

## ESPECIES CLAVES EN EL FUNCIONAMIENTO DE LAS REDES TRÓFICAS PELÁGICAS DE ECOSISTEMAS DE ALTA MONTAÑA: ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS

PRESENTACIÓN CARRILLO<sup>1</sup>, MANUEL VILLAR-ARGAIZ<sup>2</sup>, JUAN MANUEL MEDINA-SÁNCHEZ<sup>2</sup>, JOSÉ ANTONIO DELGADO-MOLINA<sup>2</sup>, FRANCISCO JOSÉ BULLEJOS<sup>2</sup>, SILVIA ROSILLO<sup>1</sup>, CRISTINA DURÁN<sup>1</sup>, FELIX. L. FIGUEROA<sup>3</sup> Y NATHALIE KORBEE<sup>3</sup>

### RESUMEN

La literatura sobre redes tróficas de lagos de alta montaña enfatiza el papel de ciertas especies en la transferencia de energía y minerales en estos ecosistemas. Por esta razón, estas especies constituyen los nodos de interacción dentro de las redes tróficas y son consideradas especies clave. Distintas estrategias ecológicas y evolutivas han permitido a estas especies clave dominar en ambientes extremos como los lagos de alta montaña. Nuestros resultados han mostrado (i) que la mixotrofia es una estrategia metabólica de las especies algales flageladas en estos ecosistemas. La escasez de nutrientes y los altos flujos de radiación ultravioleta B (UVB) han sido identificados como los principales factores no bióticos en la selección de esta estrategia, estableciéndose una relación directa entre la mixotrofia y la composición elemental de los organismos; (ii) la existencia de importantes estrategias fisiológicas como (a) la síntesis y acumulación de compuestos fotoprotectores que actúan como filtros (aminoácidos tipo micosporinas: MAAs) y como antioxidantes (fenoles) frente a la radiación UV en comunidades epilíticas y litorales pero no en comunidades planctónicas; (b) la disminución en la razón ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (HUFAs): ácidos grasos insaturados de cadena más corta (PUFAs) bajo UVR, modificación de composición de lípidos que es considerada como una respuesta de algas aclimatadas a ambientes estresantes. Dos nuevas estrategias han sido propuestas como mecanismo de aclimatación a UVR de algas en este estudio: (a) un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina extracelular (APA) bajo UVR que aumenta el contenido P de las algas y permite la reparación del ADN; (b) la excreción de carbono fotosintético que da lugar a un descenso en la razón C:P y es el resultado de una ruta catabólica alternativa para reciclar P intracelular de productores primarios fuertemente limitados por P.

El efecto interactivo de UVR y el enriquecimiento con fósforo (P) fue diferente dependiendo de los componentes de la red trófica que son afectados. Así, el efecto UVR x P fue sinérgico positivo sobre el bucle microbiano, es decir, ambos factores favorecieron conjuntamente el desarrollo de virus, bacterias y ciliados sobre una escala temporal media. Este efecto desapareció cuando el P inorgánico fue agotado. Sin embargo, el efecto interactivo UVR x P sobre la comunidad algal fue sinérgico negativo, es decir un incremento en P acentuó los efectos dañinos de UVR sobre una escala temporal larga y ocasionó la pérdida de algas mixotróficas y la subsiguiente disminución de la diversidad algal. Por lo tanto, hay una correlación negativa entre la tolerancia de las especies a UVR y su tolerancia a la entrada de P. Consecuentemente, un incremento en la intensidad de las entradas atmosféricas de P conduce a la pérdida de algas flageladas con metabolismo mixotrófico, un grupo funcional clave que constituye un corto-

<sup>1</sup>Instituto del Agua, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain. pcl@ugr.es

<sup>1,2</sup>Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.

<sup>3</sup>Departamento de Ecología y Geología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Universitario de Teatinos, s/n 2901 Málaga. Spain.

circuito en el flujo del carbono entre el bucle microbiano y los consumidores primarios, por lo que su pérdida afecta al funcionamiento de los ecosistemas. Finalmente, la pérdida de algas mixótrofas y el desarrollo masivo de clorofíceas desconecta la interacción productor primario-zooplankton herbívoro (*Mixodiatomus laciniatus*), lo que genera fenómenos de eutrofización en estos lagos de alta montaña.

**Palabras claves:** Especies clave, Red trófica, Radiación Ultravioleta (UVR), Enriquecimiento en P, Efectos interactivos UVR x P.

## SUMMARY

The rapidly growing literature on trophic webs in high mountain lakes is highlighting the key role of certain species in the transfer of carbon and nutrients in these ecosystems. For this reason, these species are the main nodes in these biological networks. A myriad of ecological and evolutionary strategies have enabled these species to dominate these ecosystems. Our results have showed that: (i) mixotrophy is a metabolic strategy of key-phytoplankton species in these ecosystems. The nutrient scarcity and higher flux of UVB have been identified as the main abiotic factors in the selection of this strategy. A direct relationship between the mixotrophic strategy and the elemental composition of organisms has been found; (ii) different physiological strategies are developed by organisms: (a) the synthesis and accumulation of photoprotective compounds that act as shields (MAAs) and antioxidants (phenols) against UV radiation in epilithic and littoral communities, respectively but not in planktonic algae; (b) the decrease in the HUFA:PUFA ratio under UVR. This alteration of lipid composition is considered as a response of acclimated algae to stressful environments. Two new strategies have been proposed in this study as mechanism of algal acclimation to UVR: (a) increase in extracellular alkaline phosphatase (APA) by UVR which increases algal P-content and allows DNA repair; (b) excretion of photosynthetic carbon by algae, resulting in low sestonic C:P ratios. This adaptive response may reflect the presence of alternative catabolic pathways to maintain the intracellular recycling of phosphorus in P-limited primary producers.

The interactive UVR x P effect on food web was synergetic positive on microbial loop (i.e both factors stimulated virus, bacteria and ciliate growth) on mid-term scale. This effect disappeared when P-inputs were depleted. By contrast, a negative synergetic UVR x P effect was found on algal community (i.e. greater effect of UVR as the P-input concentration increase) and the decrease in algal diversity (loss of mixotrophic flagellate) after P-pulse on a long-term scale indicate a negative correlation between the tolerance of species to UVR and their tolerance to P-pulse. Consequently, the increase in the intensity of P-atmospheric inputs drives the disappearance flagellates with mixotrophic metabolism, a key functional group which constitute a by-pass in the C-flux between microbial loop and grazing chain, affecting the function of ecosystem. Finally, the loss of mixotrophs and the development of chlorophyceae at high abundance uncouples the relationship between algae and herbivorous zooplankton (*Mixodiatomus laciniatus*) generating phenomena of eutrophication in these high mountain lakes.

**Key words:** Key-species, food web, Ultraviolet Radiation (UVR), P-enrichment, UVRxP interactive effects.

## INTRODUCCIÓN

Las redes tróficas, como vías de flujo de energía y materiales en los ecosistemas, constituyen uno de los más complejos fenómenos conceptuales de la Biología moderna (PIMM *et al.* 1991). Esta complejidad se incrementa porque los “nodos” de las

redes tróficas están representados por organismos de diversas especies clave, constituyendo cada individuo un sistema bioquímicamente complejo, y cada especie el producto de un continuo cambio evolutivo (HOLT 1995). Comprender la estructura e interacciones de las redes tróficas es uno de los grandes objetivos de la

emergente ciencia de la “Biocomplejidad” (MICHENNER *et al.* 2001). Es conocido que un limitado número de organismos o grupo de especies “clave” controla los procesos funcionales del ecosistema, al constituir los nodos principales en la red trófica (MELIÁN & BASCOMPTE 2002). El resto de organismos y sus interacciones contribuyen a la resiliencia del ecosistema (GUNDERSON 2000; DÍAZ & CABIDO 2001). A pesar de lo anterior, aún es escasamente conocido cómo y en qué medida son afectados los procesos en los ecosistemas por la pérdida de biodiversidad asociada a perturbaciones naturales o antrópicas (CHAPIN *et al.* 2000; DÍAZ & CABIDO 2001). Las predicciones teóricas y los resultados experimentales obtenidos hasta el presente, indican que son las variaciones en los tipos funcionales del ecosistema, más que en la riqueza de especies, las que pueden ocasionar cambios drásticos en el funcionamiento del ecosistema. Esto se corrobora cuando se extingue una especie o grupo de especies que conforman un tipo funcional, lo que ocasiona un mayor impacto sobre el ecosistema que la pérdida de un número equivalente de especies pertenecientes a una variedad de tipos funcionales (CHAPIN *et al.* 2000; GUNDERSON 2000; DÍAZ & CABIDO 2001).

La radiación solar y el aporte de nutrientes son los principales factores ecológicos que determinan la estructura y el funcionamiento del ecosistema (STERNER & ELSER 2002, ver referencias). Por lo tanto, cualquier alteración de uno o ambos factores abióticos puede afectar al ecosistema como un todo. Es conocido que el incremento en el flujo de UV-B (280-315 nm) derivado de la disminución del espesor de la capa de ozono puede afectar a procesos claves en la base de las redes tróficas tales como fotosíntesis (HÄDER *et al.* 2007), consumo de nutrientes (DÖHLER 1997; HESSEN *et al.* 1995), fototaxis y migración del plancton (LEECH & WILLIAMSON 2001), reproducción o crecimiento de los organismos (BUMA *et al.* 1997; HELBLING & ZAGARESE 2003, y referencias aquí). También es conocido el efecto ecológico sobre la estructura y la dinámica de la biota de un incremento en la disponibilidad de nutrientes limitantes asociado a la eutrofización antrópica (STERNER & ELSER 2002). Sin embargo, en la actualidad y con la perspectiva de

una escala de análisis global (WOODWARD *et al.*, 2005), existe un creciente interés sobre el efecto de los pulsos de nutrientes asociados a aerosoles atmosféricos en ecosistemas oligotróficos prístinos, como los océanos abiertos (DUARTE *et al.* 2006) o los lagos de alta montaña (VILLARARGAIZ *et al.* 2001, 2002; MORALES-BAQUERO *et al.* 2006), puesto que sus patrones de respuesta biológica son aún muy poco conocidos.

