frente a la concentración de chl-*a*.

Una perspectiva aún más compleja para dilucidar la dinámica temporal y espacial del fitoplancton en la Laguna de El Tejo es aquella que tiene en cuenta los índices de diversidad, puesto que relacionan entre sí composición, abundancia, así como el peso relativo y distribución de cada una de las especies frente al total de la población, y además la biodiversidad se relaciona con las concentraciones de nutrientes del medio (Hillebrand et al, 2001). Los bioensayos revelaron que tras la adición de nutrientes al inicio de la estratificación (mayo) la diversidad respondió significativamente en aguas superficiales y profundas, mientras que durante la estratificación estival en aguas superficiales varió significativamente en julio y en aguas profundas (julio y septiembre) sólo cuando la incubación se realizaba a mayor disponibilidad lumínica. Estos resultados en cierta medida se relacionan con los descritos para los efectos del enriquecimiento a nivel de los distintos grupos algales. Dichas experiencias nos muestran que en general existió un cambio en la respuesta al efecto de la adición de nutrientes por las distintas especies. Cuando el tratamiento favorecía a especies minoritarias aumentaba la diversidad, y ésta disminuía cuando se beneficiaba a las especies dominantes. Por ejemplo, se observa en varias ocasiones disminuciones en el tratamiento con Si, puesto que este tratamiento estimulaba a la especie dominante *C. delicatula*.

Sintetizando los resultados (Figs. 7.13 y 7.14) podríamos concluir que en el epilimnion al inicio de la estratificación térmica vertical y coincidiendo con un agotamiento de nutrientes en el medio la restricción en el crecimiento de los PPP era principalmente debida al P, cambiando dicha limitación a N durante la marcada estratificación estival, y en septiembre sería probable una co-limitación NP. Por otro lado, el Si es también un elemento limitante que controla sobre todo la abundancia relativa de las diatomeas desde el inicio de la estratificación. En todos los casos hay que tener en cuenta que la respuesta de las distintas especies es diferente en cada tratamiento, además de considerar que el resultado final viene determinado por la interacción entre dichas especies. Numerosas experiencias de

enriquecimiento muestran que cambios en el nutriente limitante pueden tener un gran impacto en sistemas oligotróficos (Elser et al., 1990; Sawatzky et al., 2007), siendo muy frecuente la situación de co-limitación que parece prevalecer en la mayoría de los ecosistemas acuáticos (Elser et al., 2007; North et al., 2007; Lewis & Wurstbaugh, 2008). Así mismo, se debe sopesar la posible existencia de interacciones sinérgicas y/o antagónicas entre los factores que gobiernan el sistema (Folt et al., 1999; Delgado-Molina et al., 2009), como por ejemplo los casos en los que la respuesta a la adición de dos nutrientes es mayor a la esperada si se tiene en cuenta la suma de ambas respuestas por separado (Elser et al., 2007; Allgeier et al., 2011; Harpole et al., 2011), lo que dificulta la inferencia de predicciones sobre la dinámica del sistema. En cualquier caso, luz y nutrientes se consideran los factores que de forma más intensa y selectiva controlan el crecimiento y desarrollo del fitoplancton (Reynolds, 1999, 2001), si bien es cierto que todo ello dentro de un escenario físico donde la mezcla vertical, la estratificación o el calentamiento global (Zohary et al., 2010) se constituyen como principales motores en estas dinámicas.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN GENERAL

A grandes rasgos, la composición y dinámica de los productores primarios en este sistema cárstico profundo durante los dos periodos de estudio, se puede considerar estable y sujeta a la misma periodicidad estacional. Además, nuestras observaciones señalan la importancia en abundancia relativa de la fracción de las APC frente a las algas eucariotas sustentando la producción primaria en momentos de baja disponibilidad de nutrientes y/o lumínica, tal y como se ha descrito en otros sistemas oligotróficos (e.g. Vörös et al., 1998; Schallenberg & Burns, 2001; Callieri & Stockner, 2002; Winder, 2009), siendo además estos organismos los posibles causantes de los fenómenos de blanqueado (*whiting*) por precipitación de calcita (Dittrich & Obst, 2004) que en alguna ocasión se han producido en esta laguna coincidiendo con la estratificación estival (aunque nunca tan llamativos como en la Laguna de La Cruz; Sendra, 2009). Por otra parte, existen estudios de abundancia y/o biovolumen fitoplanctónico para lagos cársticos a lo largo del tiempo que muestran que por lo general la composición y dinámica determinada para cada uno de estos lagos se repite en cada ciclo hidrológico, por ejemplo observando los registros a lo largo del tiempo para la cercana Laguna de La Cruz (e.g. Rojo & Miracle, 1987; Dasi & Miracle, 1991; Sendra, 2009), en los lagos de Banyoles (Planas, 1973, 1990), Estanya (Ávila et al., 1984), Montcortés (Camps et al., 1976) y Vilà (García de Emiliani, 1973). Del mismo modo, la sucesión estacional descrita para la Laguna de El Tejo es similar a la de otros lagos profundos estratificados, donde en aguas superficiales se encuentran cuantiosas poblaciones de pequeñas diatomeas céntricas (o pennadas en algunos lagos) a lo largo de todo el año, grandes dinofíceas durante

la estratificación térmica y aumento de clorofíceas en momentos de mayor disponibilidad de nutrientes en el medio (inicio de estratificación y mezcla invernal) mientras que las aguas profundas son dominadas por APC y criptofíceas, las cuales a su vez también aumentan en toda la columna de agua durante la mezcla invernal. Como ejemplos de dinámicas similares en lagos profundos alcalinos y oligotróficos (y/o oligo-mesotróficos) de la región templada podemos señalar el Lago Constanza (Sommer, 1986), los lagos alemanes Laacher See (Eckartz-Nolden, 1992) y Stechlin (Padisák et al., 2003) y los lagos italianos Garda (Salmaso, 2000) y Maggiore (Morabito et al., 2003), aunque en estos casos en ciertas épocas del año se registran importantes poblaciones de cianobacterias filamentosas, situación que no ha sido detectada en la Laguna de El Tejo. Sin embargo, la dinámica de los PPP en la laguna de estudio presenta una mayor equivalencia al compararla con los lagos cársticos españoles comentados anteriormente, con el Lago Kozjak de la región cárstica de los Lagos de Plitvice (Žutinić et al., 2014), y con los lagos Vrana y Visovac situados en la región cárstica de los Alpes Dináricos, todos ellos en Croacia (Glicora et al., 2007, 2011), donde además se registraron importantes poblaciones de diatomeas céntricas, dinofíceas y pequeños *Cosmarium* (en el caso del Lago Vrana, aunque se trata de un lago somero con presencia de macrófitos), hecho que nos lleva a destacar que posiblemente la carga iónica del sistema constituye un elemento que condiciona la composición y dinámica del fitoplancton (Pérez-Martínez & Sánchez-Castillo, 2001).

En relación con esto, los mecanismos que gobiernan a los PPP de esta laguna están condicionados por la naturaleza alcalina-carbonatada del propio sistema cárstico donde se asienta (e.g. favorece la precipitación de P), por una alimentación subterránea principal proveniente del acuífero (*input*), por su baja relación superficie:volumen (S:V) así como por su encajonamiento en una dolina de altas paredes escarpadas que impiden esorrentía desde la laguna (*output*) y

reducen la incidencia de eventos meteorológicos (e.g. viento) y de presiones antropológicas (e.g. acceso de humanos y/o ganado), unido a la ubicación de dicho sistema en una región de baja densidad poblacional. Sin embargo es interesante señalar que, a pesar de existir otras lagunas próximas ubicadas dentro del mismo sistema cárstico, sus características limnológicas son llamativamente distintas, como son el Lagunillo de El Tejo (con mayor relación S:V, presencia de macrófitos y mesotrófica; e.g. Vicente & Miracle, 1984) y la Laguna de La Cruz (meromítica y mesoeutrófica; e.g. Julià et al., 1998; Miracle et al., 1998; Sendra, 2009), lo que nos puede revelar que el funcionamiento de la Laguna de El Tejo se halla condicionado al hecho de tratarse de la laguna más grande y profunda situada en una cubeta de hundimiento con laderas de mayor altura recubiertas con una vegetación forestal más densa y estructurada dentro de este sistema lagunar, resultando la de más difícil acceso. Estas diferencias en la producción primaria en lagos cársticos de origen y morfología similar dentro de una misma área también se ha descrito en la región del Volga medio (Gusev, 2008), siendo por tanto el régimen hidrológico el que parece gobernar la compleja distribución de los PPP.

En cuanto a la composición y dinámica del nanofitoplancton en la Laguna de El Tejo, al inicio de la estratificación el epilimnion y metalimnion era sustentado por las grandes dinofíceas *C. hirundinella* y *P. umbonatum* junto a numerosas diatomeas céntricas del género *Cyclotella*, mientras que en la oxiclina abundaban las APC, diatomeas, clorofíceas y criptofíceas. No obstante es posible que la gran abundancia de diatomeas céntricas y clorofíceas unicelulares (principalmente *T. minimum*) a esta profundidad sea debida a una mejor preservación en aguas profundas (una vez se inicia su sedimentación y/o senescencia) dada su mayor resistencia a la degradación (frústulos de Si en diatomeas y biopolímeros alifáticos no hidrolizables en algunos géneros de clorofíceas; Blokker et al., 1998), acumulándose en dichos estratos por procesos de sedimentación pasiva

(Morata et al., 2003). Durante la estratificación estival, y coincidiendo con la menor disponibilidad de nutrientes (por agotamiento de los mismos en la columna de agua y por un descenso de aportes profundos por parte del acuífero en verano) la diversidad aumentó y los grupos algales dominantes eran dinofíceas, zygnetofíceas del género *Cosmarium*, clorofíceas unicelulares y diatomeas céntricas en el epi- y metalimnion, aumentando y profundizando su densidad a medida que avanzaba la estación (en paralelo al descenso de la termoclina), en tanto que en las aguas profundas dominaban APC y criptofíceas de los géneros *Plagioselmis* y *Cryptomonas*. La bibliografía referente a las zygnetofíceas apunta que no suelen ser dominantes en el plancton (Hutchinson, 1967) aunque pueden llegar a ser relativamente abundantes en sistemas oligo-mesotróficos (Brook, 1965; Coesel, 1994) principalmente al final del periodo estival en lagos templados (Canter & Lund, 1966; Nygaard, 1991; Coesel & Kooijman-Van Blokland, 1994), además de asociar su presencia y desarrollo a aguas de naturaleza ácida (e.g. aguas pantanosas) y/o someras (formando parte del fitoplancton y/o fitobentos; Coesel & Meesters, 2007), luego su destacable presencia en un lago profundo y alcalino durante la estratificación térmica vertical puede deberse a la alta actividad de la enzima fosfatasa alcalina presente en este grupo (Spijkerman & Coesel, 1997, 1998) y así bajo condiciones de baja disponibilidad de P inorgánico en el medio durante el periodo estival se promueve su óptimo desarrollo (Morata et al., 2003). En varios trabajos (Coesel, 1993; Coesel & Kooijman-Van Blokland, 1994) se venía apuntando cierta afinidad y/o tolerancia de algunas especies de zygnetofíceas a medios alcalinos precisamente por la presencia de la enzima fosfatasa alcalina, si bien recientemente se han encontrado abundantes poblaciones de zygnetofíceas en sistemas de aguas alcalinas en la región húngara del Tisza (Fehér, 2003), en la provincia serbia de Vojvodina (Stamenković & Cvijan, 2008) y en el Lago Vrana del sistema cárstico de los Alpes Dináricos en Croacia (Glicora et al., 2007), así como en la Laguna de La Cruz (Sendra, 2009) perteneciente al mismo sistema

cárstico de la Laguna de El Tejo, y por tanto nuestras observaciones aportan nuevos datos que contribuyen a redefinir el concepto establecido sobre la capacidad acidófila en las desmidiales.

En la época de mezcla invernal abundancia y biovolumen descendieron en relación a momentos de estratificación de las aguas, aunque la diversidad se mantuvo relativamente alta con presencia y distribución uniforme de diatomeas, clorofíceas, zygematofíceas, APC y criptofíceas en toda la columna de agua. En referencia a estos cambios físicos en la masa de agua muchos autores han remarcado la importancia de las variaciones de turbulencia a escala temporal y vertical (e.g. Reynolds, 1994; Ghosal, et al., 2000) y el establecimiento de la estratificación térmica para la distribución y diversidad de la comunidad pelágica (e.g. Viner, 1985; Margalef, 1997; Lindenschmidt & Chorus, 1998; Salmaso, 2003; Tolotti, et al., 2007), así como sobre la forma y tamaño de las poblaciones fitoplanctónicas (Naselli-Flores et al., 2007; Naselli-Flores, 2013) y que además pueden condicionar su fisiología al inducir cambios en la actividad fotosintética (Zohary et al., 2010). Por otra parte, las variaciones y/o limitaciones de la actividad fotosintética también se pueden relacionar con la menor diversidad detectada en la Laguna de El Tejo en las muestras de agua más superficiales y más profundas: en las aguas profundas debido a que en condiciones de la baja disponibilidad de PAR no todos los grupos fitoplanctónicos son capaces de ser fotosintéticamente eficaces, mientras que en las capas más cercanas a la superficie un exceso de radiación lumínica puede inducir mecanismos de fotoinhibición en la actividad fotosintética de las algas eucariotas (Reynolds, 1984; Eilers & Peeters, 1988) manteniendo así ralentizadas sus funciones de crecimiento y desarrollo (e incluso acelerando su senescencia) en el caso de algas ‘pasivas’ frente a algas con mecanismos móviles (e.g. flagelos) capaces de desplazarse en busca de condiciones más adecuadas (e.g. criptofíceas, dinofíceas).

En múltiples trabajos se refiere la relación entre la estabilidad de un sistema acuático y las dinámicas para los organismos fitoplanctónicos que se establecen en el mismo, mostrando una fuerte correlación entre factores ambientales y el funcionamiento ecológico (e.g. Reynolds, 1997; Naselli-Flores, 2000; Kruk et al., 2002; Naselli-Flores et al., 2003). Si bien la estabilidad se asocia a los momentos de estratificación térmica vertical, la repetición de cada evento de mezcla-estratificación-mezcla a lo largo del tiempo se puede considerar un sistema estable a un mayor nivel de escala temporal con una relativamente alta predictibilidad. En referencia a esta relación entre el ambiente y los organismos, podemos señalar que existe una aproximación al estudio de la dinámica de los PPP en sistemas acuáticos mediante el uso de clasificaciones funcionales frente a las clásicas categorizaciones por grupos taxonómicos. Dicha clasificación taxonómica a nivel de grupos para la Laguna de El Tejo es la que se ha detallado anteriormente, pero refleja de forma parcial la funcionalidad del fitoplancton (Litchman & Klausmeier, 2008; Litchman et al., 2010) y además es difícil predecir las dinámicas de los organismos debido a la alta diversidad y presencia potencial de las especies de algas (Benincà et al., 2008). Sin embargo, en estas clasificaciones funcionales sí se tienen en cuenta los rasgos propios de cada especie y sus condicionantes ambientales asociados, generándose agrupaciones sencillas que pueden ser de utilidad cuando los propósitos del estudio sean más ecológicos que taxonómicos (Reynolds et al., 2002; Salmaso & Padisák, 2007; Padisák et al., 2009). Este tipo de ordenación categórica se inició en un innovador trabajo de Reynolds et al. (2002) en el cual se sugieren una serie de grupos funcionales (FG) a modo de codones, cada uno de los cuales tiene en cuenta las relaciones entre presencia de determinadas especies o grupos algales, algunos rasgos propios y condiciones del hábitat, y que se basan en el análisis de multitud de datos registrados por los fitoplanctólogos y en la amplia experiencia de los propios autores (e.g. Reynolds, 1997). Tras su publicación, esta clasificación ha sido utilizada con profusión entre los ecólogos pero sin embargo se han detectado

multitud de problemas en su aplicación al tratarse de un sistema abierto que no incluye la totalidad de especies y relaciones ambientales, hecho que puede llevar a asociar erróneamente determinada especie en un grupo funcional concreto, lo que ha requerido de una revisión y actualización de dicha clasificación (Padisák et al., 2009). Así, extrapolando nuestros resultados simplificados para la Laguna de El Tejo a la codificación de los FG, la dinámica fitoplanctónica quedaría descrita tal cual se esquematiza en la figura 8.1, que muestra un ensamblado de grupos a lo largo de la escala temporal y vertical, con diferencias entre aguas epilimnéticas y profundas, y uniformidad vertical durante la mezcla invernal. En esta concepción ecológica el ensamblado no es estrictamente una sucesión en el sentido clásico de desplazamiento de una especie por otra (Reynolds, 1997). Los FG sugieren que en la Laguna de El Tejo el ensamblado de APC y criptofíceas parece ser más estable en el tiempo al encontrarse en aguas profundas durante la estratificación y en toda la columna de agua en la época de mezcla, así como la habitual presencia de *C. delicatula* (codon A) prácticamente en toda la columna de agua al inicio de la estratificación y durante la mezcla invernal.

Por otra parte, Salmaso & Padisák (2007) proponen otra clasificación de grupos morfo-funcionales (MFG) que incorpora aspecto morfológicos y funcionales de los grupos taxonómicos. La aplicación de estos códigos para los MFG en la Laguna de El Tejo se esquematiza en la figura 8.2. Adicionalmente, existe otra clasificación funcional alternativa a las anteriores que se basa únicamente en aspectos morfológicos (Kruk et al., 2010; Kruk & Segura, 2012), lo que puede simplificar bastante esta categorización sobre todo cuando no se cuenta con la información necesaria sobre la fisiología concreta de las especies o de los condicionantes ambientales que están afectando a su dinámica. Los grupos funcionales basados en la morfología (MB-FG) para la Laguna de El Tejo serían los expuestos en la figura 8.3.

Functional groups-FG*		SEASON			
		Spring		Summer stratification	Winter mixing
DEPTH	Superficial layers	A + Lo	↔	Lo + N	
	Deep layers	A + Z + Y	↔	Z + Y	↔ A + Z + Y

*Codon code (Reynolds et al., 2002; Padisák et al., 2009):

A = *Cyclotella delicatula* / Clear, deep and base poor lakes / Nutrient deficiency tolerance

Lo = *Ceratium hirundinella* - *Parvodinium umbonatum* / Epilimnia of stratified lakes

N = *Cosmarium* spp. / Epilimnia of stratified lakes / Nutrient deficiency tolerance

Z = Prokaryote picoplankton / Metalimnia-upper hypolimnia of deep oligotrophic lakes / Low nutrient tolerance

Y = *Cryptomonas* spp. / Wide range of habitats – Lentic ecosystems / Low light tolerance

Figura 8.1. Ensamblado de grupos funcionales (FG) para la Laguna de El Tejo, según Reynolds et al. (2002) y Padisák et al. (2009).

Figure 8.1. Functional groups (FG) assemblages in Lake El Tejo following Reynolds et al. (2002) and Padisák et al. (2009).

Morpho-functional groups-MFG*		SEASON			
		Spring		Summer stratification	Winter mixing
DEPTH	Superficial layers	7a + 1b	↔	2b + 9a	
	Deep layers	7a + 4 + 2d	↔	4 + 2d	↔ 7a + 4 + 2d

*Code (Salmaso & Padisák, 2007):

7a = Small centric diatoms – Without flagella

1b = Large dinophytes – Flagellates – Potential mixotrophs

2b = Small dinophytes – Flagellates – Potential mixotrophs

9a = Small zygnematophytes unicellulars – Without flagella

4 = Unicellular cyanobacteria – Without flagella

2d = Small cryptophytes – Flagellates – Potential mixotrophs

Figura 8.2. Ensamblado de los grupos morfo-funcionales (MFG) para la Laguna de El Tejo, según Salmaso & Padisák (2007).

Figure 8.2. Morpho-functional groups (MFG) assemblages in Lake El Tejo following Salmaso & Padisák (2007).

Morphology-based functional groups-MB-FG*		SEASON		
		Spring	Summer stratification	Winter mixing
DEPTH	Superficial layers	VI + V ↔	V + IV	↔ VI + I + V
	Deep layers	VI + I + V ↔	I + V	

*Code (Kruk et al., 2010):

Group VI = Non-flagellated with siliceous exoskeletons

Group V = Flagellates of medium to large size

Group IV = Medium size, no specializations

Group I = Small high S:V

Figura 8.3. Ensamblado de grupos funcionales basados en morfología (MB-FG) para la Laguna de El Tejo, según Kruk et al. (2010).

Figure 8.3. Morphology-based functional groups (MB-FG) assemblages in Lake El Tejo following Kruk et al. (2010).

Todas estas clasificaciones no son excluyentes entre sí, y constituyen formas de agrupación sencilla que pueden ayudar a entender y predecir la composición y dinámica de la comunidad fitoplanctónica (Salmaso et al., 2015), principalmente en estudios con exhaustivos análisis taxonómicos tradicionales como el realizado en la Laguna de El Tejo. Aun así, una definición más precisa de los ensamblados requeriría de un mayor conocimiento de la autoecología de cada especie (Padisák et al., 2009) y de seguimientos de las poblaciones fitoplanctónicas de dicha laguna a una menor escala temporal.

En relación a la descripción de las dinámicas del fitoplancton es importante tener en cuenta que los sistemas naturales cambian frecuentemente, siendo posible explicar la coexistencia de las especies mediante modelos ecológicos de no-equilibrio como el de Hutchinson (1961) o la *Intermediate Disturbance Hypothesis-IDH* (Connell, 1978; adaptada por Reynolds, 1988 y Padisák et al.,

1993), ya que en la naturaleza el equilibrio (*steady-state*) no es tanto la regla sino más bien la excepción (Reynolds, 1997), sobre todo en climas templados (Padisák et al., 2009). Así, según la IDH la dinámica del fitoplancton en la Laguna de El Tejo podría explicarse por los cambios de frecuencia o intensidad intermedia que se producen en las escalas vertical y temporal. Al respecto de esto, y como ya comentamos, nuestras investigaciones en la Laguna de El Tejo muestran una dinámica que parece repetirse a lo largo de los años y que hemos estimado que paradójicamente se podría denominar ‘dinámica estable’, fruto de la interrelación entre intensidad, frecuencia y persistencia de las perturbaciones sobre el fitoplancton en el espacio y tiempo (Reynolds, 2001), perturbaciones como cambios entre estados y no como alteraciones en sentido negativo (Reynolds et al., 1993), y que situarían a la comunidad fitoplanctónica alejada del *steady-state* (Reynolds 1994, 1997; Naselli-Flores et al., 2003). Dada la complejidad de la cuestión, se requieren más estudios para clarificar este enfoque sobre la dinámica del fitoplancton de esta laguna.

Los resultados obtenidos tras las experiencias de adición de nutrientes realizadas en la Laguna de El Tejo durante este estudio apoyan nuestras observaciones acerca del funcionamiento de la dinámica vertical y temporal del fitoplancton en esta laguna, además de proporcionar información adicional que en cierta medida permite esclarecer los mecanismos que sustentan dicha dinámica. La realización de bioensayos es objeto de crítica por una parte de la comunidad científica (e.g. DeMelo et al., 1992; Carpenter, 1996; Schindler, 1998) generando gran controversia, pero a pesar de la complejidad en cuanto a realización y control de variables implicadas existen multitud de trabajos basados en estas experiencias y que han contribuido al avance del conocimiento ecológico de las dinámicas del plancton (e.g. Hecky & Kilham, 1988; Elser et al., 1990; Dodds et al., 1993; Drenner & Mazumber, 1999; Reynolds, 2001; Spivak et al., 2011), si bien se deben tener en cuenta la existencia de efectos sinérgicos y/o antagónicos entre los

diferentes factores (e.g. Folt et al., 1999; Harpole et al., 2011) y que dificultan el establecimiento de teorías así como la predictibilidad sobre el funcionamiento del sistema (Allgeier et al., 2011). De este modo, nuestra investigación aporta valiosos datos referentes a la limitación por nutrientes y por disponibilidad lumínica en diferentes estratos y periodos de tiempo, dado que no existen muchos estudios en lagos profundos que combinen tantos aspectos (Wurtsbaugh et al., 2001; Sawatzky et al., 2006; Harpole et al., 2011) y se traduzcan en trabajos más integrativos. Del mismo modo los bioensayos han confirmado experimentalmente que hay cambios en el nutriente limitante a escala temporal y vertical (Morata et al., remitido; capítulo 6), y en particular que durante la estratificación estival el N es el limitante, reafirmando la conclusión previa que se obtuvo tras realizar experiencias de enriquecimiento en laboratorio a finales de la estratificación en 1997 con agua de esta laguna y que habían revelado dicha limitación (Camacho et al., 2003c). En este sentido, el presente estudio también señala la importancia del N como nutriente limitante, dado que en sistemas lacustres de estas latitudes habitualmente se había estimado que el crecimiento fitoplanctónico se encontraba limitado por P (e.g. Lewis & Wurtsbaugh, 2008; Sterner, 2008). Estos cambios en el nutriente limitante a escala vertical y temporal son resultado del balance entre la alternancia de periodos de estratificación y mezcla en la laguna, el aumento de los aportes del acuífero en épocas de lluvia (ricos en N de origen agrícola) y las posibles deposiciones atmosféricas (capítulo 6). Por su origen y funcionamiento hidrogeológico esta laguna supone un modelo perfecto para describir la composición y dinámica del fitoplancton dado que las entradas y salidas que inciden en ella son limitadas y controlables. Es por ello que sería de gran interés realizar seguimientos de control de las deposiciones atmosféricas en el área, dado que el aumento de actividad antropogénica está elevando la precipitación de compuestos de N en el hemisferio norte (e.g. Baron et al., 2011) junto a un incremento de eventos de impacto de polvo sahariano (rico en P inorgánico) en el arco este-mediterráneo (e.g. Mladenov et al., 2011)

relacionado con el cambio climático, determinación que tal vez sería de utilidad para explicar íntegramente la dinámica de nutrientes de esta laguna. Al menos hasta el momento el impacto de deposición de N en el área es pequeño según los datos publicados por la Agencia Europea de Medioambiente (EEA, 2007, 2011) y esquematizados en la figura 6.5., aunque un aumento a largo plazo podría alterar la dinámica del sistema (Bergström & Jansson, 2006; Elser et al., 2009; Baron et al., 2011), mientras que el incremento en la incidencia de impactos de polvo sahariano podría conducir a la eutrofización de la laguna como se ha descrito para otros lagos oligotróficos en la región centro-este de la Península Ibérica (Morales et al., 2006; Pulido-Villena et al., 2008).

La limitación por N es paradójica para esta laguna, ya que es en verano cuando se incrementa la pérdida de P del medio puesto que la temperatura acelera su precipitación en un medio carbonatado altamente alcalino (e.g. Dittrich & Koschel, 2002) y por consiguiente lo esperado sería que el fitoplancton estuviera limitado por P. Así se nos plantea un escenario en el cual dicha limitación de N durante la estratificación podría inducir el desarrollo en el medio de especies fijadoras de N atmosférico (cianobacterias heterocísticas), situación que no se registró en ninguna de las campañas llevadas a cabo en la Laguna de El Tejo desde hace décadas, debido a su limitación por P. Por otra parte, observamos que la Laguna de El Tejo presentó importantes poblaciones de criptofíceas en el hipolimnion durante la estratificación y en los meses de invierno, al ser un grupo que por su contenido en ficoeritrina junto a su capacidad mixotrófica (Laybourn-Parry et al., 2005; Litchman et al., 2007) podría desarrollarse en condiciones de baja disponibilidad de luz y/o nutrientes. Sin embargo no es fácil precisar en qué proporción podrían tener ese tipo de metabolismo, pero los resultados evidencian que la adición de nutrientes facilitó su crecimiento cuando disponían de luz, lo que muestra que probablemente cuando no se encuentran limitadas por la luz su metabolismo sea autotrófico.

En cuanto al funcionamiento particular del fitoplancton, los bioensayos vienen a demostrar que hay más eficiencia en la explotación de los recursos del medio para el crecimiento y desarrollo de los productores primarios en varios casos:

- 1) Organismos unicelulares de pequeño tamaño (diatomeas, clorofíceas unicelulares, pequeñas desmidiales, picocianobacterias-APC) con alta eficiencia en la captación de nutrientes debido a una mayor relación S:V y que a su vez induce una mayor tasa de crecimiento, si bien las hace más susceptibles al herbivorismo o pastoreo (*grazing*; Thingstad et al., 2005).
- 2) Organismos eficaces en el aprovechamiento de recursos bajo condiciones de menor disponibilidad lumínica pero presencia de nutrientes y estabilidad en el medio (APC, criptofíceas, diatomeas y dinofíceas).
- 3) Algas adaptadas a entornos estables y con disponibilidad lumínica (dinofíceas, clorofíceas coloniales y zygnematofíceas).
- 4) Organismos capaces de explotar los recursos en entornos inestables (diatomeas, criptofíceas, APC) como sucede durante la mezcla invernal.

Adicionalmente, aunque por el momento no tenemos evidencia experimental que lo confirme, nuestras observaciones y la bibliografía refieren otros casos de eficiencia del fitoplancton:

- 5) Algas móviles (criptofíceas, euglenofíceas y dinofíceas) flageladas capaces de situarse activamente en estratos con condiciones óptimas para su desarrollo (Clegg et al., 2003).

- 6) Algas en disposición colonial (diatomeas, clorofíceas) o con estructuras externas (largas espículas y otras protuberancias) que permiten un aumento de su flotabilidad y estabilidad.

- 7) Algas mixotróficas (criptofíceas, euglenofíceas, dinofíceas, crisofíceas) con posibilidad de cambiar su metabolismo de autótrofo a heterótrofo cuando los recursos del entorno (por ausencia o por competencia con otros grupos) son insuficientes para una adecuada actividad fotosintética (Nygaard & Tobiesen, 1993; Riemann et al., 1995; Jones, 2000; Laybourn-Parry et al., 2005). En concreto, el metabolismo mixotrófico de ciertas algas supone una ventaja estratégica al incrementar su flexibilidad adaptativa ante su entorno, especialmente en sistemas con baja disponibilidad de luz y nutrientes (Raven, 1997; Jones, 2000; Carrillo et al., 2006) como podría suceder en la Laguna de El Tejo durante la estratificación estival, pero sin embargo nuestros resultados no fueron significativamente concluyentes.