Muchos estudios han analizado el efecto individual del espectro de radiación solar (HELBLING & ZAGARESE 2003) o de los nutrientes sobre los organismos; sin embargo, su interacción puede afectar el rendimiento de las especies y sus relaciones por vías que no son predecibles a partir del análisis de un factor simple, ya que sus efectos no siempre son aditivos. Existe una alta probabilidad de que los estresores ejerzan efectos interactivos complejos no aditivos dada la ubicuidad de los *trade-offs* (respuestas compensatorias ecológicas) (KNEITEL & CHASE 2004), de las tolerancias inducidas por el estrés (BLANCK 2002), y de las diferencias en la sensibilidad frente a los estresores entre los niveles tróficos (VINEBROOKE *et al.* 2003; PETCHEY *et al.* 2004, RAFFAELI 2004). Cuando en los organismos tienen lugar *trade-offs* frente a un conjunto de estresores, normalmente se generan interacciones sinérgicas. En cambio, la tolerancia de las especies inducida por el estrés genera interacciones antagónicas, puesto que el impacto acumulativo de los estresores en conjunto es menor que el esperado, es decir, que el impacto de un estresor determinado se atenúa en presencia de otro estresor (FOLT *et al.* 1999; CHRISTENSEN *et al.* 2006, VINEBROOKE *et al.* 2004).

Generalmente los organismos acuáticos desarrollan mecanismos compensatorios frente al estrés por UVR a través de:

- *Estrategias de comportamiento* (migración en la columna de agua): en muchas ocasiones los organismos pueden evitar la exposición a los flujos de UVR permaneciendo en zonas profundas de la columna de agua durante el día (CARRILLO *et al.* 1991; CRUZ-PIZARRO *et al.* 1998). Tales estrategias pueden no ser efectivas si el cuerpo de

agua es muy somero y/o su transparencia permite que la radiación ultravioleta penetre en profundidad.

- *Estrategias fisiológicas*: La fotoinhibición dinámica y la biosíntesis o acumulación de compuestos fotoprotectores son estrategias primarias de fotoprotección que se combinan con modificaciones fotomorfogénicas (tamaño y forma celular). La combinación de cambios pigmentarios y morfológicos altera las propiedades bio-ópticas del fitoplancton (efecto empaquetamiento) con lo que las células consiguen disminuir la penetración de UV y su efecto negativo en moléculas diana como ADN y proteínas (FIGUEROA *et al.* 1997). Entre las sustancias fotoprotectoras se encuentran melanina, escitoneminas, fenoles, MAAs (aminoácidos tipo micospolina) y carotenoides. Los MAAs actúan como pantallas de radiación UV (UVR) mediante mecanismos de disipación térmica o como antioxidantes, absorbiendo directa o indirectamente la energía de UVR (LAURION *et al.* 2002; KORBEE *et al.* 2004). En microalgas eucarióticas y cianobacterias, la acumulación de MAAs en presencia de UVR (solar o artificial) es especie-dependiente y específica para cada MAAs, y además está controlada por la calidad espectral de la radiación incidente (GARCÍA-PICHEL 1994). A pesar del hecho de que los MAAs son compuestos nitrogenados, existe poca información del efecto interactivo entre UVR y disponibilidad de nutrientes sobre la síntesis y bioacumulación de MAAs (LITCHMAN *et al.* 2002; KORBEE *et al.* 2004).
- *Estrategias bioquímicas*: entre éstas destacan los mecanismos de reparación del daño después de que éste ocurra (BUMA *et al.* 1997; BOELEN *et al.* 2001). La fotoreparación es una estrategia evidenciada en las comunidades bacterianas de la laguna de La Caldera (CARRILLO *et al.* 2002; MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2002), y que también es efectiva en otras comunidades bacterianas altamente expuestas a la radiación solar, como las de aguas antárticas (VISSER *et al.* 1999; DADVISON *et al.* 2000). Otras estrategias bioquímicas incluyen la actividad antioxidante de enzimas (catalasa, peroxidasa, etc.) y

de ácidos grasos, como respuesta a la generación de radicales libres.

- *Estrategias metabólicas*: el metabolismo mixotrófico, característico de muchas especies de algas que habitan en ecosistemas fuertemente expuestos a radiación ultravioleta y limitados por nutrientes minerales, puede constituir una estrategia adaptativa que permita soportar ambas condiciones de estrés. Esta estrategia permite la utilización de las bacterias como fuente de carbono y nutrientes minerales en condiciones de fotosíntesis y consumo de nutrientes inhibidos por UVR (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2004).

Otro importante factor de estrés para las algas de lagos de alta montaña es la escasez de nutrientes; frente a la crónica limitación por fósforo los organismos desarrollan distintas estrategias:

- *Estrategias de afinidad* por los nutrientes limitantes, en las que las algas muestran ventaja competitiva frente a otros organismos competidores (bacterias) en la adquisición de fósforo tras un pulso externo (ej. atmosférico) de nutrientes (CARRILLO *et al.* 2008b)
- *Estrategias de crecimiento masivo*, propias de especies de crecimiento rápido, que son favorecidas por incrementos en la disponibilidad de nutrientes (DELGADO-MOLINA *et al.* 2009a; 2009b).
- *Estrategias de "consumo de lujo"* y almacenamiento de fósforo, incrementando su tamaño celular (biovolumen) y su contenido celular en P ("P cell quota") (CARRILLO *et al.* 2008b).

Recientemente se ha reconocido la urgente necesidad de analizar la interacción entre radiación UV y disponibilidad de nutrientes (VILLAFAÑE 2004), y de combinar estudios a corto y largo plazo que permitan analizar la diferente capacidad de aclimatación de los organismos atendiendo precisamente a su respuesta interactiva. Hasta el momento, los trabajos en esta línea han tratado aspectos parciales de la estructura y sucesión de la nanoplanctónica (BERGERON &

VINCENT 1997; XENOPOULOS & FROST 2003) o aspectos funcionales exclusivamente de la comunidad algal (XENOPOULOS *et al.* 2002; LITCHMAN *et al.* 2002). La interacción de factores puede cambiar el signo del efecto de un solo factor (efecto antagónico) o acentuar el efecto de un factor simple (efecto sinérgico). Por lo tanto, el análisis de múltiples factores actuando a diferentes tasas y escalas ha llegado a ser recientemente un punto "caliente" de investigación ("hot research point") (BREITBURG *et al.* 1999; FOLT *et al.* 1999; XENOPOULOS *et al.* 2002; CRAIN *et al.* 2008).

Por todo ello, los objetivos de este proyecto han sido conocer:

1. Cuáles son las estrategias adaptativas de las especies clave de las redes tróficas pelágicas de los lagos de Sierra Nevada.
2. Cómo distintos factores abióticos (radiación ultravioleta, entrada de nutrientes minerales) influyen sobre las especies clave que condicionan el funcionamiento de estos ecosistemas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Estudio extensivo*

Se seleccionaron 14 lagunas que representan la heterogeneidad del área de estudio. Lagunas como La Caldera (CAL), Las Yeguas (YG1), Borreguiles (YG2), Laguna Larga (LG1), y Caballo (CAB) están situadas sobre terreno rocoso desnudo; otras como Río Seco (RS1), Río Seco Superior (RS2), Aguas Verdes (AV), Virgen Superior (VIR1), Virgen Media (VIR2), Siete Lagunas (Laguna 6, Laguna 7), Laguneto (LG2), o Caldereta (CT) están rodeadas de pastizales denominados "borreguiles" (Tabla 1). El período de muestreo se redujo tanto como fue posible (dos semanas) para minimizar el efecto de la variación temporal. Cada laguna se muestreó una vez durante el período libre de hielo de 2005, se realizaron mediciones *in situ* de variables físicas (profundidad máxima y de mezcla, perfiles verticales de temperatura y de radiación activa fotosintética [PAR]

y ultravioleta [UVR], luz promedio de las distintas regiones del espectro de radiación en la capa de mezcla [Im]) y se tomaron muestras integradas de la columna de agua para analizar variables químicas y biológicas estructurales (nitrógeno total [NT] y disuelto [NDT], fósforo total [PT] y disuelto [PDT], carbono, nitrógeno y fósforo sestónicos, clorofila *a*, micosporinas ["mycosporine-like amino acids", MAAs]) y funcionales (producción primaria [PP], producción bacteriana [PB] y bacterivoría algal). En cada ecosistema, el agua utilizada para el análisis de variables químicas y biológicas consistió en una muestra integrada representativa de la capa de mezcla de la columna de agua, tomada con una botella tipo Van Dorn vertical. Con excepción de las alícuotas destinadas a la determinación de las fracciones totales de nitrógeno y fósforo (NT y PT), el agua fue filtrada por una red de 40  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para eliminar el metazooplancton.