Estas siete categorías en las que hemos clasificado el fitoplancton de esta laguna es un tipo particular de grupos funcionales cercana a los MFG y MB-FG (Salmaso & Padisák, 2007; Kruk et al., 2010) elaborada en función de todos los resultados obtenidos a lo largo de estos años de estudio en la Laguna de El Tejo. En cualquier caso, aquellos organismos con mayor plasticidad ante el ambiente serán los más ventajosos competitivamente (Duarte et al., 1990). Trabajar con una mezcla natural de organismos incrementó la dificultad para el manejo de datos y obtención de conclusiones dadas las múltiples variables que los condicionan. Sin embargo, la falta de una correlación nítida entre los resultados para las distintas variables (chl-*a*, abundancia y biovolumen) indica cuán sustancial es que las investigaciones de dinámicas del fitoplancton consideren y combinen un mayor número de variables para acercarnos a la complejidad que subyace en los propios

sistemas ecológicos. Por lo general, los rasgos (*traits*) del fitoplancton (tamaño, forma, movilidad, fotosíntesis, uso de nutrientes, capacidad mixotrófica) varían de forma predecible ante las principales restricciones del entorno (*constraints*: luz, nutrientes) que limitan el crecimiento y desarrollo fitoplanctónico (Litchman & Klausmeier, 2008; Litchman et al., 2010), y a pesar de la relativa vulnerabilidad frente a los cambios en el medio abiótico las dinámicas individuales se traducen en una auto-regulación de las comunidades pelágicas (Reynolds, 2001; Pahl-Wostl, 2007); desvelar la interrelación y ensamblado entre estas dinámicas a nivel específico supone la base para conocer los mecanismos que a un mayor orden dan forma a la estructura de la comunidad, la diversidad y la sucesión estacional (Reynolds, 2001). Es por ello que resultaría de gran valor continuar el estudio de la dinámica de la comunidad fitoplanctónica de la Laguna de El Tejo, introduciendo otros factores como presión de pastoreo por parte del zooplancton, organismos fagótrofos (e.g. ciliados) y parasitismo, presencia de algas endosimbiontes, determinación de capacidad mixotrófica de ciertos grupos algales, composición de la comunidad fitoplanctónica a menor escala temporal (para afinar el ensamblado de especies), mecanismos de uso diferencial de los nutrientes (e.g. actividad fosfatasa alcalina-APA) y/o el posible efecto de deposiciones atmosféricas, así como el funcionamiento de la fracción bacteriana en el reciclado de nutrientes con el último objetivo de clarificar la red trófica de este sistema.

CONCLUSIONES

1. La Laguna de El Tejo es un lago cárstico profundo de naturaleza alcalina-carbonatada situado en una región templada, con una alimentación subterránea principal proveniente del acuífero y una baja relación superficie:volumen, situado en una zona de escasa densidad poblacional, y que durante el periodo de estudio presentó características de oligomesotrofia.
2. Su peculiar morfología favorece el establecimiento de una estratificación térmica estival aproximadamente desde mayo a octubre, seguida de un único evento de mezcla de toda la columna de agua durante el invierno (laguna monomíctica). Estos fuertes cambios en la estructuración física de sus aguas unidos a su régimen hidrológico condicionan los mecanismos que gobiernan a las comunidades pelágicas del sistema.
3. Durante los dos periodos de estudio la composición y dinámica de las poblaciones de productores primarios planctónicos (PPP) en esta laguna estuvo sujeta a la misma periodicidad estacional, y por tanto es altamente predecible, como ocurre en otros lagos profundos estratificados alcalinos situados en estas latitudes. Éstas están condicionadas tanto por la composición química de sus aguas como por los marcados gradientes de los factores ambientales en el perfil vertical y los cambios temporales a los que la laguna se ve sometida.

4. La fracción de las picocianobacterias (APC) domina en la laguna en momentos de baja disponibilidad lumínica. En particular, durante la estratificación térmica, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) determina la distribución de las dos fracciones del fitoplancton: por encima del 10% PAR el nanofitoplancton domina la comunidad fitoplanctónica mientras que por debajo del 10% dicha comunidad es sustentada por las APC.
5. A grandes rasgos la composición y ensamblado de especies de los PPP en la Laguna de El Tejo se puede resumir del siguiente modo: en las aguas superficiales se desarrollan cuantiosas poblaciones de pequeñas diatomeas céntricas a lo largo de todo el año (principalmente *C. delicatula*), grandes dinofíceas durante la estratificación térmica estival (*C. hirundinella* y *P. umbonatum*) y aumentaron las clorofíceas en momentos de mayor disponibilidad de nutrientes (inicio de estratificación y mezcla invernal). Las APC y criptofíceas (*Cryptomonas* spp. y *Plagioselmis* spp.) dominan en las aguas profundas, grupos que a su vez también aumentan en toda la columna de agua durante la mezcla invernal.
6. La presencia de abundantes poblaciones de zygnematofíceas (constituidas por varias especies pertenecientes al género *Cosmarium*) a finales del periodo de estratificación estival en esta laguna alcalina contribuye a redefinir el concepto establecido sobre la acidofilia de este grupo algal.
7. Durante la estratificación térmica estival, la heterogeneidad vertical favorece una mayor diversidad en la comunidad fitoplanctónica, coincidiendo con momentos de baja disponibilidad de nutrientes en la

columna de agua por agotamiento de los mismos y por un descenso de aportes profundos procedentes del acuífero. Por otra parte, también se mantienen altas diversidades durante la mezcla invernal aunque es la época con mayor descenso en abundancia y biovolumen del fitoplancton.

8. En la Laguna de El Tejo los PPP están limitados en su desarrollo y crecimiento por fósforo inorgánico (P) en primavera y al inicio de la estratificación, cambiando dicha limitación a nitrógeno inorgánico (N) durante la marcada estratificación estival, con situaciones de co-limitación NP en los momentos de transición entre ambas limitaciones y durante la mezcla invernal, tal y como se evidencia tras la realización *in situ* de experiencias de adición de nutrientes. En este sentido, es destacable la limitación por N durante el estío, puesto que en lagos de zonas templadas habitualmente se ha considerado que el P es el nutriente limitante para la producción primaria del sistema.
9. El silicato limita el crecimiento de *C. delicatula*, la diatomea dominante. En los tratamientos que incluían este elemento se incrementaba la abundancia relativa de esta especie, mientras que su ausencia favorecía a otras algas, cambiando así la composición de especies en la comunidad fitoplanctónica.
10. En las zonas de aguas profundas, dichos bioensayos revelan que la disponibilidad de radiación es el factor limitante clave para el desarrollo fitoplanctónico, estando éste limitado por la luz en las capas por debajo del 10% de la PAR, mientras que en condiciones de disponibilidad lumínica el fitoplancton está limitado por los nutrientes.
11. Estos cambios (y/o co-limitación) en el nutriente limitante para los PPP a escala vertical y temporal son fruto del balance entre la alternancia de

periodos de estratificación-mezcla en la masa de agua, el aumento de los aportes del acuífero en épocas de lluvia y las posibles deposiciones atmosféricas. Es por su origen y funcionamiento hidrogeológico, con incidencia de entradas y salidas al sistema limitadas y controladas, que esta laguna constituye un modelo perfecto para describir la dinámica fitoplanctónica.

12. Respecto al funcionamiento del fitoplancton, y en relación al establecimiento de grupos funcionales, estas experiencias de fertilización vienen a demostrar que hay más eficiencia en la explotación de los recursos del medio para el crecimiento y desarrollo de los PPP en las siguientes agrupaciones de organismos: a) unicelulares con mayor relación S:V y alta eficiencia en la captación de nutrientes; b) organismos eficaces en el aprovechamiento de recursos bajo condiciones de menor disponibilidad lumínica, presencia de nutrientes y estabilidad en el medio; c) individuos que se desarrollan mejor en entornos estables y con disponibilidad lumínicas, como en epi-metalimnion durante la estratificación estival y d) organismos capaces de explotar los recursos en entornos inestables, como sucede en toda la columna de agua durante la mezcla invernal.

13. La clasificación anterior sigue la línea de la categorización del fitoplancton en grupos funcionales, como son los FG, MFG y MB-FG y que también se han detallado en este trabajo. Todas estas clasificaciones no son excluyentes entre sí y suponen agrupaciones sencillas que pueden ayudar a entender y predecir la dinámica de estos organismos en el sistema, complementando así la clásica categorización taxonómica por grupos fitoplanctónicos.

14. En la época de mayor estabilidad de las aguas (durante la estratificación) podrían estar operando mecanismos que promueven una perturbación intermedia en intensidad, y que se traducen en las mayores diversidades y abundancias del nanofitoplancton para esa época, si bien serían necesarios más estudios para clarificar esta cuestión.

15. Aunque trabajar con un agua que contiene una mezcla natural de organismos incrementa la dificultad para el manejo de datos y obtención de conclusiones debido a las múltiples interacciones existentes, a la luz de los resultados obtenidos en diferentes estratos y épocas podemos afirmar que la realización de experiencias en mesocosmos *in situ* es de gran utilidad para esclarecer la complejidad que subyace en el sistema ecológico, además de aportar una visión más integrativa al tratar tanto escalas temporales como espaciales.

16. Con objeto de conocer todos los mecanismos implicados en el funcionamiento de la comunidad fitoplanctónica de la Laguna de El Tejo sería de interés continuar el estudio en este sistema acuático introduciendo otros niveles de análisis, como un seguimiento de las poblaciones a una menor escala temporal para definir en detalle los ensamblados y efectos de posibles perturbaciones, estudios de la autoecología de cada especie, evaluación de la presión de pastoreo por parte del zooplancton, estimación de la capacidad mixotrófica de algunas especies algales y/o determinación del posible impacto de deposiciones atmosféricas en la zona.

CONCLUSIONS

1. Lake El Tejo is an alkaline-carbonated, deep karstic lake, located in a lowly populated temperate region. Its main water supply comes from the aquifer and it shows a low surface-to-volume ratio. During the studied period the lake displayed an oligo-mesotrophic status.
2. Its particular morphology favors the setting of a summer thermal stratification from May to October approximately, followed by a unique mixing event of the whole water column during winter (monomictic lake). These strong seasonal changes in the water physical structure together with the hydrological regime condition the mechanisms that govern the pelagic communities of the system.
3. During the two studied periods, the composition and dynamic of the planktonic primary producers (PPP) community in this lake was subject to similar seasonal periodicity and, in consequence, these assemblages are highly predictable, as it occurs in other deep stratified alkaline lakes located at similar latitudes. These communities are conditioned by the water chemistry, as well as by the strong environmental gradients established within the vertical profile, as well as the seasonal changes occurring in the lake.
4. Picocyanobacteria (APC) dominates lake phytoplankton during low light. Particularly, during the thermal stratification period, the photosynthetically active radiation (PAR) determines the distribution of the two fractions of the phytoplankton: above 10 % of the PAR

nanophytoplankton dominates the phytoplankton community and below 10 % of the PAR this community is mainly accounted by APC.

5. Overall, the composition and assemblage of PPP species in Lake El Tejo can be summarized as follows: in the surface waters dense populations of small centric diatoms develop along the whole year (principally *C. delicatula*), whereas large Dinophyceae develop during the summer thermal stratification (*C. hirundinella* and *P. umbonatum*), and Chlorophyceae abundance increases in periods of higher nutrient availability (start of stratification and winter mixing). The APC and Cryptophyceae (*Cryptomonas* spp. and *Plagioselmis* spp.) dominate in deep waters, but also increase its abundance in the entire water column during the winter mixing period.
6. The occurrence of large populations of Zygnematophyceae (composed by several species of the genus *Cosmarium*) at the end the summer stratification period in this alkaline lake requires to redefine the established concept on the acidophily of this algal group, as a global feature of it.
7. During the summer thermal stratification, the vertical heterogeneity favours a higher diversity of the phytoplankton community, coinciding with low nutrient availability in the water column linked to its depletion and to the decrease of the sublacustrine supplies from the aquifer. On the other hand, high phytoplankton diversity is also maintained during the winter mixing, although this is the period with higher lower phytoplankton abundance and biovolume.
8. In Lake El Tejo, the development and growth of the PPP are limited by inorganic phosphorus (P) availability in spring and at the onset of

stratification. There is a shift in nutrient limitation to inorganic nitrogen (N) during summer stratification, with situations of co-limitation NP at the transition among both limitations and during the winter mixing period, as evidenced by the *in situ* experiments. In this context, the N-limitation in summer is remarkable, because in temperate lakes it is usually considered that P is the main limiting nutrient for the primary production of the system.

9. Silicate clearly limits the growth of *C. delicatula*, the dominant diatom. Treatments with this element result in increases in the relative abundance of this specie, while treatments without it favor other algae, changing the species composition of the phytoplankton community.
10. In deep water strata, bioassays showed that light availability is the key limiting factor for the phytoplankton development, being the strata below 10 % of the PAR limited by light, but when light is available they are limited by nutrients.
11. The changes (and/or co-limitation) of the limiting nutrient for the PPP on vertical and temporal scale are the consequence of the balance between the alternation of stratification/mixing periods in the waterbody, the increase of the supplies from the aquifer in rainy periods, and atmospheric deposition. Due to its hydrogeological functioning, with inputs and outputs limited and controlled, this lake is a perfect model to describe the phytoplankton dynamics.
12. Regarding the functioning of the phytoplankton community and related to the establishment of trophic groups, our fertilization experiments show that there is more efficiency in the exploitation of the resources of the environment for the growth and development of the PPP in the following associations: a) unicellular phytoplankton, with high S:V ratio and high

efficiency in nutrients harvesting; b) organisms efficient in the use of resources under conditions of low light and nutrient availability, low and stability in the water column; c) individuals that develop better in stable environments but with high light availability, as in epi-metalimnion during summer stratification and; d) organisms capable of exploiting the resources in unstable environments, such as the entire water column during the winter mixing.

13. The previous classification follows the line of the phytoplankton categorization in trophic groups, as the FG, MFG and MB-FG, which were also detailed in this work. All these classifications are not exclusive amongst them and suppose a simple grouping that may help to understand and predict the dynamics of these organisms in the system, completing in that way the classical taxonomic classification by phytoplankton groups.
14. In the period of higher water stability (during stratification), several mechanisms that promote perturbations (in terms of intensity) could be acting and finally result on higher phytoplankton diversities and abundances for this season, although further experiments are needed to clarify it.
15. Despite that working with water containing a natural mix of organisms increases the difficulty for the data management and for achieving conclusions due to the multiple interactions existing, the obtained results from different layers and seasons allow to state that *in situ* mesocosms experiments are very useful to clarify the complexity underlying the ecosystem functioning. They contribute to a more integrative vision by dealing with temporal and as spatial scales.

16. In order to understanding all the mechanisms implicated in the functioning of the phytoplankton community of Lake El Tejo, it would be interesting to continue the study in this aquatic system introducing other levels of analysis, like a monitoring of the populations at a lower temporal scale to define in detail the assemblages and effects of possible perturbations, studies on the autoecology of each species, assessment of the grazing pressure from the zooplankton, estimation of the mixotrophic capacity of some algal species, and/or determination of the possible impact of atmospheric nutrient deposition in the area.

Referencias bibliográficas / References

- AEMET. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España. <http://www.aemet.es>
- Allgeier, J.E., Rosemond, A.D. & Layman, C.A. (2011) The frequency and magnitude of non-additive responses to multiple nutrient enrichment. *J. Appl. Ecol.*, 48: 96-101.
- Alonso, F., González-Martín, J.A. & Ugarte, F. (1987) Sur l'évolution de trois grandes dépressions karstiques de la Serranía de Cuenca (Espagne). *Méditerranée*, 1: 21-32.
- Anagnostidis, K. & Komárek, J. (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3-Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 80: 327-472.
- Anton, A. & Duthie, H.C. (1981) Use of cluster analysis in the systematics of the algal genus *Cryptomonas*. *Can. J. Bot.*, 59: 992-1002.
- APHA-AWWA-WEF (1992) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18th edition. American Public Health Association. Washington D.C., USA.
- Armengol, J. (1997) Caracterización estructural del zooplancton de las lagunas cársticas de Cuenca, con especial atención a su distribución vertical. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Ávila, A., Burrel, J.L., Domingo, A., Fernández, E., Godall, J. & Llopart, J.M. (1984) Limnología del Lago Grande de Estanya (Huesca). *Oecologia aquatica*, 7: 3-24.
- Banse, K. (1976) Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as related to cell size - A Review. *J. Phycol.*, 12: 135-140.
- Bañeras, L. & García-Gil, L.J. (1996) Role of photosynthetic microbial populations in the phosphorus exchange through the oxic-anoxic boundary in a meromictic eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol. Belh.*, 48: 171-182.
- Barbosa, L.G., Barbosa, F.A., Araujo, G.J. & Bicudo, C.E.D.M. (2013) The dominance of desmids in tropical monomictic lakes (SE Brazil). *Limnetica*, 32: 71-86.
- Baron, J.S., Driscoll, C.T., Stoddard, J.L. & Richer, E.E. (2011) Empirical critical loads of atmospheric nitrogen deposition for nutrient enrichment and acidification of sensitive US lakes. *Bioscience*, 61: 602-613.
- Beardall, J., Berman, T., Heraud, P., Kadiri, M.O., Light, B.R., Patterson, G., Roberts, S., Sulzberger, B., Sahan, E., Uehlinger, U. & Wood, B. (2001) A comparison of methods for detection of phosphate limitation in microalgae. *Aquat. Sci.*, 63: 107-121.
- Benincà, E., Huisman, J., Heerkloss, R., Jöhnk, K.D., Branco, P., van Nes, E.H., Scheffer, M. & Ellner, S.P. (2008) Chaos in a long-term experiment with a plankton community. *Nature*, 451: 822-825.
- Bergström, A.K. & Jansson, M. (2006) Atmospheric nitrogen deposition has caused nitrogen enrichment and eutrophication of lakes in the northern hemisphere. *Global Change Biol.*, 12: 635-643.
- Blokker, P., Schouten, S., Van den Ende, H., de Leeuw, J.W., Hatcher, P.G. & Damste, J.S.S. (1998) Chemical structure of algaeans from the fresh water algae

- Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Org. Geochem.*, 29: 1453-1468.
- BOE** (2007) Ley 5/2007, de 8 de marzo, de Declaración del Parque Natural de la Serranía de Cuenca. Publicado en: BOE núm. 119, de 18 de mayo de 2007, pp. 21423-21431. Sección: I. Disposiciones generales. Departamento: Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha. Referencia: BOE-A-2007-10024
- Botella-Hornos, F.** (1875) La Ciudad Encantada. Las hoces, salegas y torcas de la provincia de Cuenca. Separata de: Anales de la Sociedad Española de Historia Natural, tomo IV, pp. 233-230, lám, IX-XIII. Reproducción facsímil de la ed. de Madrid: S. de Uhagon. Librerías París-Valencia (1995).
- Bourrelly, P.** (1968) *Les algues d'eau douce: initiation à la systématique. II. Les algues jaunes et brunes: Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées.* Société Nouvelle des Éditions Boubée. 438 pp.
- Bourrelly, P.** (1972) *Les algues d'eau douce. Initiation à la Systématique: Tome I. Les algues vertes.* Société Nouvelle des Éditions Boubée. 569 pp.
- Brook, A.J.** (1965) Planktonic algae as indicators of lake types, with special reference to the Desmidiaceae. *Limnol. Oceanogr.*, 10: 403-411.
- Büher, H. & Ambühl, H.** (1975) Die Einleitung von gereinigtem Abwasser in Seen. *Schweiz. Z. Hydrol.*, 37: 347-369.
- Callieri, C. & Stockner, J.G.** (2002) Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *J. Limnol.*, 61: 1-14.
- Camacho, A.** (1997) Ecología de los microorganismos fotosintéticos en las aguas microaerobias y anóxicas de la laguna de Arcas. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Camacho, A.** (2006) On the occurrence and ecological features of deep chlorophyll maxima (DCM) in Spanish stratified lakes. *Limnetica*, 25: 453-478.
- Camacho, A., Miracle, M.R. & Vicente, E.** (2003a) Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. *Arch. Hydrobiol.*, 157: 321-338.
- Camacho, A., Vicente, E. & Miracle, M.R.** (2000) Ecology of a deep-living *Oscillatoria* (= *Planktothrix*) population in the sulphide-rich waters of a Spanish karstic lake. *Arch. Hydrobiol.*, 148: 333-355.
- Camacho, A., Vicente, E. & Miracle, M.R.** (2001) Ecology of *Cryptomonas* at the chemocline of a karstic sulfate-rich lake. *Mar. Freshwater Res.*, 52: 805-815.
- Camacho, A., Picazo, A., Miracle, M.R. & Vicente, E.** (2003b) Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. *Algol. Stud.*, 109: 171-184.
- Camacho, A., Wurtsbaugh, W.A., Miracle, M.R., Armengol, X. & Vicente, E.** (2003c) Nitrogen limitation of phytoplankton in a Spanish karst lake with a deep chlorophyll maximum: a nutrient enrichment bioassay approach. *J. Plankton Res.*, 25: 397-404.
- Camps, J., Gonzalvo, I., Güell, J., López, P., Tejero, A., Toldrá, X., Vallespinós, F. & Vicens, M.** (1976) El lago de Montcortés: descripción de un ciclo anual. *Oecologia aquatica*, 2: 99-110.
- Canter, H.M. & Lund, J.W.G.** (1966) The periodicity of planktonic desmids in Windermere, England. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 16: 163-172.
- Capblanc, J.** (1990) Nutrient dynamics and pelagic food web interactions in oligotrophic and eutrophic environments: an overview. *Hydrobiologia*, 207: 1-14.

- Carmona, J. & Bitzer, K.** (2001) Los sistemas cársticos de Lagunas de Cañada del Hoyo y Torcas de los Palancares (Serranía de Cuenca, España). IGME, *Temas Aguas Subterráneas*, pp. 451-459.
- Carpenter, S.R.** (1996) Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. *Ecology*, 77: 677-680.
- Carrillo, P., Medina-Sánchez, J.M., Villar-Argaiz, M., Delgado-Molina, J.A. & Bullejos, F.J.** (2006) Complex interactions in microbial food webs: Stoichiometric and functional approaches. *Limnetica*, 25: 189-204.
- Casado, S. & Montes, C.** (1995) *Guía de lagos y humedales de España*. J.M. Reyero (ed.). 255 pp.
- CEN/TC230/WG2/TG3/N83** (2004) European Committee for Standardization, Biological and Ecological Assessment Methods. Water Quality. *Guidance standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy* (Utermöhl technique). pp. 1-38.
- Christensen, D.L., Carpenter, S.R. & Cottingham, K.L.** (1995) Predicting chlorophyll vertical distribution in response to epilimnetic nutrient enrichment in small stratified lakes. *J. Plankton Res.*, 17: 1461-1477.
- Cirujano, S.** (1995) *Flora y vegetación de las lagunas y humedales de la provincia de Cuenca*. CSIC. Madrid. 224 pp.
- Cirujano, S. & Medina, L.** (2002) *Plantas acuáticas de las lagunas y humedales de Castilla-La Mancha*. CSIC Castilla La-Mancha. Madrid. 340 pp.
- Clegg, M.R., Maberly, S.C. & Jones, R.I.** (2003) The effect of photon irradiance on behavioural ecology and potential niche separation of freshwater phytoplanktonic flagellates. *J. Phycol.*, 39: 650-662.
- Clerck, O., Guiry, M.D., Leliaert, F., Samyn, Y. & Verbruggen, H.** (2013) Algal taxonomy: a road to nowhere?. *J. Phycol.*, 49: 215-225.
- Coesel, P.F.** (1993) Poor physiological adaptation to alkaline culture conditions in *Closterium acutum* var. *variabile*, a planktonic desmid from eutrophic waters. *Eur. J. Phycol.*, 28: 53-57.
- Coesel, P.F.** (1994) On the ecological significance of a cellular mucilaginous envelope in planktic desmids. *Algol. Stud.*, 73: 65-74.
- Coesel, P.F. & Kooijman-Van Blokland, H.** (1994) Distribution and seasonality of desmids in the Maarsseveen lakes area. *Neth. J. Aquat. Ecol.*, 28: 19-24.
- Coesel, P.F. & Meesters, K.** (2007) *Desmids of the lowlands: Mesotaeniaceae and Desmidiaceae of the European lowlands*. Amsterdam (The Netherlands): KNNV Publishing. 352 pp.
- Coesel, P.F. & Wardenaar, K.** (1994) Light-limited growth and photosynthetic characteristics of two planktonic desmid species. *Fresh. Biol.*, 31: 221-226.
- Colomer, J., Serra, T., Piera, J., Roget, E. & Casamitjana, X.** (2001) Observations of a hydrothermal plume in a karstic lake. *Limnol. Oceanogr.*, 46: 197-203.
- Connell, J.H.** (1978) Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science*, 199: 1302-1310.
- Cortázar-Larrubia, D.** (1871) Itinerarios geológicos de la provincia de Cuenca. Comisión del mapa geológico de España. Madrid.
- Cotner, J.B. & Biddanda, B.A.** (2002) Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems*, 5: 105-121.

- Dasí, M.J. & Miracle, M.R.** (1991) Distribución vertical y variación estacional del fitoplancton de una laguna cárstica meromíctica, la Laguna de La Cruz (Cuenca, España). *Limnetica*, 7: 37-59.
- Davies, J.M., Nowlin, W.H. & Mazumder, A.** (2004) Temporal changes in nitrogen and phosphorus codeficiency of plankton in lakes of coastal and interior British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61: 1538-1551.
- Delgado-Molina, J.A., Carrillo, P., Medina-Sánchez, J.M., Villar-Argaiz, M. & Bullejos, F.J.** (2009) Interactive effects of phosphorus loads and ambient ultraviolet radiation on the algal community in a high-mountain lake. *J. Plankton Res.*, 31: 619-634.
- DeMelo, R., France, R., & McQueen, D.J.** (1992) Biomanipulation: hit or myth?. *Limnol. Oceanogr.*, 37: 192-207.
- Descy, J.P., Sarmento, H. & Higgins, H.W.** (2009) Variability of phytoplankton pigment ratios across aquatic environments. *Eur. J. Phycol.*, 44: 319-330.
- Diehl, S.** (2002) Phytoplankton, light, and nutrients in a gradient of mixing depths: theory. *Ecology*, 83: 386-398.
- Dittrich, M. & Koschel, R.** (2002) Interaction between calcite precipitation (natural and artificial) and phosphorus cycle in the hardwater lake. *Hydrobiologia*, 469: 49-57.
- Dittrich, M. & Obst, M.** (2004) Are picoplankton responsible for calcite precipitation in lakes?. *Ambio*, 33: 559-564.
- Dodds, W.K.** (2002) *Freshwater Ecology: Concepts and Environmental Application*. Academic Press. 569 pp.
- Dodds, W.K. & Priscu, J.C.** (1990) A comparison of methods for assessment of nutrient deficiency of phytoplankton in a large oligotrophic lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 2328-2338.
- Dodds, W.K., Strauss, E.A. & Lehmann, R.** (1993) Nutrient dilution and removal bioassays to estimate phytoplankton response to nutrient control. *Arch. Hydrobiol.*, 128: 467-481.
- Doval, M.D., Álvarez-Salgado, X.A. & Pérez, F.F.** (1997) Dissolved organic matter in a temperate embayment affected by coastal upwelling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 157: 21-37.
- Drenner, R.W. & Mazumder, A.** (1999) Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology: comment. *Ecology*, 80: 1081-1085.
- Duarte, C.M., Agustí, S. & Canfield, D.E.** (1990) Size plasticity of freshwater phytoplankton: Implications for community structure. *Limnol. Oceanogr.*, 35: 1846-1851.
- Durán, J.J.** (2004) Patrimonio geológico en España: unas reflexiones desde la experiencia de los últimos 25 años. *Enseñ. Cienc. Tierra* (12): 24-30.
- EC** (2000) Directive 2000/60/EC Water Framework. *European Communities Official Journal L.*, 327: 1-72.
- Eckartz-Nolden, G.** (1992) The phytoplankton of Lake Laacher See: Species composition and seasonal periodicity. *Arch. Hydrobiol. Belh.*, 38: 143-160.
- EEA** (2007) *Air pollution in Europe 1990-2004*. European Environmental Agency (EEA) Report No 2/2007. EEA, Copenhagen, 1-79 pp.
- EEA** (2011) *Air quality in Europe – 2011 report*. European Environmental Agency (EEA) Technical report No 12/2011. EEA, Copenhagen, 1-84 pp.

- Eilers, P.H.C. & Peeters, J.C.H.** (1988) A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol. Model.*, 42: 199-215.
- Elliott, J.A., Irish, A.E. & Reynolds, C.S.** (2001) The effects of vertical mixing on a phytoplankton community: a modelling approach to the intermediate disturbance hypothesis. *Fresh. Biol.*, 46: 1291-1297.
- Elser, J.J. & Kimmel, B.L.** (1986) Alteration of phytoplankton phosphorus status during enrichment experiments: implications for interpreting nutrient enrichment bioassay results. *Hydrobiologia*, 133: 217-222.
- Elser, J.J., Marzolf, E.R. & Goldman, C.R.** (1990) Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 1468-1477.
- Elser, J.J., Kyle, M., Steger, L., Nydick, K.R. & Baron, J.S.** (2009) Nutrient availability and phytoplankton nutrient limitation across a gradient of atmospheric nitrogen deposition. *Ecology*, 90: 3062-3073.
- Elser, J.J., Bracken, M.E.S., Cleland, E.E., Gruner, D.S., Harpole, W.S., Hillebrand, H., Ngai, J.T., Seabloom, E.W., Shurin, J.B. & Smith, J.E.** (2007) Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.*, 10: 1135-1142.
- Eraso, A., López-Acevedo, V., López, M., Navarro, J.V., Suso, J. & Santos, V.** (1979) Estudio de las torcas de Palancares y Cañada del Hoyo en el karst de la Serranía de Cuenca. *Kobie*, 9: 7-69.
- Ernst, A., Deicher, M., Herman, P.M. & Wollenzien, U.I.** (2005) Nitrate and phosphate affect cultivability of cyanobacteria from environments with low nutrient levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 3379-3383.
- Escudero, A. & Regato, P.** (1992) Ordenación de la vegetación de las torcas de la Serranía de Cuenca y sus relaciones con algunos factores del medio. *Orsis*, 7: 41-55.
- Escudero, M., Castillo, S., Querol, X., Ávila, A., Alarcón, M., Viana, M.M., Alastuey, A., Cuevas, E. & Rodríguez, S.** (2005) Wet and dry African dust episodes over Eastern Spain. *J. Geophys. Res.*, 110: doi: 10.1029/2004JD004731
- Fehér, G.** (2003) The desmid flora of some alkaline lakes and wetlands in Southern Hungary. *Biologia*, 58: 671-683.
- Fernández-Calvo, C.** (1982a) Diagénesis del Cretácico Superior manchego. *Cuadernos Geología Ibérica*, 8: 351-367.
- Fernández-Calvo, C.** (1982b) Sedimentología y diagénesis del Cretácico Superior de la Mancha (Provincia de Cuenca). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Ferrario, M.E., Oliveira, E.C., & Sar, E.** (1995) *Manual de métodos ficológicos*. Chile: Universidad de Concepción.
- Fitzgerald, G P.** (1969) Field and laboratory evaluations of bioassays for nitrogen and phosphorus with algae and aquatic weeds. *Limnol. Oceanogr.*, 14: 206-212.
- Folt, C.L., Chen, C.Y., Moore, M.V. & Burnaford, J.** (1999) Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 864-877.
- Förster, K.** (1982) *Conjugatophyceae: Zygnematales und Desmidiaceae (excl. Zygnemataceae)*. In: Elster, H.J. & W. Ohle (eds.). *Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. Teil 8.* E. Schweizerbart'sche Verlag. Stuttgart. 543 pp.