### *Estudio experimental*

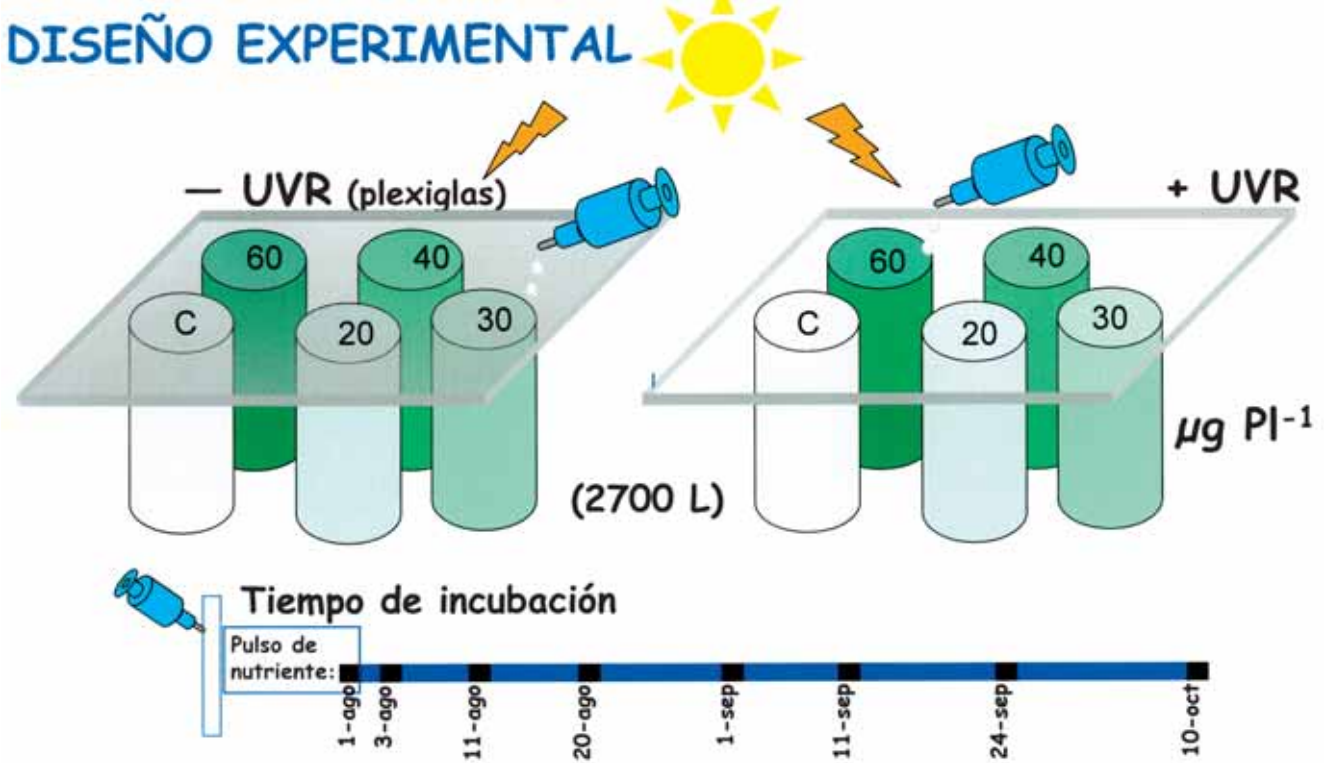
Los experimentos se llevaron a cabo en 10 mesocosmos de polietileno, material plástico que deja pasar todo el espectro de radiación solar, (transmitancia comprendida entre el ~60% a 280 nm y >80% a 700 nm de longitud de onda). Con unas dimensiones de 1 m de diámetro, 7 m de profundidad y 2.700 litros de capacidad, los mesocosmos se llenaron con agua del lago tomada de la capa de mezcla de la columna de agua. El diseño experimental consistió en un análisis factorial 5x2. Se controló la concentración de nutrientes aplicando cinco niveles de enriquecimiento en fósforo (P) (adición de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en un único pulso al comienzo del periodo experimental) en concentración final creciente (no adición [control], 20, 30, 40 y 60  $\mu\text{g P l}^{-1}$ ). Para evitar la limitación de los organismos por nitrógeno (N) se adicionó  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  manteniendo una razón N:P atómica de 30. También se controló la calidad de la radiación solar, de forma que cinco mesocosmos se cubrieron con una lámina de plexiglás para excluir la radiación ultravioleta <400 nm (tratamiento -UVR), mientras que los cinco tratamientos restantes no se cubrieron, de forma que les llegara todo el espectro de radiación solar (tratamiento +UVR).

Laguna	Latitud	Longitud	Altitud (m.a.s.l.)	Area Lake	Area de captación	Uso del suelo	Zm (m)	Kd PAR (m <sup>-1</sup> )	TP (µg P L <sup>-1</sup> )	Chl a (µg L <sup>-1</sup> )
Laguna 7	37° 02' 53" N	3° 17' 39" W	2890	0.5	154.6	M	0.2	1.60	12.2	0.7
Laguna 6	37° 03' 01" N	3° 17' 56" W	2930	0.4	54.0	M	1.1	0.82	11.4	11.8
La Caldera	37° 03' 17" N	3° 19' 45" W	3050	2.1	23.5	R	1.7	0.38	11.3	1.9
La Caldereta	37° 03' 10" N	3° 19' 37" W	2900	0.6	50.4	R	0.9	0.66	28.8	4.9
Laguneto	37° 03' 36" N	3° 20' 13" W	2780	0.2	30.0	R	1.9	0.38	11.7	3.6
Laguna Larga	37° 03' 36" N	3° 20' 14" W	2790	1.8	29.4	R	4.5	0.20	4.0	0.2
Río Seco	37° 03' 06" N	3° 20' 31" W	3020	0.4	9.9	M	1.4	2.66	14.2	0.4
Río Seco Superior	37° 03' 08" N	3° 20' 45" W	3040	0.1	4.7	M-R	1.3	1.82	14.0	1.4
Aguas Verdes	37° 02' 54" N	3° 22' 06" W	3050	0.2	12.8	M-R	1.2	1.05	28.0	2.0
Virgen 1	37° 03' 06" N	3° 22' 44" W	2950	0.1	25.1	M	0.8	0.45	9.4	0.5
Virgen 2	37° 03' 09" N	3° 22' 43" W	2940	0.1	31.2	M	0.3	0.94	34.3	10.0
Yeguas	37° 03' 22" N	3° 22' 50" W	2880	3.0	50.0	R	6.5	0.28	3.5	7.8
Yeguas 2	37° 04' 23" N	3° 23' 26" W	2620	1.6	4.0	R	9.1	0.65	14.4	12.0
Caballo	37° 00' 52" N	3° 26' 16" W	2840	0.5	10.5	M-R	2.0	0.65	17.8	0.7

**Tabla 1.** Caracterización de los lagos durante el estudio.

**Table 1.** Characterization of ecosystems during the study.

M: borreguil, R: roca, Zm: profundidad máxima, Kd PAR: coeficiente de atenuación difusa para la radiación fotosintéticamente activa, TP: fósforo total, Chl a: clorofila a  
 M: meadows, R: rocky terrain, Zm: maximum depth, Kd PAR: diffuse attenuation coefficient for photosynthetic active radiation, TP: total phosphorus, Chl a: chlorophyll a.



Tras el pulso de nutrientes, los mesocosmos se incubaron durante 70 días (desde el 1 de agosto hasta el 10 de octubre de 2003). La periodicidad de muestreo de los mesocosmos se adecuó a los tiempos de generación de los diferentes grupos de organismos estudiados (desde bacterias a zooplancton). Así, se tomaron muestras en ocho ocasiones con una periodicidad gradualmente mayor, desde un intervalo de dos días al comienzo de la incubación hasta dos semanas hacia el final del periodo experimental (más detalles en CARRILLO *et al.* 2008a).

Con objeto de extrapolar los resultados a las condiciones del medio, además se llevó a cabo un seguimiento estacional del lago a lo largo de todo el periodo libre de hielo.

*Variables estructurales: físicas, químicas y biológicas*

*Variables físico-químicas:* Durante cada día de muestreo se midió: (1) los perfiles verticales de atenuación del espectro completo de la radiación solar (entre 300 y 800 nm) en la columna de agua, ambos durante el momento de máxima verticalidad de la radiación incidente, usando un espectrorradiómetro "LI-8000 spectroradiometer"

(LI-COR, Lincoln, NE). Las medidas se realizaron en el momento de máxima verticalidad del sol; (2) los coeficientes de atenuación difusa de la radiación incidente ( $K_d$ ) se determinaron calculando la pendiente de la regresión lineal entre los logaritmos naturales de la radiación incidente con la profundidad para cada rango de longitudes de onda; (3) los perfiles verticales de temperatura (T), pH, concentración de oxígeno ( $\%O_2$ ) y potencial de oxidación-reducción (red-ox) tanto del lago como de los mesocosmos, usando una sonda multiparamétrica (TURO).

*Toma de muestras:* Las muestras de agua para cuantificar las variables químicas y biológicas estructurales se tomaron por triplicado, previa homogeneización de la columna de agua de cada mesocosmos. De ellas, se tomaron las siguientes submuestras: 50 ml para el análisis del fósforo total (PT) y nitrógeno total (NT); un volumen mínimo de 900 ml en botellas de PET para la determinación de clorofila *a* sobre filtros de 0,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (GF/F, Whatman); 900 ml en botellas de PET para el análisis de la composición elemental de fitoplancton y bacterias; 130 ml en frascos de vidrio y fijación con Lugol alcalino

(aprox. 1% v/v de concentración final) para la cuantificación de fitoplancton y nanoflagelados heterotróficos; 20 ml en botes esterilizados (tipo penicilina) y fijación con formaldehído neutralizado y filtrado por 0,2  $\mu\text{m}$  (concentración final 2%), para la cuantificación del bacterioplancton; 1000 ml de agua fijada con Lugol (aprox. 1% v/v de concentración final) para la cuantificación de ciliados; a partir del agua filtrada por 0,7  $\mu\text{m}$ , se tomaron sendas alícuotas de 50 ml para los análisis de fósforo disuelto total (PDT), nitrógeno disuelto total (NDT), fósforo reactivo soluble (SRP), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y alcalinidad.

*Análisis químicos:* Los análisis químicos se realizaron siguiendo procedimientos estándar (APHA 1992). Así, el fósforo reactivo soluble (SRP) se analizó siguiendo el método de molibdato amónico. El fósforo total (PT) y fósforo disuelto total (PDT) se determinaron espectrofotométricamente previa oxidación con una mezcla oxidante. La concentración de nitratos se determinó mediante espectrofotometría a 220 nm.

Para analizar la composición elemental de algas y de bacterias se siguió una filtración en serie (con agua prefiltrada por 40  $\mu\text{m}$ ) a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro previamente combustiónados (500 °C, 1 hora) para la cuantificación del contenido algal de P, N y de C, y de filtros de policarbonato (Nuclepore, Whatman) o de óxido de aluminio (Anodisc Whatman) precombustionados (500 °C, 1 hora), ambos tipos de filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para analizar el contenido bacteriano de P, y de N y C, respectivamente. El P de ambas fracciones, fitoplanctónica y bacteriana, se analizó mediante espectrofotometría digiriendo previamente el contenido de los respectivos filtros con mezcla oxidante y siguiendo la técnica del molibdato (APHA 1992). Previamente al análisis, las muestras de P fitoplanctónico digeridas se filtraron de nuevo (GF/B Whatman) para eliminar turbidez. Los filtros para el análisis de C y N se mantuvieron a -20°C o en campana de desecación hasta que se procesaron en un analizador elemental CNH Perkin-Elmer, modelo 2400 (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA).

*Análisis de fotoprotectores.* El análisis de la concentración y composición de MAAs fue realizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV-Visible Waters 996 (barrido desde 290 hasta 400 nm), columna C8 una fase móvil de 2,5% metanol y 0,1% de ácido acético, y flujo de 0,5 mL·min<sup>-1</sup> (KORBEE *et al.* 2004).

La concentración de compuestos fenólicos fue evaluada utilizando 0,25 g de peso fresco. Las muestras fueron pulverizadas en nitrógeno líquido, y extraídos 12 horas en tubos de centrifugadora con 2,5 ml de 80 % (v/v) de metanol. La mezcla fue centrifugada a 19.000 g durante 15 minutos y el sobrenadante recogido. Los compuestos fenólicos totales fueron determinados espectrofotométricamente (FOLIN & CIOCALTEU 1927). Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene, Sigma P-3502) fue utilizado como estándar. La concentración de fenol fue expresada como mg/g peso seco después de determinar la razón peso fresco:peso seco en el tejido.