- Frochoso, M. & Sierra, J.** (2004) La construcción de los mapas geológicos españoles del siglo XIX: Observación, conceptualización y representación. *Eria*, 64-65: 221-259.
- Gaedke, U., Seifried, A. & Adrian, R.** (2004) Biomass size spectra and plankton diversity in a shallow eutrophic lake. *Int. Rev. Hydrobiol.*, 89: 1-20.
- García de Emiliani, M.O.** (1973) Fitoplancton de la Laguna del Vilà (Gerona, España). *Oecologia aquatica*, 1: 107-155.
- García-Gil, L.J. & Camacho, A.** (2001) Anaerolimnología: pequeña guía para el muestreo en aguas microaeróbicas y anóxicas en lagos y embalses estratificados. *Limnetica* 20: 179-186.
- Gasol, J.M., Mas, J., Pedrós-Alió, C. & Guerrero, R.** (1990) Ecología microbiana y limnología en la Laguna Císó: 1976-1989. *Scientia gerundensis*, 16: 155-178.
- Geider, R.J., MacIntyre, H.L. & Kana, T.M.** (1998) A dynamic regulatory model of phytoplankton acclimation to light, nutrients and temperature. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 679-694.
- Germain, H.** (1981) *Flore Des Diatomées (eaux douces et saumâtres)*. E. Boubée (Société Nouvelle des Éditions Boubée). Paris. 444 pp.
- Ghosal, S., Rogers, M. & Wray, A.** (2000) The turbulent life of phytoplankton. In: *Center for Turbulence Research Proceeding of the Summer Program*. pp. 31-45.
- Gil, J., Carenas, B., Segura, M., García-Hidalgo, J.F. & García, A.** (2004) Revisión y correlación de las unidades litoestratigráficas del Cretácico Superior en la región central y oriental de España. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 17: 249-266.
- Glicora, M., Kralj, K., Žutinić, P., Šipos, L. & Plenković-Moraj, A.** (2011) Net-phytoplankton species dominance in a travertine riverine Lake Visovac, NP Krka. *Nat. Croat.*, 20: 411-424.
- Glicora, M., Plenković-Moraj, A., Kralj, K., Grigorszky, L. & Peroš-Pucar, D.** (2007) The relationship between phytoplankton species dominance and environmental variables in a shallow lake (Lake Vrana, Croatia). *Hydrobiologia*, 584: 337-346.
- Golterman, H.L., Clymo, R.S. & Ohnstad, M.A.M.** (eds.) (1978) *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. IBP Handbook no. 8, Blackwell Sci. Pub., Oxford, UK. 213 pp.
- Grover, J.P.** (1991) Resource competition in a variable environment: phytoplankton growing according to the variable-internal-stores model. *Am. Nat.*, 138: 811-835.
- Gruber, N. & Galloway, J.N.** (2008) An Earth-system perspective of global nitrogen cycle. *Nature*, 451: 293-296.
- Guildford, S.J. & Hecky, R.E.** (2000) Total nitrogen, total phosphorus, and nutrient limitation in lakes and oceans: is there a common relationship?. *Limnol. Oceanogr.*, 45: 1212-1223.
- Guiry, M.D.** (2013) Taxonomy and nomenclature of the Conjugatophyceae (= Zygnematophyceae). *Algae*, 28: 1-29.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M.** (2015) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland. <http://www.algaebase.org>
- Gusev, E.S.** (2008) Phytoplankton primary production in several karst lakes in central Russia. *Inland Water Biol.*, 1: 356-361.
- Gutiérrez-Elorza, M. & Valverde, M.** (1994) El sistema de poljes del río Guadazaón (Cordillera Ibérica, Prov. de Cuenca). *Cuaternario y Geomorfología*, 8: 87-95.

- Guy, M., Taylor, W.D. & Carter, J.C.** (1994) Decline in total phosphorus in the surface waters of lakes during summer stratification, and its relationship to size distribution of particles and sedimentation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 1330-1337.
- Harpole, W.S., Ngai, J.T., Cleland, E.E., Seabloom, E.W., Borer, E.T., Bracken, M.E.S., Elser, J.J., Gruner, D.S., Hillebrand, H., Shurin, J.B. & Smith, J.E.** (2011) Nutrient co-limitation of primary producers communities. *Ecol. Lett.*, 14: 852-862.
- Hasle, G.R.** (1978) The inverted-microscope method. In: *Phytoplankton manual*. Monographs on oceanographic methodology, 6. A. Sournia (ed.) pp. 88-96; pp. 191-196. Unesco, Paris.
- 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. *Limnol. Oceanogr.*, 33: 796-822.
- Helbling, E.W., Carrillo, P., Medina-Sánchez, J.M., Durán, C., Herrera, G., Villar-Argaiz, M. & Villafañe, V.E.** (2013) Interactive effects of vertical mixing, nutrients and ultraviolet radiation: in situ photosynthetic responses of phytoplankton from high mountain lakes in Southern Europe. *Biogeosciences*, 10: 1037-1050.
- Heyman, V. & Lungren, A.** (1988) Phytoplankton biomass and production in relation to phosphorus: some conclusions from field studies. *Hydrobiologia*, 170: 211-225.
- Hillebrand, H., Watermann, F., Karez, R. & Berninger, U.G.** (2001) Differences in species richness patterns between unicellular and multicellular organisms. *Oecologia*, 126: 114-124.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollingher, U. & Zohary, T.** (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.*, 35: 403-424.
- Huber-Pestalozzi, G.** (1955) Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. *Euglenophyceen*. Teil 4. In: Thienemann, A. (ed.) Die Binnengewässer. Einzeldarstellungen aus der Limnologie und ihren Nachbargebieten. E. Schweizerbart'sche Verlag. Stuttgart. 606 pp.
- Huber-Pestalozzi, G.** (1968) *Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae*. In: Thienemann, A. (ed.) Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. Teil 3. E. Schweizerbart'sche Verlag. Stuttgart. 322 pp.
- Huisman, J., Sharples, J., Stroom, J.M., Visser, P.M., Kardinaal, W.E.A., Verspagen, J.M. & Sommeijer, B.** (2004) Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology*, 85: 2960-2970.
- Hutchinson, G.E.** (1961) The paradox of the plankton. *Am. Nat.*, 95: 137-145.
- Hutchinson, G.E.** (1967) *A Treatise on Limnology*. Vol. 2: Introduction to Lake Biology and Limnoplankton. New York: Wiley. 1115 pp.
- IGME** (1979) Mapa geológico de España. Hoja 635. Instituto Geológico y Minero de España. Madrid.
- Jansson, M.** (1988) Phosphatase uptake and utilization by bacteria and algae. *Hydrobiologia*, 170: 177-189.
- Jansson, M., Olsson, H. & Pettersson, R.** (1988) Phosphatases: origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia*, 170: 157-175.
- Jansson, M., Blomqvist, P., Jonsson, A. & Bergstöm, A.K.** (1996) Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Öträsket. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 1552-1559.
- Järnefelt, H.** (1956) Zur limnologie einigen Geuvässer Finnlands XVI. Mit besonderer Berücksichtigung des Planktons. *Amls Zool. Soc. Vanamo*, 17: 201 pp.

- 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.*, 167: 191-194.
- Jenson, D.H., Talling, J.F., Dring, M.J., Tilzer, M.M., Heaney, S.I. & Cunningham, C.** (1984) Measurement of photosynthetically available radiation in fresh-water: comparative test of some current instruments used in studies of primary production. *J. Plankton Res.*, 6: 259-274.
- Jones, R.I.** (1992) The influence of humic substances on lacustrine planktonic food chains. *Hydrobiologia*, 229: 73-91.
- Jones, R.I.** (2000) Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshw. Biol.*, 45: 219-226.
- Julià, R., Burjachs, F., Dasí, M.J., Mezquita, F., Miracle, M.R., Roca, J.R., Seret, G. & Vicente, E.** (1998) Meromixis origin and recent trophic evolution in the Spanish mountain lake La Cruz. *Aquat. Sci.*, 60: 279-299.
- Kalff, J.** (2002) *Limnology: inland water ecosystems*. Prentice Hall. New Jersey. 592 pp.
- Kirk, J.T.** (1985) Effects of suspensoids (turbidity) on penetration of solar radiation in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia*, 125: 195-208.
- Kirk, J.T.** (1994) *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press. 401 pp.
- Kiss, K.T., Ács, E., 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 Res.*, 22: 287-308.
- Kolkwitz, R.** (1907) Entnahme- und Beobachtungsinstrumente für biologische Wasseruntersuchungen. Mitt. PrüfAnst. WassVersorg. Abwässerbeseit. Berlin, 9: 111-144.
- Komárek, J.** (2010) Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia*, 639: 245-259.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K.** (1998) Band 19/1: *Cyanoprokaryota* (Teil 1): *Chroococcales*. In: Ettl, H., G. Gärtner, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer. Jena- Stuttgart-Lübeck-Ulm. 548 pp.
- Komárek, J. & Fott, B.** (1983) *Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Chlorococcales*. In: Elster, H.J. & W. Ohle (eds.). Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. Teil 7. E. Schweizerbart'sche Verlag. Stuttgart. 1044 pp.
- Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J., & Johansen, J.R.** (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86: 295-335.
- Konopka, A.** (1989) Metalimnetic cyanobacteria in hard-water lakes: Buoyancy regulation and physiological state. *Limnol. Oceanogr.*, 34: 1174-1184.
- Koroleff, F.** (1983) Total and organic nitrogen. In *Methods of Seawater Analysis*. K. Grasshoff, Ehrhardt, M. & Kremling, K. (eds.) pp. 162-173. Verlag Chemie, Weinheim.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H.** (1986) Band 2: *Bacillariophyceae*. (Teil 2/1): *Naviculaceae*. In: Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-Jena. 876 pp.

- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H.** (1988) Band 2: *Bacillariophyceae*. (Teil 2/2): *Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*. In: Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-Jena. 596 pp.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H.** (1991a) Band 2: *Bacillariophyceae*. (Teil 2/3): *Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*. In: Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-Jena. 576 pp.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H.** (1991b) Band 2: *Bacillariophyceae*. (Teil 2/4): *Achnantheaceae*. Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-Jena. 437 pp.
- Krienitz, L. & Bock, C.** (2012) Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia*, 698: 295-326.
- Kruk, C. & Segura, A.M.** (2012) The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia*, 698: 191-202.
- Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G. & Reynolds, C.S.** (2002) Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *J. Plankton Res.*, 24: 901-912.
- Kruk, C., Huszar, V.L., Peeters, E.T., Bonilla, S., Costa, L., Lürling, M., Reynolds, C.S. & Scheffer, M.** (2010) A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshw. Biol.*, 55: 614-627.
- Kunz, T.J. & Diehl, S.** (2003) Phytoplankton, light and nutrients along a gradient of mixing depth: a field test of producer-resource theory. *Freshw. Biol.*, 48: 1050-1063.
- Laybourn-Parry, J., Marshall, W.A. & Marchant, H.J.** (2005) Flagellate nutritional versatility as a key to survival in two contrasting Antarctic saline lakes. *Freshw. Biol.*, 50: 830-838.
- Lean, D.R.S., Murphy, T.P. & Pick, F.R.** (1982) Photosynthetic response of lake plankton to combined nitrogen enrichment. *J. Phycol.*, 18: 509-521.
- Lehman, J.T. & Sandgen, C.D.** (1978) Documenting a seasonal change from phosphorus to nitrogen limitation in a small temperate lake, and its impact on the population dynamics of *Asterionella*. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 20: 375-380.
- Lewis, W.M. & Wurtsbaugh, W.A.** (2008) Control of lacustrine phytoplankton by nutrients: Erosion of the phosphorus paradigm. *Int. Rev. Hydrobiol.*, 93: 446-465.
- Lindenschmidt, K.E. & Chorus, I.** (1998) The effect of water column mixing on phytoplankton succession, diversity and similarity. *J. Plankton Res.*, 20: 1927-1951.
- Litchman, E. & Klausmeier, C.A.** (2008) Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 39: 615-639.
- Litchman, E. & Nguyen, B.L.** (2008). Alkaline phosphatase activity as a function of internal phosphorus concentration in freshwater phytoplankton. *J. Phycol.*, 44: 1379-1383.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A. & Bossard, P.** (2004) Phytoplankton nutrient competition under dynamic light regimes. *Limnol. Oceanogr.*, 49: 1457-1462.
- Litchman, E., Steiner, D. & Bossard, P.** (2003) Photosynthetic and growth responses of three freshwater algae to phosphorus limitation and daylength. *Freshw. Biol.*, 48: 2141-2148.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, O.M. & Falkowski, P.G.** (2007) The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecol. Lett.*, 10: 1170-1181.