Los ácidos grasos en el seston fueron analizados después de extracción y metilación (MASON & WALLER 1964) utilizando un cromatógrafo de gas (Finnigan MAT GCQ) equipado con un pulverizador-inyector de temperatura programable y una columna capilar sílice (DB 225 MS) (J & W Scientific), y un detector de ionización de llama. Las unidades para ácidos grasos en este estudio son g/mg de carbono sestónico

*Variables biológicas:* La concentración de clorofila *a* (Chl *a*) fue medida espectrofluorimétricamente (LS 55 Luminiscence Spectrometer, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) tras moler el filtro (Whatman GF/F filtro de fibra de vidrio, 25-mm) con pigmentos concentrados por filtración de 300-ml de agua a <100-mm Hg de presión y extraerlos en acetona (90%) durante 24 horas a 4 °C.

La cuantificación de la abundancia de fitoplancton, ciliados y nanoflagelados heterotróficos se realizó siguiendo el método propuesto por Uthermöl (1958). Se sedimentó una alícuota de muestra en una cámara Uthermöl durante 48 horas para asegurar la sedimentación de las células más pequeñas. En un microscopio óptico in-



vertido (Leitz, Labovert) se contaron al menos 200 individuos de la especie más abundante cuando fue posible. El biovolumen celular se estimó en cada muestra mediante análisis de imágenes (Leica, Quantimet 500) de 20 células por especie. El cálculo se realizó por aproximación de la forma celular de cada especie a su forma geométrica y fue convertido a carbono usando los factores de conversión por propuestos específicos CARRILLO *et al.* (1995).

La abundancia bacteriana se cuantificó sobre muestras teñidas con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración final mínima de 0,2%, durante 15 minutos. A continuación se filtró a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  de policarbonato negro (Nuclepore<sup>®</sup>). En un microscopio óptico de epifluorescencia (Leitz, Fluovert FS) equipado con un bloque de filtros Ernst Leitz (BP 340-380/DM 400/LP 425), se contaron al menos 400 células por muestra.

El biovolumen bacteriano se estimó a partir de análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), aproximando cada célula a su forma geométrica más ajustada. El biovolumen se calculó midiendo el diámetro celular (D) en las formas cocoides, o el ancho (A) y longitud (L) en las formas bacilares y filamentosas. La biomasa bacteriana (C, fg C  $\text{cél}^{-1}$ ) se calculó de acuerdo con la relación alométrica entre el volumen celular y el contenido en carbono (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 1999).

#### Variables funcionales

La producción primaria se midió utilizando la técnica del  $^{14}\text{C}$ . Para cada determinación se añadió 2,5  $\mu\text{Ci}$  de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  de una ampolla de 10  $\mu\text{Ci}$   $\text{ml}^{-1}$  (actividad específica = 8,4 mCi  $\text{mmol}^{-1}$ , NEN Dupont) a cada una de las botellas experimentales (tres botellas claras de cuarzo y una oscura, de 40 ml). Éstas se incubaron durante 4 horas. La producción primaria (PP) se midió como carbono orgánico particulado  $>1 \mu\text{m}$  ( $\text{POC}_1$ ) y se determinó filtrando una alícuota de 35 ml a través de un filtro Nuclepore de 1,0  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. El filtrado se filtró a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  (carbono orgánico particulado 0,2-1  $\mu\text{m}$ ,  $\text{POC}_2$ ). Por último, para la determinación del carbono or-

gánico disuelto producido (DOC), se tomó una alícuota de 4 ml del filtrado resultante  $<0,2 \mu\text{m}$  (detalles sobre el procedimiento analítico en CARRILLO *et al.* 2002). La excreción de C orgánico fotosintético (EOC) fue calculada como:

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

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

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

La producción bacteriana heterotrófica (PB) se determinó utilizando la técnica de incorporación en el ADN bacteriano de timidina marcada. Se añadió [metil- $^3\text{H}$ ] timidina (actividad específica = 82 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ , Amersham Pharmacia) a cada uno de los viales experimentales de 1,5 ml de muestra (6 réplicas + 6 blancos para cada mesocosmos) hasta una concentración final de 11,05 nM. Los viales experimentales se incubaron durante 60 minutos en oscuridad (detalles sobre el procedimiento analítico en MEDINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2004)

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

#### Cuantificación de bacterivoría por algas mixótrofas

Valoramos experimentalmente la capacidad bacterívora (mixotrofia) de algas como la proporción de la producción bacteriana consumida por la fracción algal por medio de la incorporación de timidina (TdR). Así, la incorporación activa de TdR por algas deriva del consumo de bacterias nativas marcadas, única fracción biológica capaz de incorporar TdR a concentraciones nanomolares. La ventaja de utilizar esta técnica reside en que TdR satisface los requisitos de un trazador ideal para medir simultáneamente la PB y su consumo por mixótrofos en la misma muestra (más detalle en MEDINA-SANCHEZ *et al.* 2004; 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *¿Cuáles son las estrategias adaptativas de las especies clave de las redes tróficas pelágicas de los lagos de Sierra Nevada?*

#### ➤ *Estrategias metabólicas: Mixotrofia.*

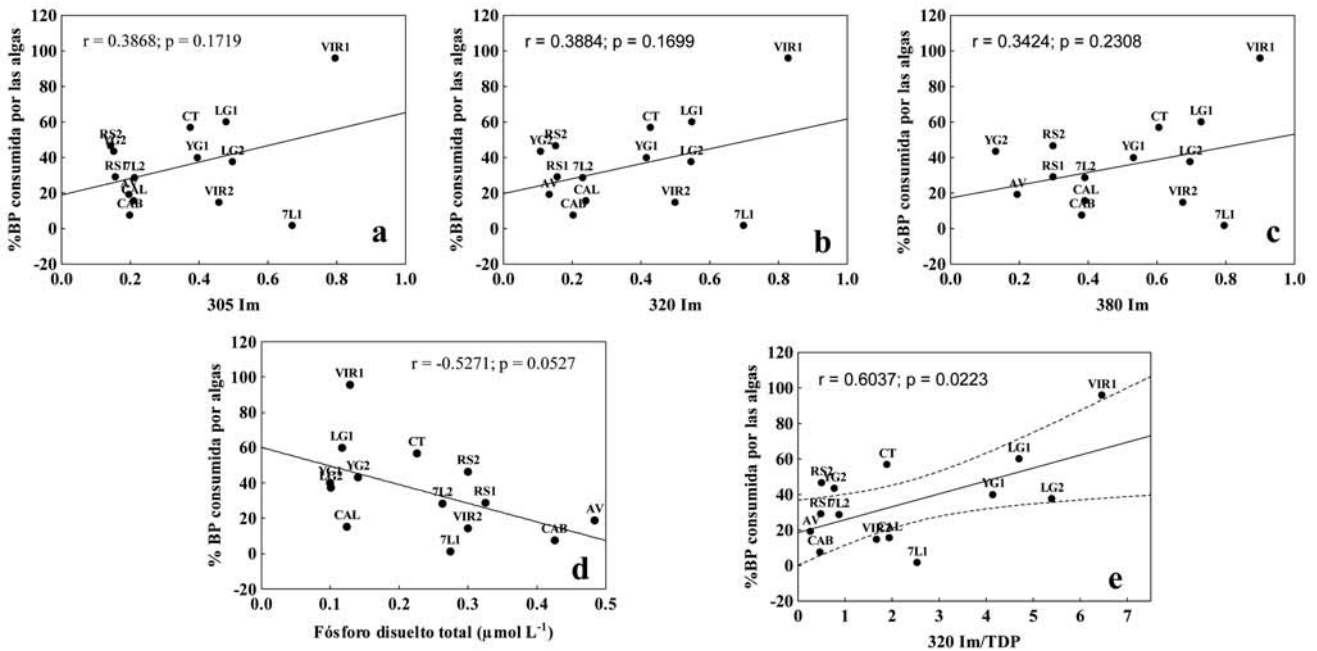
La mixotrofia en sentido restringido es definida como la combinación de fotosíntesis y fagotrofia en el mismo individuo (SANDER 1991). A pesar de que el mantenimiento del metabolismo mixotrófico supone un mayor coste energético (mantenimiento de los aparatos fotosintético y fagotrófico en la misma célula) que el de un metabolismo estrictamente autótrofo o heterótrofo, la mixotrofia constituye una estrategia adaptativa para crecer en condiciones adversas. La naturaleza dual de su metabolismo (autotrófico y heterotrófico) les confiere ventaja en ecosistemas donde la luz o los nutrientes minerales son limitantes ya que su capacidad fagotrófica les permite suplementar su modo de crecimiento autotrófico con el carbono y los nutrientes minerales contenidos en sus presas, ej. picoplancton. De esta forma, las especies mixotrofas pueden constituir un tipo funcional "clave" determinante de la estructura y del flujo de energía a través de la red trófica, puesto que contribuyen a las entradas de carbono autóctono en el sistema, y su interacción con el picoplancton implica un mecanismo de transferencia de nutrientes minerales y de energía hacia niveles tróficos superiores, como el zooplancton (SHERR & SHERR 2002; ZUBKOV & TARRAN 2008).

Recientemente se ha mostrado que la mixotrofia no sólo es una respuesta adaptativa a condiciones de limitación, sino también a condiciones de estrés por exceso de radiación solar. Así, MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* (2004) encontraron un estímulo de las tasas de ingestión de bacterias por los mixótrofos en muestras expuestas a altas intensidades de radiación solar (UVB+UVA+PAR). Entre las algas y bacterias se establece una compleja regulación que denominamos "*Ni contigo ni sin ti*" (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2004). Las bacterias son depredadas por las algas ("*ni contigo*" porque *me matas*) y simultáneamente dependen del carbono orgánico liberado por las algas ("*ni sin ti*"

*porque yo muero*) (CARRILLO *et al.* 2002; MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2002; 2004). Por lo tanto, los mixótrofos pueden tener ventaja en escenarios (ecosistemas de aguas claras con alta radiación ultravioleta y escasa disponibilidad de nutrientes minerales) donde el fitoplancton aporta el sustrato orgánico del que dependen las bacterias, al mismo tiempo que las bacterias pueden favorablemente competir por los nutrientes minerales; finalmente los mixótrofos consumen estas bacterias enriquecidas en fósforo. El estudio extensivo realizado en las lagunas de Sierra Nevada muestra que ni la intensidad de luz ( $I_m$ ) ni la disponibilidad de fósforo disuelto total (TDP) individualmente se relacionan significativamente con la proporción de producción bacteriana consumida por los mixótrofos (Fig. 1). Sin embargo, la razón entre la intensidad media ( $I_m$ ) de las distintas longitudes de onda que cuantifican la radiación ultravioleta (UVB 305) y UVA (320 y 380 nm) y la disponibilidad de P explican significativamente un alto porcentaje de bacterivoría por mixótrofos en los lagos de Sierra Nevada. De acuerdo con nuestra hipótesis inicial, el metabolismo mixotrófico se intensifica en lagos de mayor radiación ultravioleta y escasa disponibilidad de P (es decir altas razones UVB/TDP o UVA/TDP), existiendo un mejor ajuste cuando la radiación considerada es la UVB (Fig. 1).