- Litchman, E., de Tezanos-Pinto, P., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K. & Yoshiyama, K.** (2010) Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia*, 653: 15-28.
- Llopis, N.** (1970) *Fundamentos de hidrogeología kárstica*. Ed. Blume, Madrid-Barcelona. 269 pp.
- Lund, J.W.G. & Talling, J.F.** (1957) Botanical limnological methods with special reference to the algae. *Bot. Rev.*, 23: 489-583.
- Lund, J.W.G., Kipling, C. & Le Cren, E.D.** (1958) The inverted microscope method for estimating algal numbers, and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*, 11: 143-170.
- Margalef, R.** (1969) Counting. In: Vollenweider, R.A., Talling, J.F. & Westlake, D.F. (eds.) *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*, p. 7-14. International Biological Programme. Oxford and Edinburgh, Blackwell Scient. Publ. (IBP Handbk 12). London.
- Margalef, R.** (1997) *Our Biosphere*. In: Excellence in Ecology series. O. Kinne (ed.) Ecology Institute, Oldendorf/Luhe. Germany. 194 pp.
- Mazumder, A. & Taylor, W.D.** (1994) Thermal structure of lakes varying in size and water clarity. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 968-976.
- Meléndez-Hevia, F.** (1971) Estudio geológico de la Serranía de Cuenca en relación a sus posibilidades petrolíferas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Millard, R.C., Owens, W.B. & Fofonoff, N.P.** (1990) On the calculations of the Brunt-Väisälä frequency. *Deep Sea Res*, 37: 167-181.
- Miracle, M.R., Dasí, M.J. & Vicente, E.** (1998) Forced phytoplankton vertical migrations due to lake water 'whiting'. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 26: 1749-1754.
- Miracle, M.R., Vicente, E. & Pedrós-Alió, C.** (1992) Biological studies of Spanish meromictic and stratified lakes. *Limnetica*, 8: 59-77.
- Miracle, M.R., Camacho, A., Julià, R. & Vicente, E.** (2000) Sinking processes and their effect on the sedimentary record in the meromictic Lake La Cruz (Spain). *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 27: 1209-1213.
- Mladenov, N., Sommaruga, R., Morales-Baquero, R., Laurion, I., Camarero, L., Diéguez, M.C., Camacho, A., Delgado, A., Torres, O., Chen, Z., Felip, M. & Reche, I.** (2011) Dust inputs and bacterial influence dissolved organic matter in clear alpine lakes. *Nat. Commun.*, 2: 405, doi: 10.1038/ncomms1411
- Morabito, G., Oggioni, A. & Panzani, P.** (2003) Phytoplankton assemblage at equilibrium in large and deep subalpine lakes: a case study from Lago Maggiore (N. Italy). *Hydrobiologia*, 502: 37-48.
- Morales-Baquero, R., Barea-Arco, J., Pérez-Martínez, C. & Villar-Argaiz, M.** (2006) Climate-driven changes on phytoplankton-zooplankton coupling and nutrient availability in high mountain lakes of Southern Europe. *Freshw. Biol.*, 51: 989-998.
- Morata, S.M., Camacho, A., Miracle, M.R. & Vicente, E.** (2003) Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado. *Limnetica*, 22: 35-52.
- Morata, S.M., Picazo, A., Vicente, E., Miracle, M.R. & Camacho, A.** (submitted) Empirical evidence of vertical and seasonal shifts in nutrient limitation of planktonic primary producers in a deep karst lake.
- Morel, F.M.** (1987) Kinetics of nutrient uptake and growth in phytoplankton. *J. Phycol.*, 23: 137-150.

- Moreno-Ostos, E., Cruz-Pizarro, L., Basanta-Alvés, A., Escot, C. & George, D.G.** (2006) Algae in the motion: Spatial distribution of phytoplankton in thermally stratified reservoirs. *Limnetica*, 25: 205-216.
- Naselli-Flores, L.** (2000) Phytoplankton assemblages in twenty-one Sicilian reservoirs: relationships between species composition and environmental factors. *Hydrobiologia*, 424: 1-11.
- Naselli-Flores, L.** (2013) Morphological analysis of phytoplankton as a tool to assess ecological state of aquatic ecosystems: the case of Lake Arancio, Sicily, Italy. *Inland Waters*, 4: 15-26.
- Naselli-Flores, L., Padisák, J. & Albay, M.** (2007) Shape and size in phytoplankton ecology: do they matter?. *Hydrobiologia*, 578: 157-161.
- Naselli-Flores, L., Padisák, J., Dokulil, M.T. & Chorus, I.** (2003) Equilibrium/steady-state concept in phytoplankton ecology. *Hydrobiologia*, 502: 395-403.
- Nauwerck, A.** (1963) Die Beziehungen zwischen Zooplankton und Phytoplankton im See Erken. *Symb. bot. Ups.*, 17: 1-163.
- Neill, W.E.** (1988) Complex interactions in oligotrophic lake food webs: responses to nutrient enrichment. In: Carpenter, S.R. (ed.) *Complex interactions in lake communities*. pp. 31-44. Springer-Verlag, New York.
- North, R.L., Guildford, S.J., Smith, R.E.H., Havens, S.M. & Twiss, M.R.** (2007) Evidence for phosphorus, nitrogen, and iron colimitation of phytoplankton communities in Lake Erie. *Limnol. Oceanogr.*, 52: 315-328.
- Novarino, G.** (2003) A companion to the identification of cryptomonad flagellates (*Cryptophyceae*=*Cryptomonadea*). *Hydrobiologia*, 502: 225-270.
- Nürnberg, G.K.** (1987) A comparison of internal phosphorus loads in lakes with anoxic hypolimnia: laboratory incubation versus *in situ* hypolimnetic phosphorus accumulation. *Limnol. Oceanogr.*, 32: 1160-1164.
- Nygaard, G.** (1991) Seasonal periodicity of planktonic desmids in oligotrophic lake Grane Langsø, Denmark. *Hydrobiologia*, 211: 195-226.
- Nygaard, K. & Tobiesen, A.** (1993) Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 38: 273-279.
- Padisák, J.** (2004) Phytoplankton. In: O'Sullivan, P.E. & Reynolds, C.S. (eds.) *The lakes handbook: limnology and limnetic ecology* (Vol. 1). pp. 251-308. Blackwell Science, Oxford.
- Padisák, J., Crossetti, L.O. & Naselli-Flores, L.** (2009) Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. *Hydrobiologia*, 621: 1-19.
- Padisák, J., Reynolds, C.S. & Sommer, U.** (1993) *Intermediate disturbance hypothesis in phytoplankton ecology*. Vol. 81. Springer Science & Business Media. 199 pp.
- Padisák, J., Scheffler, W., Kasprzak, P., Koschel, R. & Krienitz, L.** (2003) Interannual variability in the phytoplankton composition of Lake Stechlin (1994-2000). *Arch. Hydrobiol.*, 58: 101-133.
- Pahl-Wostl, C.** (2007) The implications of complexity for integrated resources management. *Environ. Modell. Softw.*, 22: 561-569.
- Pålsson C. & Granéli, W.** (2004) Nutrient limitation of autotrophic and mixotrophic phytoplankton in a temperate and tropical humic lake gradient. *J. Plankton Res.*, 26: 1005-1014.
- Peinado, M. & Martínez-Parras, J.M.** (1985) *El paisaje vegetal de Castilla-La Mancha*. Serv. Publ. Junta Com. Castilla La-Mancha. Toledo. 230 pp.

- Pérez-Martínez, C. & Sánchez-Castillo, P.** (2001) Temporal occurrence of *Ceratium hirundinella* in Spanish reservoirs. *Hydrobiologia*, 452: 101-107.
- Petersen, J.E., Chen, C.C. & Kemp, W.M.** (1997) Scaling aquatic primary productivity: experiments under nutrient- and light-limited conditions. *Ecology*, 78: 2326-2338.
- Picazo, A.** (2002) Dinámica y distribución espacial de los procariotas fotosintéticos en la laguna meromítica de La Cruz. Trabajo de investigación. Universidad de Valencia.
- Picazo, A., Rochera, C., Vicente, E., Miracle, M.R. & Camacho, A.** (2013) Spectrophotometric methods for the determination of photosynthetic pigments in stratified lakes: a critical analysis based on comparisons with HPLC determinations in a model lake. *Limnetica*, 32: 139-158.
- Planas, D.** (1973) Composición, ciclo y productividad del fitoplancton del lago de Banyoles. *Oecologia aquatica*, 1: 3-106.
- Planas, D.** (1990) Factores de control de la distribución espacial y temporal de la producción primaria del fitoplancton del Lago de Banyoles. *Scientia Gerundensis*, 16: 193-204.
- Popovský, J. & Pfister, L.A.** (1990) Band 6: *Dinophyceae* (Dinoflagellida). In: Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena. 272 pp.
- Pulido-Villena, E., Reche, I. & Morales-Baquero, R.** (2008) Evidence of an atmospheric forcing on bacterioplankton and phytoplankton dynamics in a high mountain lake. *Aquat. Sci.*, 70: 1-9.
- Quinones, R.A., Platt, T. & Rodríguez, J.** (2003) Patterns of biomass-size spectra from oligotrophic waters of the Northwest Atlantic. *Prog. Oceanogr.*, 57: 405-427.
- Raven, J.A.** (1997) Phagotrophy in phototrophs. *Limnol. Oceanogr.*, 42: 198-205.
- Rengefors, K., Ruttenberg, K.C., Hauptert, C.L., Taylor, C., Howes, B.L. & Anderson, D.M.** (2003) Experimental investigation of taxon-specific response of alkaline phosphatase activity in natural freshwater phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 48: 1167-1175.
- Reynolds, C.S.** (1980) Phytoplankton assemblages and their periodicity in stratifying lake systems. *Holarctic Ecol.*, 3: 141-159.
- Reynolds, C.S.** (1984) *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge. 384 pp.
- Reynolds, C.S.** (1988) Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. In: *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. pp. 388-433. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reynolds, C.S.** (1992) Dynamics, selection and composition of phytoplankton in relation to vertical structure in lakes. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 35: 12-31.
- Reynolds, C.S.** (1994) The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia*, 289: 9-21.
- Reynolds, C.S.** (1997) *Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory*. In: Excellence in Ecology series. O. Kinne (ed.) Ecology Institute, Oldendorf/Luhe. Germany. 370 pp.
- Reynolds, C.S.** (1999) Modelling phytoplankton dynamics and its application to lake management. *Hydrobiologia*, 395: 123-131.
- Reynolds, C.S.** (2001) Emergence in pelagic communities. *Sci. Mar.*, 65: 5-30.
- Reynolds, C.S.** (2006) *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press. 535 pp.

- Reynolds, C.S., & Irish, A.E.** (1997) Modelling phytoplankton dynamics in lakes and reservoirs: the problem of *in-situ* growth rates. *Hydrobiologia*, 349: 5-17.
- Reynolds, C.S. & Reynolds, J.B.** (1985) The atypical seasonality of phytoplankton in Crose Mere, 1972: An independent test of the hypothesis that variability in the physical environment regulates community dynamics and structure. *Br. Phycol. J.*, 20: 227-242.
- Reynolds, C.S. & Walsby, A.E.** (1975) Water-blooms. *Biol. Rev.*, 50: 437-481.
- Reynolds, C.S., Padisák, J. & Sommer, U.** (1993) Intermediate disturbance in the ecology of phytoplankton and the maintenance of species diversity: a synthesis. *Hydrobiologia*, 249: 183-188.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L. & Melo, S.** (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.*, 24: 417-428.
- Richardson, K., Beardall, J. & Raven, J. A.** (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.*, 93: 157-191.
- Riemann, B., Havskum, H., Thingstad, F. & Bernard, C.** (1995) The role of mixotrophy in pelagic environments. In: *Molecular ecology of aquatic microbes*. pp. 87-114. Springer. Berlin, Heidelberg.
- Rodier, J.** (1984) Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales, agua de mar. Omega, Barcelona. 1059 pp.
- 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. Universidad de Valencia.
- Rodrigo, M.A., Vicente, E. & Miracle, M.R.** (1993) Short-term calcite precipitation in the karstic meromictic Lake La Cruz (Cuenca, Spain). *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 25: 711-719.
- Rojo, C. & Miracle, M.R.** (1987) Poblaciones fitoplanctónicas de la Laguna de La Cruz, una laguna cárstica meromíctica. *Act. VI Simp. Nac. Bot. Cript.* Granada (Spain): 119-135.
- Rojo, C., Barón-Rodríguez, M.M., Álvarez-Cobelas, M. & Rodrigo, M.A.** (2010) Sustained primary production with changing phytoplankton assemblages in a semiarid wetland. *Hydrobiologia*, 639: 55-62.
- Romero-Viana, L., Julià, R., Camacho, A., Vicente, E. & Miracle, M.R.** (2008) Climate signal in varve thickness: Lake La Cruz (Spain), a case study. *J. Paleolimnol.*, 40: 703-714.
- Rott, E.** (1981) Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz Z. Hydrol.*, 43: 32-62.
- Rott, E., Salmaso, N. & Hoehn, E.** (2007) Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates - an easy task or a Gorgian knot?. *Hydrobiologia*, 578: 141-146.
- Rull, V., Vegas, T. & Navarro, J.** (1984) Extinción de la luz en los embalses españoles. Relación con la concentración de clorofila y las partículas en suspensión. *Oecologia aquatica*, 7: 25-36.
- Ruttner, F.** (1952) Planktonstudien der Deutschen Limnologischen Sundan Expedition. *Arch. Hydrobiol.*, Suppl. 21: 1-274.
- Salmaso, N.** (2000) Factors affecting the seasonality and distribution of cyanobacteria and chlorophytes: a case study from the large lakes south of the Alps, with special reference to Lake Garda. *Hydrobiologia*, 438: 43-63.

- Salmaso, N.** (2003) Life strategies, dominance patterns and mechanisms promoting species coexistence in phytoplankton communities along complex environmental gradients. *Hydrobiologia*, 502: 13-36.
- Salmaso, N. & Padisák, J.** (2007) Morpho-functional groups and phytoplankton development in two deep lakes (Lake Garda, Italy and Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia*, 578: 97-112.
- Salmaso, N., Naselli-Flores, L. & Padisák, J.** (2015) Functional classifications and their application in phytoplankton ecology. *Freshw. Biol.*, 60: 603-619.
- Santisteban, C.** (1994) Control estructural del sistema cársico de la zona de los lagos de Cañada del Hoyo (Cuenca). Simposium sobre los ecosistemas acuáticos de Castilla-La Mancha. Libro de resúmenes, p. 45.
- Sawatzky, C.L., Wurtsbaugh, W.A. & Luecke, C.** (2006) The spatial and temporal dynamics of deep chlorophyll layers in high-mountain lakes: effects of nutrients, grazing and herbivore nutrient recycling as growth determinants. *J. Plankton Res.*, 28: 65-86.
- Schallenberg, M. & Burns, C.W.** (2001) Test of autotrophic picoplankton as early indicators of nutrient enrichment in an ultra-oligotrophic lake. *Freshw. Biol.*, 46: 27-37.
- Schindler, D.W.** (1977) Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, 195: 260-262.
- Schindler, D.W.** (1978) Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters. *Limnol. Oceanogr.*, 23: 478-486.
- Schindler, D.W.** (1998) Whole-ecosystem experiments: replication versus realism: the need for ecosystem-scale experiments. *Ecosystems*, 1: 323-334.
- Sendra, M.D.** (2009) Distribución del fitoplancton en la Laguna de La Cruz y su relación con los nutrientes. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
- Serra, T., Vidal, J., Casamitjana, X., Soler, M. & Colomer, J.** (2007) The role of surface vertical mixing in phytoplankton distribution in a stratified reservoir. *Limnol. Oceanogr.*, 52: 620-634.
- Shannon, C.E. & Weaver, W.** (1963) *The mathematical theory of communication*. Univ. Illinois Press, Urbana. University of Illinois Press. Urbana, Illinois. 117 pp.
- Shoaf, W.T. & Liem, B.W.** (1976) Improved extraction of chlorophyll *a* and *b* from algae using dimethyl sulphoxide. *Limnol. Oceanogr.*, 21: 926-928.
- SIGPAC.** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España. <http://sigpac.jccm.es/visorsigpac/>
- Smayda, T.J.** (1978) From phytoplankters to biomass. In: *Phytoplankton manual*. Monographs on oceanographic methodology, 6. A. Sournia (ed.) pp. 273-279. Unesco, París.
- Smayda, T.J. & Venrick, E.L.** (1978) Estimating cell numbers: General principles. In: *Phytoplankton manual*. Monographs on oceanographic methodology, 6. A. Sournia (ed.) pp. 165-180. Unesco, París.
- Smith, V.H.** (1979) Nutrient dependence of primary productivity in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 24: 1051-1064.
- Sommer, U.** (1986) The periodicity of phytoplankton in Lake Constance (Bodensee) in comparison to other deep lakes of central Europe. *Hydrobiologia*, 138: 1-7.
- Sommer, U.** (1988) Phytoplankton succession in microcosm experiments under simultaneous grazing pressure and resource limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 33: 1037-1054.

- Spijkerman, E. & Coesel, P.F.** (1997) Growth kinetic parameters of two planktonic desmid species under fluctuating phosphorus conditions in continuous-flow culture. *J. Plankton Res.*, 19: 1899-1912.
- Spijkerman, E. & Coesel, P.F.** (1998) Alkaline phosphatase activity in two planktonic desmid species and the possible role of an extracellular envelope. *Freshw. Biol.*, 39: 503-513.
- Spivak, A.C., Vanni, M.J. & Mette, E.M.** (2011) Moving on up: can results from simple aquatic mesocosm experiments be applied across broad spatial scales?. *Freshw. Biol.*, 56: 279-291.
- Stamenković, M. & Cvijan, M.** (2008) Some new and interesting ecological observations on desmids from the Province of Vojvodina (Northern Serbia). *Biologia*, 63: 921-927.
- Starmach, K.** (1985) Band 1: *Chrysophyceae und Haptophyceae*. In: Ettl, H., J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena. 515 pp.
- Sternner, R.W.** (2008) On the phosphorus limitation paradigm for lakes. *Int. Rev. Hydrobiol.*, 93: 433-445.
- Sternner, R.W., Elser, J.J., Fee, E.J., Guildford, S.J. & Chrzanowski, T.H.** (1997) The light: nutrient ratio in lakes: the balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *Am. Nat.*, 150: 663-684.
- Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R.** (1972) *A practical handbook of seawater analysis*. Bull. Fish. Res. Board Canada-167. 311 pp.
- Sun, J. & Liu, D.** (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.*, 25: 1331-1346.
- Tang, E.P.** (1996) Why do dinoflagellates have lower growth rates?. *J. Phycol.*, 32: 80-84.
- Tell, G. & Conforti, V.** (1986) *Euglenophytas pigmentadas de la Argentina*. Bibliotheca Phycologica, Band 75. Cramer, J. in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung. Berlin, Stuttgart. 301 pp.
- Thackeray, S.J., Nôges, P., Dunbar, M.J., Dudley, B.J., Skjelbred, B., Morabito, G., Carvalho, L., Phillips, G., Mischke, U., Catalán, J., de Hoyos, C., Laplace, C., Austoni, M., Padedda, B., Maileht, K., Pasztalenic, A., Järvinen, M., Solheim, A.L. & Clarke, R.T.** (2013) Quantifying uncertainties in biologically-based water quality assessment: a pan-European analysis of lake phytoplankton community metrics. *Ecol. Indic.*, 29: 34-47.
- Thingstad, T.F., Øvreås, L., Egge, J.K., Løvdal, T. & Heldal, M.** (2005) Use of non-limiting substrates to increase size; a generic strategy to simultaneously optimize uptake and minimize predation in pelagic osmotrophs?. *Ecol. Lett.*, 8: 675-682.
- Thronsdon, J.** (1978) Preservation and storage. In: *Phytoplankton manual*. Monographs on oceanographic methodology, 6. A. Sournia (ed.) pp. 69-74. Unesco, Paris.
- Tilman, D.** (1976) Ecological competition between algae: Experimental confirmation of Resource-Based Competition Theory. *Science*, 192: 463-465.
- Tilman, D.** (1977) Resource competition between plankton algae: an experimental and theoretical approach. *Ecology*, 58: 338-348.
- Tolotti, M., Corradini, F., Boscaini, A. & Calliari, D.** (2007) Weather-driven ecology of planktonic diatoms in Lake Tovel (Trentino, Italy). *Hydrobiologia*, 578: 147-156.

- Utermöhl, H.** (1931) Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 5: 567-596.
- Utermöhl, H.** (1958) Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, 9: 1-38.
- Vadrucci, M.R., Cabrini, M. & Basset, A.** (2007) Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Trans. Waters Bull.*, 1: 83-102.
- Venrick, E.L.** (1978) How many cells to count?. In: *Phytoplankton manual*. Monographs on oceanographic methodology, 6. A. Sournia (ed.) pp. 167-180. Unesco, Paris.
- Verdouw, H., van Echteld, C.J.A. & Dekkers, E.M.** (1978) Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.*, 12: 399-402.
- Vernet, J.** (1975) *Historia de la ciencia española*. Instituto de España, Madrid. 312 pp.
- Vicente, E. & Miracle, M.R.** (1984) Distribution of photosynthetic organisms in a temporal stratified karstic pond near Cuenca, Spain. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 22: 1704-1710.
- Vicente, E. & Miracle, M.R.** (1988) Physicochemical and microbial stratification in a meromictic karstic lake of Spain. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 23: 522-559.
- Vicente, E., Miracle, M.R., Armengol, J., Camacho, A., Roca, J.R., Santisteban, C., Soria, J.M., Sendra, M.D., Sanchis, D., Rojo, C., Boronat, M.D., Ortega, E., Rico, E., García-Avilés, J. & Rueda, J.** (1998) Estudio limnológico de 28 humedales de Castilla-La Mancha como base para la elaboración del plan de ordenación de recursos naturales (PORN). Informe inédito. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente-Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y Universidad de Valencia.
- Viner, A.B.** (1985) Thermal stability and phytoplankton distribution. *Hydrobiologia*, 125: 47-69.
- Volk, R.** (1906) Hamburgische Elbe-Untersuchung, VIII. Studien über die Einwirkung der Trocken-periode im Sommer 1904 auf die biologischen Verhältnisse der Elbe bei Hamburg. Mit einem Nachtrag über chemische und planktologische Methoden. *Mitt. Naturhist. Mus. Hamb.*, 23: 1-101.
- Vollenweider, R.A., Talling, J.F., & Westlake, D.F.** (eds.) (1974) *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*. Blackwell Scientific Pub. Oxford. 225 pp.
- Vörös, L., Callieri, C., Katalin, V. & Bertoni, R.** (1998) Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia* 369/370: 117-125.
- Vuorio, K., Lepistö, L. & Holopainen, A.L.** (2007) Intercalibrations of freshwater phytoplankton analyses. *Boreal Environ. Res.*, 12: 561-569.
- Ward, P.R.B., Hall, K.J., Northcote, T.G., Cheung, W. & Murphy, T.** (1990) Autumnal mixing in Mahoney Lake, British Columbia. *Hydrobiologia*, 197: 129-138.
- Wetzel, R.G. & Likens, G.E.** (1979) *Limnological analysis*. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 357 pp.
- White, E., Law, K., Payne, G. & Pickmere, S.** (1985) Nutrient demand and availability among planktonic communities-an attempt to assess nutrient limitation to plant growth in 12 central volcanic plateau lakes. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.*, 19: 49-62.
- Whitton, B.A., Al-Shehri, A.M., Ellwood, N.T. & Turner, B.L.** (2005) Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes.

- In: *Organic Phosphorus in the Environment*. pp. 205-241. CAB International, Wallingford, UK.
- Willén, E.** (1976) A simplified method of phytoplankton counting. *Br. J. Phycol.*, 11: 265-278.
- Winder, M.** (2009) Photosynthetic picoplankton dynamics in Lake Tahoe: temporal and spatial niche partitioning among prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Plankton Res.*, 31: 1307-1320.
- Wurtsbaugh, W.A., Gross, H.P., Budy, P. & Luecke, C.** (2001) Effects of epilimnetic versus metalimnetic fertilization on the phytoplankton and periphyton of a mountain lake with a deep chlorophyll maxima. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 58: 2156-2166.
- Wyman, M., Gregory, R.P.F., & Carr, N.G.** (1985) Novel role for phycoerythrin in a marine cyanobacterium, *Synechococcus* strain DC2. *Science*, 230: 818-820.
- Zohary, T., Padisák, J. & Naselli-Flores, L.** (2010) Phytoplankton in the physical environment: beyond nutrients, at the end, there is some light. *Hydrobiologia*, 639: 261-269.
- Žutinić, P., Udovič, M.G., Borojević, K.K., Plenković-Moraj, A. & Padisák, J.** (2014) Morpho-functional classifications of phytoplankton assemblages of two deep karstic lakes. *Hydrobiologia*, 740: 147-166.

ANEXOS / ANNEXES

Anexo I. Listado completo de las especies de nanofitoplancton identificadas en la Laguna de El Tejo (1997-98 y 2003-04). Taxonomía revisada y actualizada según *AlgaeBase* (Guiry & Guiry, 2015; <http://www.algaebase.org>).

Annex I. Full list of nanophytoplankton species identified in Lake El Tejo (1997-98 and 2003-04). Taxonomy revised and updated according *AlgaeBase* (Guiry & Guiry, 2015; <http://www.algaebase.org>).

(*) presencia ocasional / occasional presence

NANOPHYTOPLANKTON SPECIES LIST – LAKE EL TEJO	
CURRENT ACCEPTED NAME	TAXONOMIC SYNONYM / BASIONYM
BACILLARIOPHYCEAE GROUP	
Centrales (current Class Mediophyceae)	
<i>Cyclotella delicatula</i> Hustedt (<i>Cyclotella delicatula</i> group)	
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing (*)	
<i>Cyclotella radiosa</i> (Grunow) Lemmermann	
Pennales (current Class Bacillariophyceae)	
<i>Achnanthydium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki (*)	<i>Achnanthes minutissima</i> Kützing
<i>Amphora ovalis</i> (Kützing) Kützing (*)	
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg (*)	
<i>Encyonema minutum</i> (Hilse) D.G. Mann (*)	<i>Cymbella minuta</i> Hilse
<i>Epithemia</i> sp. (*)	
<i>Fragilaria acus</i> (Kützing) Lange-Bertalot	<i>Synedra acus</i> Kützing
<i>Gyrosigma acuminatum</i> (Kützing) Rabenhorst (*)	
<i>Halamphora coffeiformis</i> (C. Agardh) Levkov (*)	
<i>Navicula radiosa</i> Kützing (*)	
<i>Navicula tenelloides</i> Hustedt (*)	
<i>Nitzschia vermicularis</i> (Kützing) Hantzsch (*)	
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C. Agardh) Lange-Bertalot (*)	
CLASS CHRYSOPHYCEAE	
<i>Bitrichia phaseolus</i> (B. Fott) B. Fott	
<i>Chrysolynos planctonicus</i> B. Mack	
<i>Dinobryon divergens</i> O.E. Imhof (*)	
<i>Epipyxis gracilis</i> D.K. Hilliard & Asmund (*)	
<i>Kephyrion ovale</i> (Lackey) Huber-Pestalozzi (*)	
<i>Pseudokephyrion</i> sp. (*)	
CHLOROPHYCEAE GROUP	
current Class Chlorophyceae	
<i>Acutodesmus acuminatus</i> (Lagerheim) P.M. Tsarenko	<i>Scenedesmus ac.</i> (Lager.) Chodat

<i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald & Hanagata	<i>Scenedesm. obliq.</i> (Turpin) Kützing
<i>Ankyra judayi</i> (G.M. Smith) Fott (*)	
<i>Chlamydomonas</i> sp. (*)	
<i>Desmatractum indutum</i> (Geitler) Pascher (*)	
<i>Desmodesmus hystrix</i> (Lagerheim) E. Hegewald (*)	<i>Scenedesmus hystrix</i> Lagerheim
<i>Monactinus simplex</i> (Meyen) Corda	<i>Pediastrum simplex</i> Meyen
<i>Monoraphidium arcuatum</i> (Korshikov) Hindák	
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová	
<i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Komárková-Legnerová	
<i>Monoraphidium minutum</i> (Nägeli) Komárková-Legnerová	
<i>Monoraphidium pusillum</i> (Printz) Komárková-Legnerová (*)	
<i>Monoraphidium subclavatum</i> Nygaard (*)	
<i>Pediastrum boryanum</i> var. <i>brevicorne</i> A. Braun (*)	
<i>Pediastrum duplex</i> Meyen (*)	
<i>Pseudopediastrum boryanum</i> (Turpin) E. Hegewald	<i>Pediastrum bor.</i> (Turpin) Meneghini
<i>Quadrigula lacustris</i> (Chodat) G.M. Smith	
<i>Scenedesmus ecornis</i> (Ehrenberg) Chodat (*)	
<i>Scenedesmus ellipticus</i> Corda (*)	<i>Scenedesmus linearis</i> Komárek
<i>Scenedesmus obtusus</i> Meyen (*)	
<i>Scenedesmus quadricauda</i> var. <i>quadrispina</i> (Chodat)	
G.M. Smith	
<i>Tetraëdron minimum</i> (A. Braun) Hansgirg	
<i>Tetrastrum staurogeniiforme</i> (Schröder) Lemmermann (*)	
<i>Treubaria planctonica</i> (G.M. Smith) Korshikov (*)	

current Class Trebouxiophyceae

<i>Chlorella</i> cf. <i>minutissima</i> Fott & Nováková (*)	
<i>Chlorella</i> cf. <i>vulgaris</i> Beyerinck (Beijerinck)	
<i>Kirchneriella</i> sp. (*)	
<i>Lagerheimia balatonica</i> (Scherffel) Hindák	
<i>Lagerheimia ciliata</i> (Lagerheim) Chodat (*)	
<i>Lagerheimia quadriseta</i> (Lemmermann) G.M. Smith	
<i>Mucidosphaerium pulchellum</i> (H.C. Wood) C. Bock, Proschold & Krienitz (*)	<i>Dictyosphaerium pulch.</i> H.C. Wood
<i>Oocystis lacustris</i> Chodat	
<i>Oocystis marssonii</i> Lemmermann (*)	
<i>Oocystis rhomboidea</i> Fott (*)	

CLASS ZYGNEMATOPHYCEAE

Desmidiiales

<i>Closterium aciculare</i> T. West (*)
<i>Closterium diana</i> Ehrenberg ex Ralfs (*)
<i>Cosmarium abbreviatum</i> Raciborski
<i>Cosmarium bioculatum</i> Brébisson ex Ralfs

Cosmarium cf. *bioculatum*
Cosmarium laeve Rabenhorst
Cosmarium meneghinii Brébisson ex Ralfs
Cosmarium ochthodes Nordstedt (*)
Euastrum subtrilobulatum K. Förster & F. Eckert (*)
Gonatozygon brebissonii De Bary (*)
Heimansia pusilla (L. Hilse) Coesel (*) *Cosmocladium pusillum* L. Hilse
Staurastrum sp. (*)

Zygnematales

Mougeotia sp. (*)
Spirogyra sp. (*)

CYANOBACTERIA

Oscillatoria sp. (*)
Pseudanabaena sp. (*)

CLASS DINOPHYCEAE

Ceratium hirundinella (O.F. Müller) Dujardin
Gymnodinium wawriake Schiller (*)
Katodinium fungiforme (Anissimova) Fott (*)
Parvodinium umbonatum (Stein) S. Carty *Peridinium umbonatum* Stein
Peridinium cinctum (O.F. Müller) Ehrenberg
Peridinium sp. (*)

CLASS CRYPTOPHYCEAE

Cryptomonas erosa Ehrenberg
Cryptomonas marssonii Skuja
Cryptomonas ovata Ehrenberg (*)
Cryptomonas phaseolus Skuja
Cryptomonas pyrenoidifera Geitler (*)
Plagioselmis lacustris (Pascher & Ruttner) P. Javornicky *Rhodomonas lac.* Pascher & Ruttner
Plagioselmis nannoplantctica (H. Skuja) G. Novarino, *Rhodomonas min.* var. *nann.* Skuja
 I.A.N. Lucas & S. Morrall
Rhodomonas pusilla (H. Bachmann) Javornicky (*) *Cryptomonas pusilla* H. Bachmann

CLASS EUGLENOPHYCEAE

Euglena pisciformis Klebs (*) *Euglena agilis* H.J. Carter
Lepocinclis acus (O.F. Müller) Marin & Melkonian (*) *Euglena acus* (O.F. Müller)
 Ehrenberg
Lepocinclis sp. (*)
Trachelomonas volvocina (Ehrenberg) Ehrenberg (*)

Anexo II. Medias de la abundancia algal (datos de desviaciones no mostrados) para las especies de presencia relevante en las experiencias de enriquecimiento de nutrientes llevadas a cabo en la Laguna de El Tejo en mayo, julio y septiembre de 2003 y enero de 2004. Se muestran el tiempo inicial (t=0), control y los diferentes tratamientos de adición de nutrientes para cada profundidad de ensayo.