El incremento en la intensidad y frecuencia con la que se están produciendo entradas de materiales alóctonos de origen atmosférico sobre Sierra Nevada, que en buena medida está relacionado con variaciones climáticas (North Atlantic Oscillation, NAO) y con el desplazamiento de la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT), sugiere que las comunidades planctónicas no sólo están controladas por el efecto "dañino" de la radiación ultravioleta, sino también por el efecto "estimulador" del aporte de nutrientes inorgánicos. Puesto que el metabolismo mixotrófico es ventajoso en sistemas estresados por UVR y oligotrofia, y dado que los eventos atmosféricos de origen sahariano que aportan nutrientes (P) son cada vez más frecuentes en Sierra Nevada, nos planteábamos algunas cuestiones

1. ¿De qué forma afectan los pulsos naturales de nutrientes al metabolismo mixotrófico?



**Figura 1.** Relación entre el porcentaje de bacterias consumidas por algas mixótrofas y la radiación solar media en la columna de agua ( $I_m$ ) para longitudes de onda de radiación ultravioleta (a) 305 nm; (b) 320 nm; (c) 380 nm; (d) concentración de Fósforo Disuelto Total (PDT) y (e) la razón  $I_{320m}/PDT$  en los lagos de Sierra Nevada. Son incluidos los valores  $r$  y  $p$  del análisis de regresión, cuando son significativos, y las líneas discontinuas indican intervalos de confianza al 95% alrededor del ajuste lineal de la regresión (línea sólida). Acrónimos en M & M.

**Figure 1.** Relationship between %BP consumed by algae and (a) 305  $I_m$  (b) 320  $I_m$  (c) 380  $I_m$  (d) Total Dissolved phosphorous (TDP) (e)  $320I_m/TDP$  in the Sierra Nevada lakes. Values of  $r$  and  $p$  for regression analyses are shown; when significant, dashed lines indicate 95% confidence intervals around the fitted regression line (solid line). See text for acronyms (M & M).

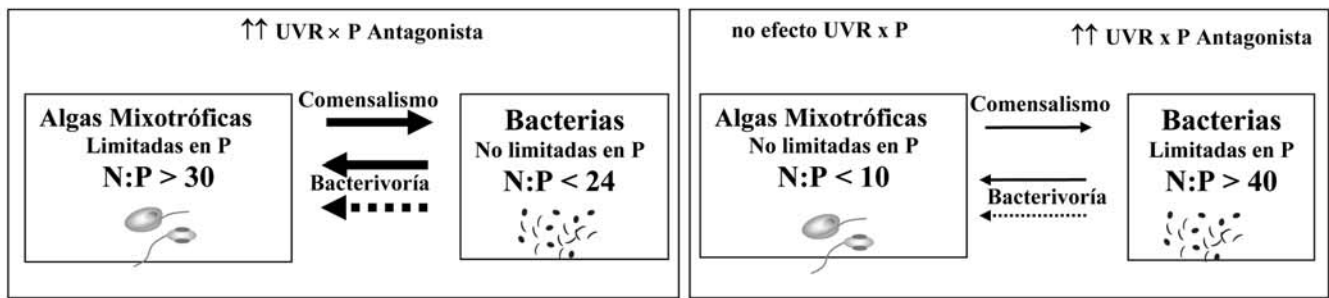
2. ¿Pueden los efectos de los pulsos interactuar con los efectos de UVR para modular dicho metabolismo?

Nuestra hipótesis inicial planteaba que si los pulsos atenúan los efectos negativos de UVR sobre las algas, cabría esperar una disminución de la bacterivoría asociada a la mixotrofia. Como consecuencia, los pulsos de nutrientes modificaría la relación alga-bacteria que variaría desde un control dual (con bacterivoría) hasta un comensalismo por el carbono. Nuestros resultados experimentales sobre escalas temporales cortas indican que:

- la composición elemental de algas y bacterias juega un papel fundamental en la respuesta biológica y ecológica a variaciones en la calidad de la luz y en la disponibilidad de nutrientes. La interacción luz-nutrientes tiene un efecto antagonista sobre la liberación de pro-

ductos extracelulares por los autótrofos (EOC) y la producción bacteriana en condiciones de limitación de nutrientes de ambas comunidades. Este efecto antagonista implica la atenuación o la eliminación de los efectos que la radiación ultravioleta ejerce en condiciones no enriquecidas (Fig. 2).

- el efecto interactivo entre la radiación solar y las cargas de nutrientes inorgánicos atmosféricos sobre la interacción alga-bacteria refuerza el control dual que las algas ejercen sobre las bacterias: incremento en la liberación de carbono por las algas y de la depredación de las algas mixótrofas sobre las bacterias (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2006; CARRILLO *et al.* 2006) (Fig. 2). Por lo tanto, se favorece el mantenimiento del cortocircuito entre las algas y bacterias microbiano (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2004) y determina un escaso desarrollo de otros organismos del bucle microbiano.



**Figura 2.** Diagrama conceptual efecto interactivo Radiación ultravioleta (UVR) y adición de fósforo (P) sobre la interacción alga-bacteria en distintas condiciones de limitación en nutrientes de ambas comunidades. Gráfica modificada de MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* (2006).

**Figure 2.** Conceptual diagram of the antagonistic P x UVR interactive effects on the algae and bacteria in different nutritional condition to both communities. Modified from MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* (2006).

### ➤ Estrategias fisiológicas:

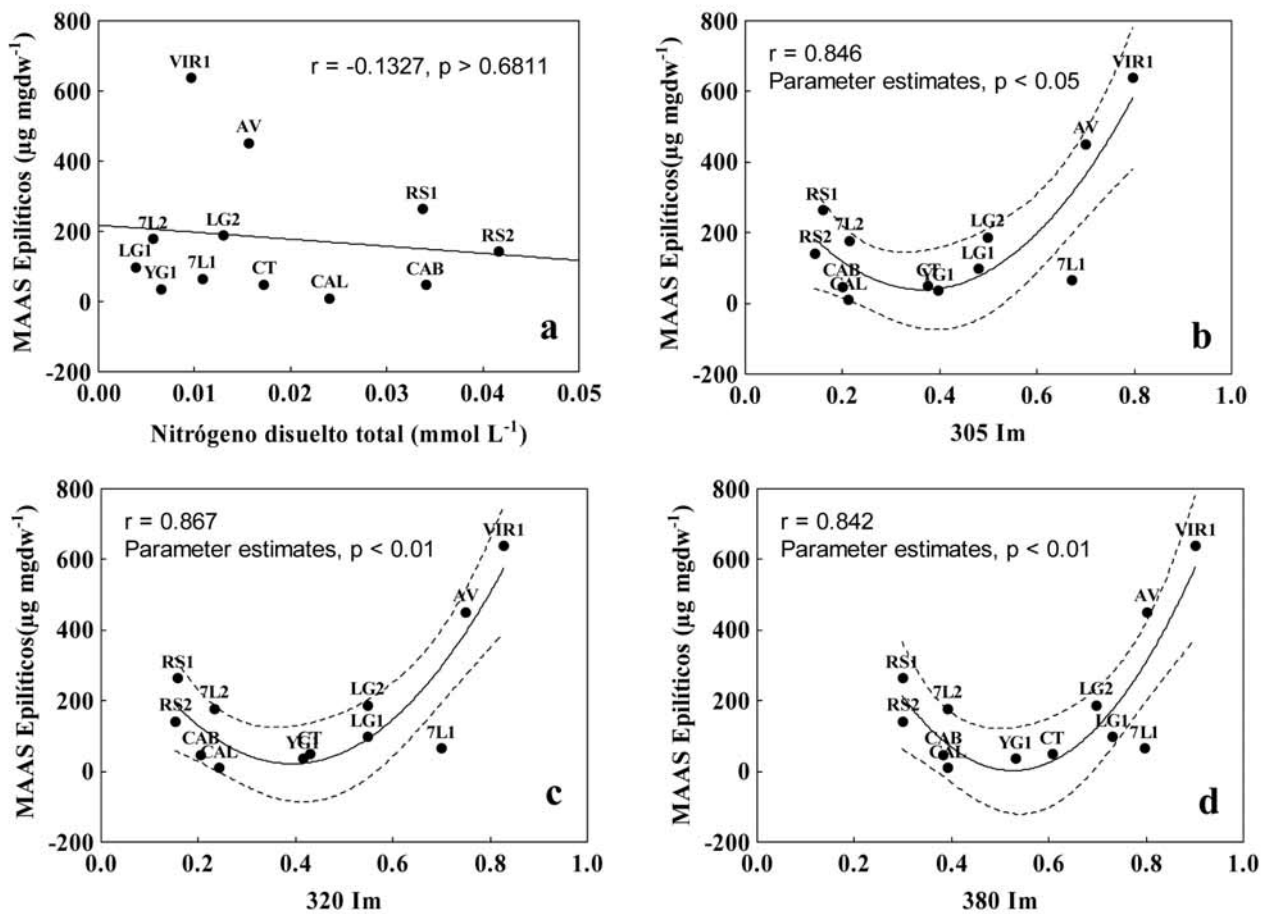
#### 1. Síntesis de moléculas fotoprotectoras

El fitoplancton tienen una variedad de mecanismos fotoprotectores para minimizar el daño potencial causado por radiación ultravioleta solar (UVR, 290 a 400 nm). Éstos incluyen, por ejemplo, la síntesis de biomoléculas que actúan como pantallas solares directas o estrés fotooxidativo, respectivamente (ROY 2000). MAAs es una familia de aminoácidos solubles en agua, de bajo peso molecular, altos coeficientes de extinción de molar ( $\epsilon$ : 28.100 a 50.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>1</sup>) y máximos de absorción entre 309 y 360 nm. La información sobre estos compuestos en fitoplancton de agua dulce y su papel fotoprotector es escasa, reduciéndose a algunos estudios realizados en los Alpes centrales (LAURION *et al.* 2002) o en lagos de alta montaña tropicales (KINZIE *et al.* 1998). Mientras que en los primeros es frecuente que las algas planctónicas tengan un alto contenido de fotoprotectores, en los lagos tropicales estos compuestos aparecen preferentemente en organismos epilíticos y el fitoplancton no parece tener tal protección (KINZIE *et al.* 1998). Resultados semejantes han sido encontrados en los lagos de Sierra Nevada, donde los MAAs solo han podido ser cuantificados sobre muestras epilíticas.

La síntesis de MAAs no estuvo relacionada con el contenido en nitrógeno disuelto total, probablemente porque este nutriente no es limitante en los lagos de Sierra Nevada. Sin embargo, la dis-

tribución de estas moléculas fotoprotectores se relacionó con la intensidad de radiación ultravioleta y más significativamente en el rango de la radiación UVA (Fig. 3).

Entre los compuestos fotoprotectores sintetizados para hacer frente a la radiación UV, los compuestos fenólicos juegan un papel clave, ya que además tienen una importante función como antioxidantes. En el alga filamentosa *Zygnemopsis decussata* (especie que recientemente se está desarrollando en las zonas litorales de la laguna de La Caldera) encontramos un mayor rendimiento fotosintético (ETR, estimador de actividad fotosintética) en algas creciendo a profundidades intermedias (0,25-0,5 m) a la vez que contenían mayores concentraciones de compuestos de polifenólicos (3-5 veces mayor) que en algas creciendo en profundidades menores o mayores (0,1 ó 1 m, Fig. 4). La acumulación de compuestos fenólicos puede ser estimulada en distintas condiciones de estrés (UVR, temperatura, acción de los herbívoros, FIGUEROA *et al.* 2009). Así, la explicación de una actividad fotosintética más alta de algas creciendo en las profundidades 0,25-0,5 m podría ser el alto contenido de compuestos fenólicos que protegen las algas contra el estrés por UVR. En 0,25-0,5 m se alcanzó la proporción más alta de la acumulación neta de fenoles, como un balance neto entre síntesis vs. destrucción (Fig. 4). Así, a 0,1 m, los compuestos fenólicos decrecieron como una consecuencia de una radiación incrementada (foto-blanqueo), y a 1 m la acumulación disminuyó debido a la disminución



**Figure 3.** Relación entre (a) Nitrógeno Disuelto Total (TDN) (b)  $I_m$  305 nm), (c) 320  $I_m$ , (d) 380  $I_m$  y la concentración de MAAs en el epilítón de los lagos de Sierra Nevada. Son incluidos los valores  $r$  y  $p$  del análisis de regresión, cuando son significativos, y las líneas discontinuas indican intervalos de confianza al 95% alrededor del ajuste línea de la regresión (línea sólida). Acrónimos en M & M.

**Figure 3.** Relationship between Ephyllitic mycosporine-like amino acids, MAAs and (a) Total Dissolved Nitrogen (b) 305  $I_m$  (c) 320  $I_m$  (d) 380  $I_m$  in the Sierra Nevada lakes. Values of  $r$  and  $p$  for regression analyses are shown; when significant, dashed lines indicate 95% confidence intervals around the fitted regression line (solid line). See text for acronyms.

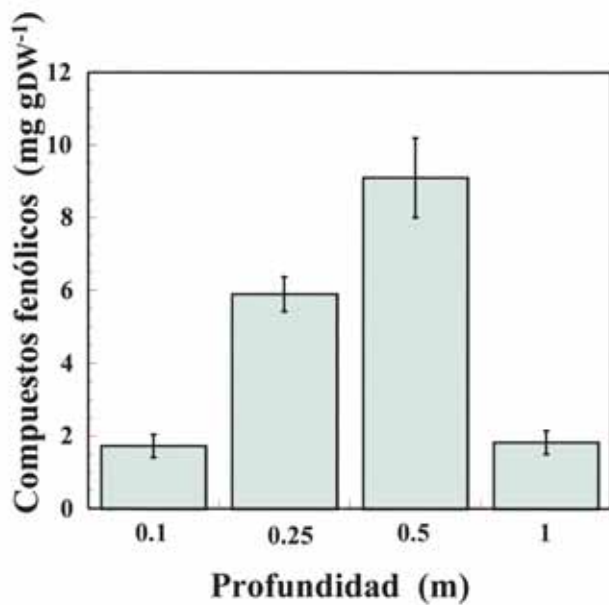
de la irradiancia de UV, que constituye la señal ambiental que desencadena la acumulación de compuestos fenólicos en algas.

## 2. Cambios en la composición elemental

La radiación UV ejerce un efecto estimulador sobre la actividad fosfatasa alcalina (APA) extracelular en los lagos de Sierra Nevada sobre escalas temporales medias (1 semana) (Fig. 5). El incremento en su actividad implica que la APA puede incrementar la disponibilidad de P inorgánico desde fracciones orgánicas disueltas. Este incremento en la disponibilidad de P inorgánico puede explicar el incremento en el contenido intracelular de P (P sestónico) bajo UVR y la disminución en su razón N:P (Fig. 5 b, c). Razones

N:P próximas a 16 (razón de Redfield) determinan: (i) una composición elemental óptima para crecer; (ii) la no existencia de restricciones del nutriente clave (P) para la reparación del ADN dañado por efecto de la radiación UVR. Por lo tanto, estos estudios nos han permitido proponer este nuevo mecanismo fisiológico basado en la relación APA-razón N:P para comprender la aclimatación de las algas en estos ambientes tan extremos (KORBEE *et al.* submitted).

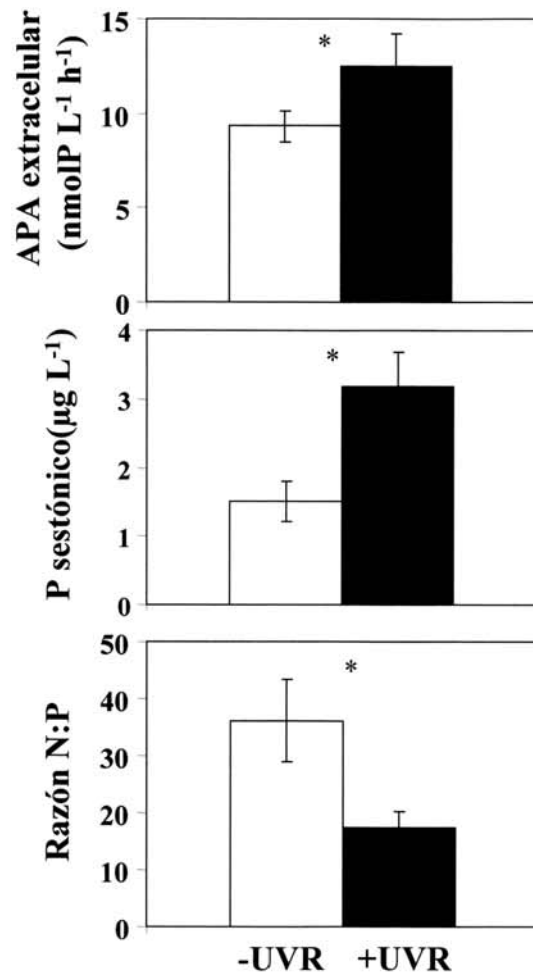
Nuestros experimentos sobre escalas temporales largas (> 2 meses) ponen de manifiesto que la UVR disminuye los valores de C:P fitoplanctónico, enriqueciéndose las algas proporcionalmente en fósforo. XENOPOULOS *et al.* (2002) fueron los primeros autores que mostraron expe-



**Figura 4.** Concentración de compuestos fenólicos (mg gDW<sup>-1</sup>) en talos de *Zygnemopsis decussata* en la laguna de La Caldera. Datos están expresados como valores medios  $\pm$  SD (n=6).

**Figure 4.** Concentration of phenols expressed as mg g DW<sup>-1</sup> in thalli of *Zygnemopsis decussata* collected in La Caldera Lake. Data are expressed as mean value  $\pm$  SD (n=6).

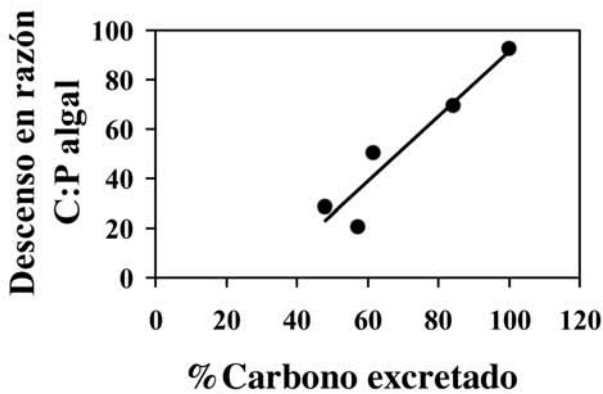
rimentalmente un efecto directo de la radiación ultravioleta disminuyendo la razón C:P fitoplanctónica, y propusieron distintas vías de explicación (básicamente la inhibición en la fijación de carbono y el incremento en la captura de P favorecida por procesos indirectos como fotólisis o reparaciones del daño debido a UVR). MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* (2006) proponen explicaciones adicionales, como la bacterivoría asociada a la mixotrofia que ingresa P procedente de las bacterias con intrínseca baja razón C:P. CARRILLO *et al.* (2008a) demuestran, por primera vez, que la excreción de carbono es el proceso responsable de la disminución de la razón C:P algal por efecto de UVR, y este mecanismo es propuesto como una estrategia adaptativa de la comunidad algal en ecosistemas fuertemente estresados por UVR y nutrientes, ya que la excreción de carbono es el resultado de una ruta catabólica alternativa para reciclar P intracelular de productores primarios fuertemente limitado por P (Fig. 6). Esto es soportado por la tendencia general a incrementarse tanto los valores absolutos (EOC), como los porcentuales (% EOC) en presencia de UVR, independientemente del tratamiento de P. Estos resultados son



**Figura 5.** Efecto UVR sobre (a) actividad de la fosfatasa alcalina extracelular (APA); (b) la concentración de P en la fracción sestónica y (c) la razón N:P algal. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; ns, no significativo.