Annex II. Mean values of algal density (standard deviation not shown) for relevant species in the nutrient enrichment experiences performed in Lake El Tejo in May-July-September 2003 and January 2004. Initial time (t=0), control and the nutrient amendment treatments for each assayed depths are shown.

MAY - EPILIMNION									
mean (cell mL ⁻¹)	natural water (<i>in situ</i>)		t=3 days (treatment <i>in situ</i> + incubation)						
	t=0	C	N	P	Si	NP	NSi	PSi	NPSi
<i>Cyclotella delicatula</i>	416,6	333,6	414,7	485,0	375,1	362,2	336,9	501,6	369,7
<i>Cyclotella radiosa</i>	53,0	36,4	46,6	72,9	138,1	44,8	24,5	116,6	83,8
<i>Fragilaria acus</i>	12,1	9,9	4,6	5,6	14,5	6,0	8,3	4,2	10,8
<i>Monoraphidium griffithii</i>	7,9	7,4	6,5	12,2	7,0	10,9	6,7	17,1	5,9
<i>Oocystis lacustris</i>	19,6	17,2	47,1	57,1	31,2	52,6	19,9	27,0	41,4
<i>Tetraëdron minimum</i>	31,6	35,3	40,1	48,2	32,2	35,4	23,5	33,3	29,3
<i>Peridinium cinctum</i>	0,9	0,7	0,5	1,0	1,5	1,0	1,4	0,9	1,4
<i>Parvodinium umbonatum</i>	216,6	226,3	159,8	236,5	183,0	250,6	171,1	285,9	152,6
MAY – METALIMNION (incubated at its depth)									
<i>Cyclotella delicatula</i>	925,0	514,2	378,0	783,7	690,2	208,0	440,5	823,6	325,5
<i>Cyclotella radiosa</i>	63,2	61,4	27,2	79,7	72,2	13,2	29,2	66,1	42,8
<i>Fragilaria acus</i>	3,6	3,6	3,4	5,1	2,4	1,5	2,2	2,4	1,4
<i>Monoraphidium griffithii</i>	24,7	13,7	11,7	20,2	20,6	21,1	18,6	20,6	17,6
<i>Oocystis lacustris</i>	23,7	22,6	12,1	16,9	23,2	12,1	10,4	14,0	23,1
<i>Tetraëdron minimum</i>	71,1	58,5	57,1	80,6	69,5	80,7	72,9	53,2	82,2
<i>Cryptomonas erosa</i>	8,0	10,7	16,4	25,0	12,3	28,0	18,4	17,3	27,5
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	12,5	12,6	33,9	23,0	12,3	22,1	14,6	12,4	23,9
<i>Parvodinium umbonatum</i>	6,8	2,1	2,1	2,9	1,5	1,7	1,4	2,1	0,8

JULY - EPILIMNION

mean (cell mL ⁻¹)	natural water (<i>in situ</i>)		t=3 days (treatment <i>in situ</i> + incubation)						
	t=0	C	N	P	Si	NP	NSi	PSi	NPSi
<i>Cyclotella delicatula</i>	887,5	914,5	967,8	711,1	1086,3	578,1	936,2	1057,4	654,4
<i>Fragilaria acus</i>	5,0	6,0	4,2	6,1	13,2	4,8	4,7	3,9	5,3
<i>Oocystis lacustris</i>	23,7	21,1	27,7	25,0	15,8	136,9	22,4	14,5	89,5
<i>Tetraëdron minimum</i>	106,7	102,7	104,0	104,0	106,7	214,6	110,6	79,0	188,3
<i>Cosmarium abbreviatum</i>	135,6	126,4	159,3	208,1	184,3	196,2	184,3	164,6	169,9
<i>Cosmarium laeve</i>	377,9	339,7	375,3	364,7	260,7	399,0	337,1	299,4	375,3
<i>Cosmarium meneghinii</i>	164,6	164,6	147,5	196,2	96,1	202,8	183,0	126,5	171,2
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	5,3	1,3	2,6	0,0	0,0	4,0	1,3	1,3	6,6
<i>Peridinium cinctum</i>	0,4	0,2	0,0	0,9	0,1	0,5	0,9	0,1	1,8
<i>Parvodinium umbonatum</i>	7,7	6,0	2,6	5,4	2,6	4,4	7,9	3,8	8,2

JULY – METALIMNION (incubated at its depth)

<i>Cyclotella delicatula</i>	979,7	622,2	916,5	535,3	-	730,8	-	-	-
<i>Fragilaria acus</i>	9,9	5,9	3,2	7,9	-	5,9	-	-	-
<i>Oocystis lacustris</i>	25,7	17,8	15,8	15,8	-	19,8	-	-	-
<i>Tetraëdron minimum</i>	27,8	27,8	23,7	25,7	-	39,5	-	-	-
<i>Cryptomonas erosa</i>	7,9	8,6	4,0	5,9	-	4,0	-	-	-
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	8,6	15,8	13,8	4,0	-	19,8	-	-	-
<i>Parvodinium umbonatum</i>	8,8	7,8	5,0	7,8	-	6,3	-	-	-

JULY – METALIMNION (incubated at increased light availability)

<i>Cyclotella delicatula</i>	903,3	730,8	840,1	733,4	774,3	708,4	733,4	730,8	638,6
<i>Fragilaria acus</i>	9,9	7,9	6,6	7,9	10,5	5,3	4,6	4,0	4,8
<i>Oocystis lacustris</i>	23,7	20,6	22,4	31,6	15,8	26,3	46,1	15,8	52,7
<i>Tetraëdron minimum</i>	29,6	24,1	23,7	39,5	30,3	34,2	27,7	18,4	43,5
<i>Cryptomonas erosa</i>	8,6	6,1	11,9	4,0	4,0	2,6	1,3	1,3	6,6
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	9,9	9,7	14,5	13,2	4,0	11,9	9,2	10,5	23,7

Parvodinium umbonatum 7,8 6,9 4,8 8,8 7,8 8,5 3,8 9,7 14,9

SEPTEMBER - EPILIMNION									
mean (cell mL ⁻¹)	natural water (<i>in situ</i>)		t=3 days (treatment <i>in situ</i> + incubation)						
	t=0	C	N	P	Si	NP	NSi	PSi	NPSi
<i>Cyclotella delicatula</i>	564,1	617,6	454,3	521,4	611,0	543,8	574,1	740,0	534,6
<i>Fragilaria acus</i>	35,8	41,7	34,6	24,6	58,8	51,7	35,0	30,8	31,2
<i>Oocystis lacustris</i>	160,6	142,2	104,0	142,2	83,0	209,4	158,0	147,5	522,8
<i>Tetraëdron minimum</i>	144,6	150,1	130,4	133,0	97,4	159,3	168,5	150,1	185,7
<i>Cosmarium abbreviatum</i>	326,3	297,6	317,3	285,7	292,3	697,9	346,3	381,9	630,7
<i>Cosmarium laeve</i>	173,8	158,0	193,6	135,6	158,0	237,0	165,9	196,2	217,3
<i>Cosmarium meneghinii</i>	142,2	134,3	146,2	143,5	122,5	187,0	139,6	138,3	179,1
<i>Parvodinium umbonatum</i>	8,6	8,3	4,2	12,9	7,5	8,3	3,8	5,0	7,1
SEPTEMBER – METALIMNION (incubated at its depth)									
<i>Cyclotella delicatula</i>	908,6	896,7	796,0	936,2	-	985,6	-	-	-
<i>Fragilaria acus</i>	8,8	8,1	8,8	8,4	-	8,1	-	-	-
<i>Oocystis lacustris</i>	29,6	15,8	21,7	23,7	-	21,7	-	-	-
<i>Tetraëdron minimum</i>	39,5	33,6	25,7	35,6	-	27,7	-	-	-
<i>Cosmarium abbreviatum</i>	79,0	75,1	67,2	55,3	-	83,0	-	-	-
<i>Cosmarium laeve</i>	51,4	53,3	47,4	45,4	-	39,5	-	-	-
<i>Cosmarium meneghinii</i>	83,0	90,9	114,6	94,8	-	118,5	-	-	-
<i>Cryptomonas erosa</i>	1,3	2,0	0,0	4,0	-	4,0	-	-	-
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	21,7	27,7	5,9	13,8	-	43,5	-	-	-
<i>Parvodinium umbonatum</i>	6,3	3,8	3,1	5,0	-	5,0	-	-	-

SEPTEMBER – METALIMNION (incubated at increased light availability)

<i>Cyclotella delicatula</i>	935,6	963,9	1206,2	974,4	1162,7	1169,3	1128,5	1211,4	758,5
<i>Fragilaria acus</i>	8,0	9,7	6,3	7,1	11,3	15,8	9,2	7,9	6,5
<i>Oocystis lacustris</i>	27,0	21,1	23,7	23,7	27,7	31,6	17,1	26,3	54,0
<i>Tetraëdron minimum</i>	38,2	31,6	32,9	44,8	32,9	41,5	34,2	42,1	69,8
<i>Cosmarium abbreviatum</i>	77,7	80,3	97,4	81,6	80,3	123,8	83,0	96,1	147,5
<i>Cosmarium laeve</i>	46,7	47,4	57,9	60,6	52,7	56,6	39,5	59,3	90,9
<i>Cosmarium meneghinii</i>	86,2	88,2	77,2	135,6	90,9	94,8	90,9	106,7	147,5
<i>Cryptomonas erosa</i>	2,0	2,6	6,6	1,3	2,6	7,9	4,0	1,3	7,9
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	25,7	11,9	17,1	13,2	7,9	36,9	18,4	21,1	48,7
<i>Parvodinium umbonatum</i>	7,1	6,5	2,1	6,7	5,0	7,5	4,2	5,6	8,8

JANUARY – SHALLOW DEPTH									
mean (cell mL ⁻¹)	natural water (<i>in situ</i>)		t=4 days (treatment <i>in situ</i> + incubation)						
	t=0	C	N	P	Si	NP	NSi	PSi	NPSi
<i>Cyclotella delicatula</i>	312,1	329,2	356,8	317,3	338,4	400,3	341,0	376,6	355,5
<i>Fragilaria acus</i>	22,3	15,8	12,9	13,8	16,3	12,1	24,6	12,5	21,8
<i>Tetraëdron minimum</i>	79,0	83,0	93,5	108,0	85,6	104,0	98,8	90,9	97,4
<i>Cosmarium abbreviatum</i>	97,4	85,6	84,3	100,1	77,7	109,3	96,1	101,4	117,2
<i>Cosmarium laeve</i>	13,2	11,9	10,5	10,5	11,9	15,8	19,8	15,8	11,9
<i>Cosmarium meneghinii</i>	9,2	7,9	11,9	13,2	7,9	9,2	6,6	7,9	11,9
<i>Cryptomonas erosa</i>	16,8	11,9	13,2	9,2	6,6	7,9	10,5	11,9	19,8
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	28,3	15,8	26,3	38,2	11,9	31,6	35,6	19,8	44,8
JANUARY – DEEP DEPTH									
<i>Cyclotella delicatula</i>	333,1	320,0	381,9	316,0	392,4	476,7	323,9	343,7	354,2
<i>Fragilaria acus</i>	23,6	20,6	15,0	11,7	22,1	13,3	18,8	12,1	17,0
<i>Tetraëdron minimum</i>	94,0	88,9	90,9	92,2	85,6	97,4	71,1	96,8	106,7
<i>Cosmarium abbreviatum</i>	94,8	94,8	101,4	72,4	83,0	106,7	76,4	108,0	93,5
<i>Cosmarium laeve</i>	12,5	14,5	15,8	13,2	11,9	15,8	10,5	15,8	14,5
<i>Cosmarium meneghinii</i>	9,9	7,9	10,5	13,2	7,9	12,5	4,0	7,9	10,5
<i>Cryptomonas erosa</i>	17,8	15,8	4,0	1,3	7,9	5,3	4,0	7,9	22,4
<i>Cryptomonas phaseolus</i>	27,0	21,1	15,8	22,4	13,2	21,1	13,2	15,8	31,6

Anexo III. Fotografías de algunas especies de algas habituales en la Laguna de El Tejo. A,B: imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) tomadas en la Hungarian Danube Research Station (HAS), con la supervisión del Dr. K.T. Kiss. C,D: imágenes tomadas en microscopio óptico invertido a 100X.

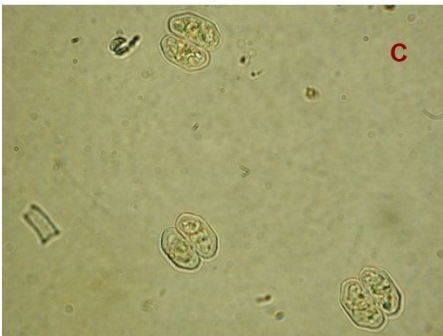
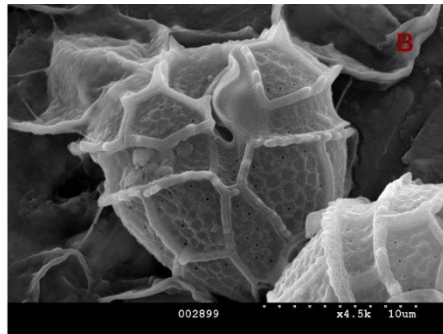
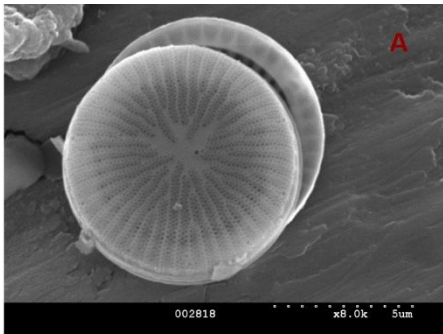
Annex III. Pictures of several common algal species in Lake El Tejo. A,B: Scanning electronic microscope (SEM) pictures taken at Hungarian Danube Research Station (HAS), supervised by Professor Dr. K.T. Kiss. C,D: Inverted light microscope pictures-100X.

A = *Cyclotella delicatula*

B = *Parvodinium umbonatum*

C = *Cosmarium abbreviatum*

D = *Cosmarium* cf. *bioculatum*, *C. delicatula* y *P. umbonatum* (empty)



Anexo IV. Algunas imágenes del montaje e incubación de los microcosmos en las experiencias de enriquecimiento de nutrientes en la Laguna de El Tejo (2003-04).

Annex IV. Several pictures of experimental enclosures setting and incubation in the nutrient enrichment experiences performed in Lake El Tejo (2003-04).