**Figure 5.** (a) Dissolved Alkaline phosphatase activities (APA) (b) Sestonic P and (c) N:P ratio measured under photosynthetically active radiation (-UVR) and full sunlight (+UVR). Data are expressed as mean values  $\pm$  SD (n=3).

consistentes con el efecto estimulador ejercido por UVR sobre la excreción absoluta y porcentual observado en experimentos previos realizados a corto plazo (CARRILLO *et al.*, 2002). El carácter sinérgico de la interacción UVR x P sobre EOC, indicativo de un efecto mayor de UVR al aumentar la concentración de P, sería consistente con una mayor manifestación del estrés debido a UVR, que potencia *per se* la excreción bajo condiciones enriquecidas en nutrientes limitantes, donde la producción primaria y, por tanto, la excreción de carbono asociada (ya que se relacionan directamente, MAURIN *et al.* 1997; CARRILLO *et al.* 2002) tienen valores más

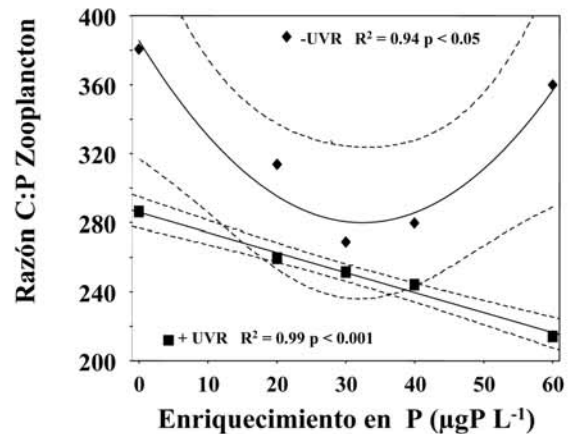


**Figura 6.** Relación entre la liberación de carbono orgánico por las algas en tratamiento +UVR y el descenso en la razón C:P algal en algas sometidas UVR en diferentes niveles de P, regresión lineal  $C:P=1,3218 \%EOC- 40,78$ ;  $r^2= 0.9062$ . Grafica modificada de CARRILLO *et al.* (2008 a).

**Figure 6.** Relationship between percentage of excreted organic carbon (%EOC) in UVR treatment and decrease of C: P ratio between both light treatments at each P level, linear regression:  $C:P=1.3218 \%EOC- 40.78$ ;  $r^2= 0.9062$ . Modified from CARRILLO *et al.* (2008 a).

altos. Recíprocamente, el carácter antagónico de la interacción UVR x P sobre el %EOC, indicativo de un efecto mayor de UVR al disminuir la concentración de P, se debería a una mayor manifestación del estrés por UVR bajo menores concentraciones de P, donde los valores de % EOC son intrínsecamente más elevados dado el mayor desacople entre producción de carbono y su uso para biosíntesis de biomasa en estas condiciones, lo que favorece su liberación al medio (BERMAN-FRANK & DUBINSKY 1999). La excreción de carbono, considerada evolutivamente como un proceso funcional neutro, adquiere funciones secundarias con importantes consecuencias a nivel poblacional, de comunidad y ecosistémico, debido a su utilidad como sustrato energético para las bacterias, por lo que constituye el vínculo clave que une “por abajo” el bucle microbiano con la cadena de pastoreo (BERMAN-FRANK & DUBINSKY, 1999; MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2006).

Aunque la interacción UVR x P tuvo un efecto antagónico sobre la razón C:P algal, la respuesta de la razón C:P del zooplancton fue unimodal negativa (Fig. 7), de forma que la radiación ultravioleta incrementó la razón C:P del zooplancton en los niveles extremos del gradiente (tratamien-



**Figura 7.** Efectos de UVR y enriquecimiento en P sobre la razón C:P del zooplancton. Intervalos de confianza al 95% son incluidos (líneas punteadas) para evaluar la diferencia significativa entre tratamientos +UVR y -UVR .

**Figure 7.** Effects of UVR and P enrichment on the zooplankton C:P ratio. 95% confidence intervals are denoted by dotted lines to evaluate significant differences between +UVR and -UVR treatments.

tos control y 60  $\mu gP L^{-1}$ ). El incremento en C:P es consistente con un incremento en la %C y sugiere el almacenamiento de lípidos, lo que esta soportado por el incremento en la concentración de ácidos grasos poliinsaturado  $\omega 3$ -PUFA en su alimento (BULLEJOS *et al.* 2008; VILLAR-ARGAIZ *et al.* 2009). Las diferencias en C:P ratio del zooplancton inducidas por UVR evidencian la naturaleza de una no estricta homeostasis de los consumidores herbívoros. Este es el primer trabajo que describe el efecto de UVR modificando la composición elemental del zooplancton.

### 3. Cambios en la composición la composición de ácidos grasos.

UVR induce una disminución en la razón ácidos grasos altamente insaturados/poliinsaturados (HUFA:PUFA) a bajos niveles de nutrientes. El efecto beneficioso de UVR incrementando  $\omega 3$ -PUFA puede ser contrarrestado por su efecto dañino a través de la peroxidación de ácidos grasos de cadena larga (HUFA) transformándolos en ácidos grasos de cadena más corta (PUFAs) más resistente a UVR. Esta respuesta es interpretada como un mecanismo de protección frente a altos flujos de radiación solar (VILLAR-ARGAIZ *et al.* 2008; 2009) (Fig. 8).

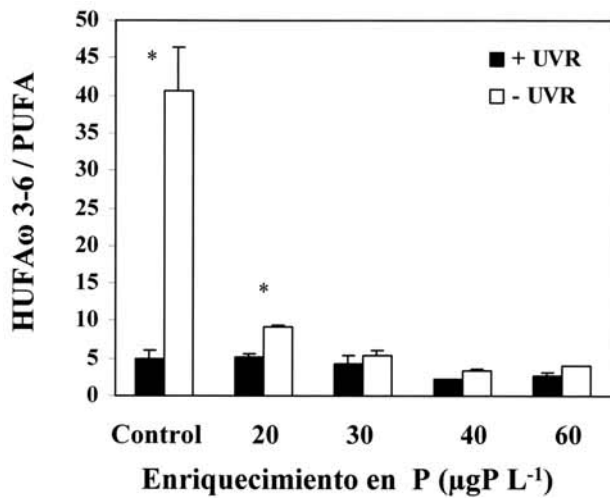


Figura 8. Efecto de la UVR y la adición de nutrientes sobre la razón HUFA  $\omega$ 3-6:PUFA. Los valores son medias y desviación estándar de tres días de muestreo.

Figure 8. Effects of UVR and nutrients on the HUFA  $\omega$ 3-6:PUFA ratio. Values represent mean and standard deviation from the 3 sampling dates.

#### 4. Estrategias relacionadas con la incorporación de nutrientes limitantes.

Las algas tienen ventaja competitiva sobre las bacterias, sus potenciales competidores, independientemente de su estatus nutricional. Por ello, en cualquier condición experimental y en cualquier escala de tiempo, las algas incrementaron su tasa de crecimiento, mientras que la de bacterias disminuyó o permaneció constante (Fig. 9). A lo largo del periodo libre de hielo los organismos atraviesan distintas situaciones de limitación en P, que se evidencian por cambios en sus razones N:P, y éstas modulan la respuesta de la comunidad algal tras la entrada de un pulso de P al sistema. La comunidad algal siguió distintas estrategias de vida:

(i) Estrategia de afinidad: Tras el deshielo, las algas tienen una concentración de P suficiente

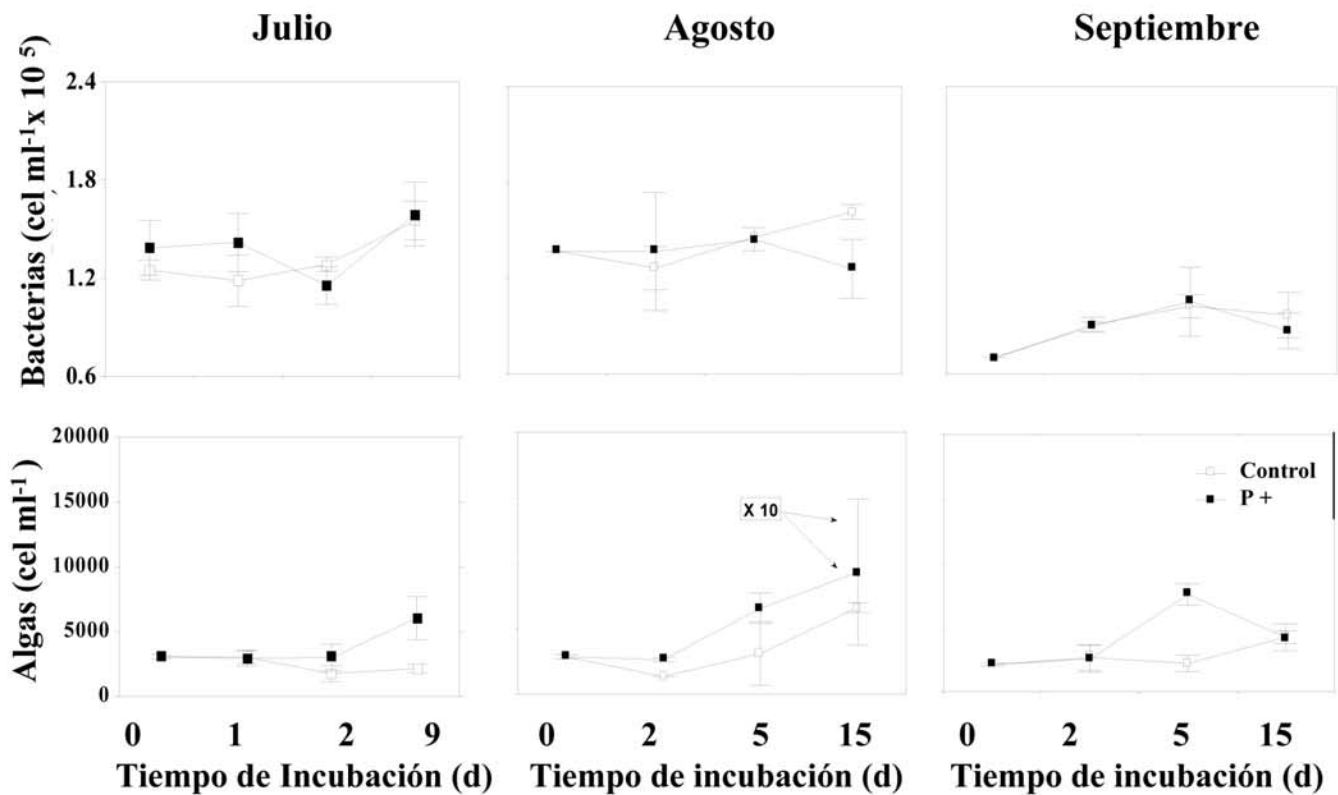
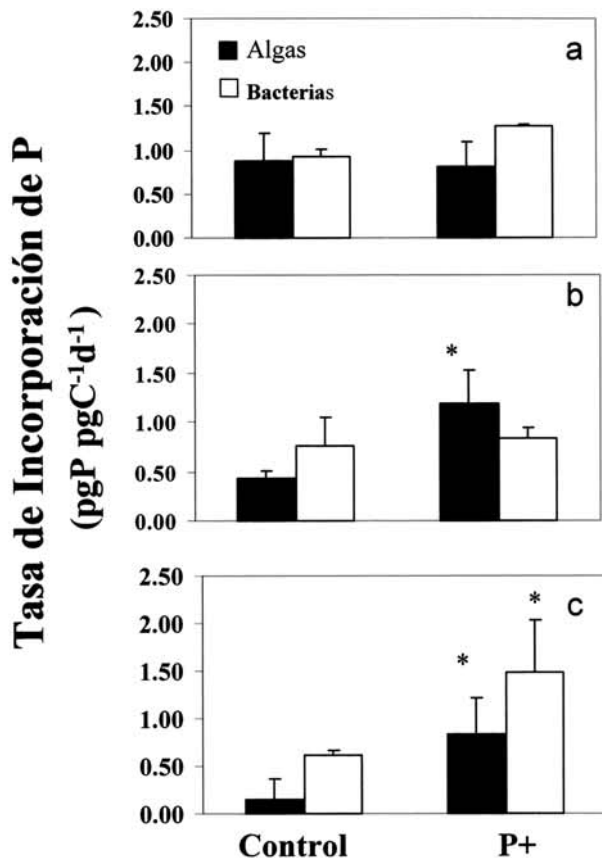


Figura 9. Abundancia de algas y bacterias en tratamientos no enriquecido (control) y enriquecidos en P durante el deshielo, mitad y final del periodo libre de hielo.  $\times 10$  significa que la abundancia algal debe ser multiplicada por 10.

Figure 9. Algal and bacterial abundance in unenriched (control) and enriched treatments during incubation period in the three in situ experiments. Error bars Mean  $\pm$  SD.  $\times 10$  means that algal abundance must be multiplied by 10.



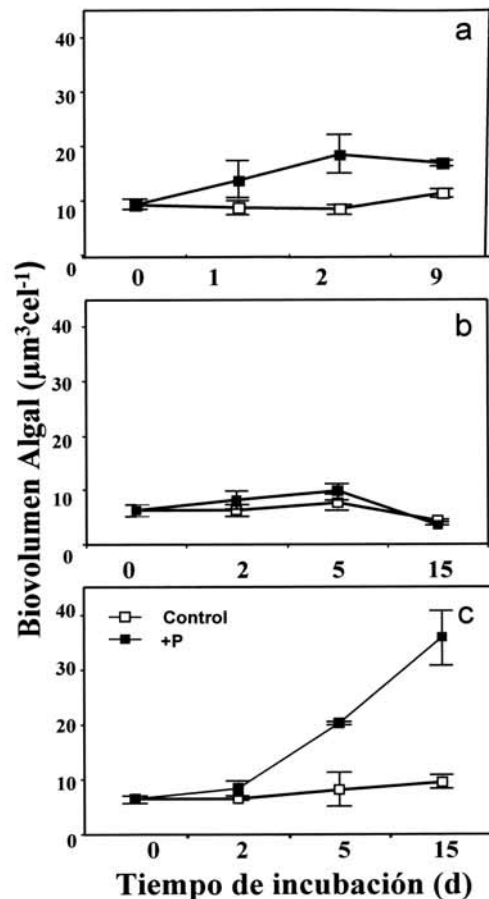
para crecer ( $N:P < 20-22$ ), siguiendo los criterios de deficiencia en P propuestos HEALEY & HENDZEL (1980); no obstante, las algas mostraron las más altas tasas de incorporación de nutrientes en condiciones no enriquecidas (tratamientos control) en relación con las obtenidos a mediados y finales del periodo libre de hielo, sin diferencias significativas después de la adición de P (Fig. 10). Esto sugiere un consumo máximo de nutrientes, lo que posiblemente sea responsable del mantenimiento de una N:P equilibrada a través de este experimento (CARRILLO *et al.* 2008b). Las algas aumentaron su tamaño celular y abundancia después de la adición de P, lo que es compatible con el crecimiento de comunidad fitoplanctónica.



**Figura 10.** Tasa de incorporación de fósforo de algas y bacterias en tratamientos no enriquecidos (control) y enriquecidos en fósforo en (a) el deshielo, (b) mitad y (c) final del periodo libre de hielo. Los puntos son valores medios  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns, no significativo.

**Figure 10.** Phytoplankton and bacterial P-incorporation rates in unenriched (control) and enriched treatments in thaw, mid and late ice-free period experiments in algae and bacteria. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant, Error bars Mean  $\pm$  SD.

ii) Estrategia de crecimiento masivo: Las algas en la mitad del periodo libre de hielo están limitadas en nutrientes ( $N:P > 30$ , HEALEY & HENDZEL 1980) y siguieron una estrategia de crecimiento en blooms, aumentando su abundancia pero no su biovolumen (Figs. 10 y 11). Esta estrategia es consecuente con: (i) el establecimiento de una razón alga N:P equilibrada ( $N:P \sim 16$ ); (ii) la disminución en la P-cell quota durante el tiempo de incubación como resultado de una alta tasa de división celular; (iii) las relaciones significativas encontradas entre las tasa de crecimiento y P-cell quota (positiva) ó razón N:P (negativa). Estos resultados están de acuerdo con las predicciones de la Hipótesis "Growth Rate" propuesta por ELSER *et al.* (1986), que propone que altas demandas de



**Figura 11.** Cambios en biovolumen de las células algales en tratamientos no enriquecidos (control) y enriquecidos en fósforo en el deshielo (a) en mitad (b) y al final del periodo libre de hielo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns, no significativo. Puntos representan valores medios  $\pm$  SD.

**Figure 11.** Variations in algal cell biovolume in unenriched (control) and enriched treatments during incubation period in the three in situ experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant Error bars Mean  $\pm$  SD.

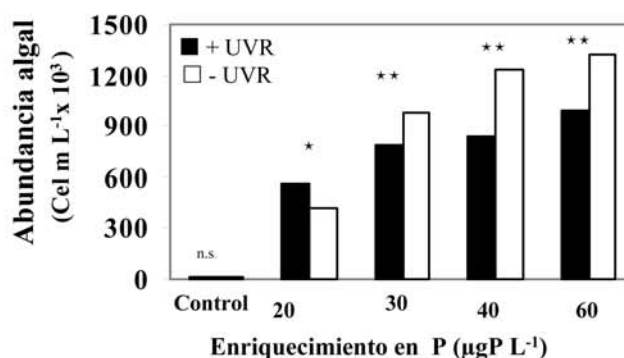
P para su asignación en RNA ribosómico en condiciones de rápido crecimiento conduce a variaciones en el contenido en P (y así en las razones C:P y N:P) de los organismos.

(iii) Estrategia de almacenamiento: Al final del periodo libre de hielo las algas tuvieron suficiente P para crecer y mostraron un leve incremento en su abundancia, pero un fuerte incremento en el biovolumen celular después de la adición de P (Figs. 10 y 11), coincidiendo con un aumento marcado en su contenido en P celular. Estos resultados son plausiblemente explicados por un consumo de lujo.

### ¿Cómo distintos factores abióticos, radiación ultravioleta y entrada de nutrientes, minerales influyen sobre las especies clave que condicionan el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos del Alta Montaña?

#### *Efectos de UVR y nutrientes sobre la biodiversidad y estructura de la comunidad algal*

El enriquecimiento con P ejerció un fuerte efecto estimulador sobre el desarrollo de la comunidad algal (abundancia, biomasa), más patente tras un desfase de 3 semanas desde que tuvo lugar el pulso experimental de nutrientes (Figs. 12 y 13). Este resultado evidencia la fuerte limitación por fósforo que experimentan las comunidades algales en este ecosistema y concuerda con estudios previos que muestran una ventaja competitiva del fitoplancton para capturar el P disponible de forma pulsada, tanto en condiciones naturales (tras entradas alóctonas de nutrientes, CARRILLO *et al.* 1990; VILLAR-ARGAIZ *et al.* 2001; MORALES-BAQUERO *et al.* 2006) como en condiciones experimentales sobre distintas escalas temporales de respuesta (escala corta [horas], VILLAR-ARGAIZ *et al.* 2002; escala media [días], CARRILLO *et al.* 2008a). El pulso de nutrientes aceleró e intensificó los cambios en la composición taxonómica de la comunidad algal, hacia la dominancia de los autótrofos estrictos (clorofíceas: *Dictyosphaerium chlorelloides*). Estos organismos tienen mayores tasas de crecimiento y desplazaron rápidamente a los mixótrofos que fueron dominantes en las condiciones iniciales del experimento (Fig. 13). Estos resultados son



**Figura 12.** Abundancia algal, en ambos tratamientos de luz (espectro de radiación solar completa; +UVR) y radiación fotosintéticamente activa (PAR; -UVR) en tratamientos no enriquecidos (control) y diferentes tratamientos con concentración creciente de P. Significación de t-test pareados entre tratamientos de luz para cada nivel de P: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns, no significativo. Barras representan valores medios para todo el período de experimentación.

**Figure 12.** Phytoplankton abundance measured under full sunlight (+UVR) and PAR (-UVR) light treatments in unenriched (control) and enriched treatments. Significance of paired t-test between light treatments for each phosphorus level: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant. Bars represent mean values for entire period.

congruentes con la tendencia extensamente observada de un desplazamiento de mixótrofos por autótrofos después de la entrada de nutrientes (ISAKSSON *et al.* 1999; ANDERSSON *et al.* 2006).

El efecto depresor generalizado de UVR sobre las variables estructurales (biomasa, abundancia y concentración de pigmentos fotosintéticos) (Fig.12) y, con menor intensidad, sobre las variables funcionales (producción primaria) del fitoplancton concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos (CALLIERI *et al.* 2001; CARRILLO *et al.* 2002) y muestra la sensibilidad de la comunidad fitoplanctónica a la radiación UV en el ecosistema. El carácter sinérgico encontrado de la interacción UVR x P indican que la sensibilidad de las algas a UVR se manifestaría con mayor intensidad a medida que se incrementa la disponibilidad de nutrientes (Fig. 12), sugiriendo que el estrés debido a la limitación de nutrientes puede debilitar o incluso enmascarar el estrés debido a UVR (BEHRENFELD *et al.* 1994; XENOPOULOS *et al.* 2002; CARRILLO *et al.* 2008a).

A pesar del significativo efecto dañino de UVR sobre variables estructurales, es importante su-

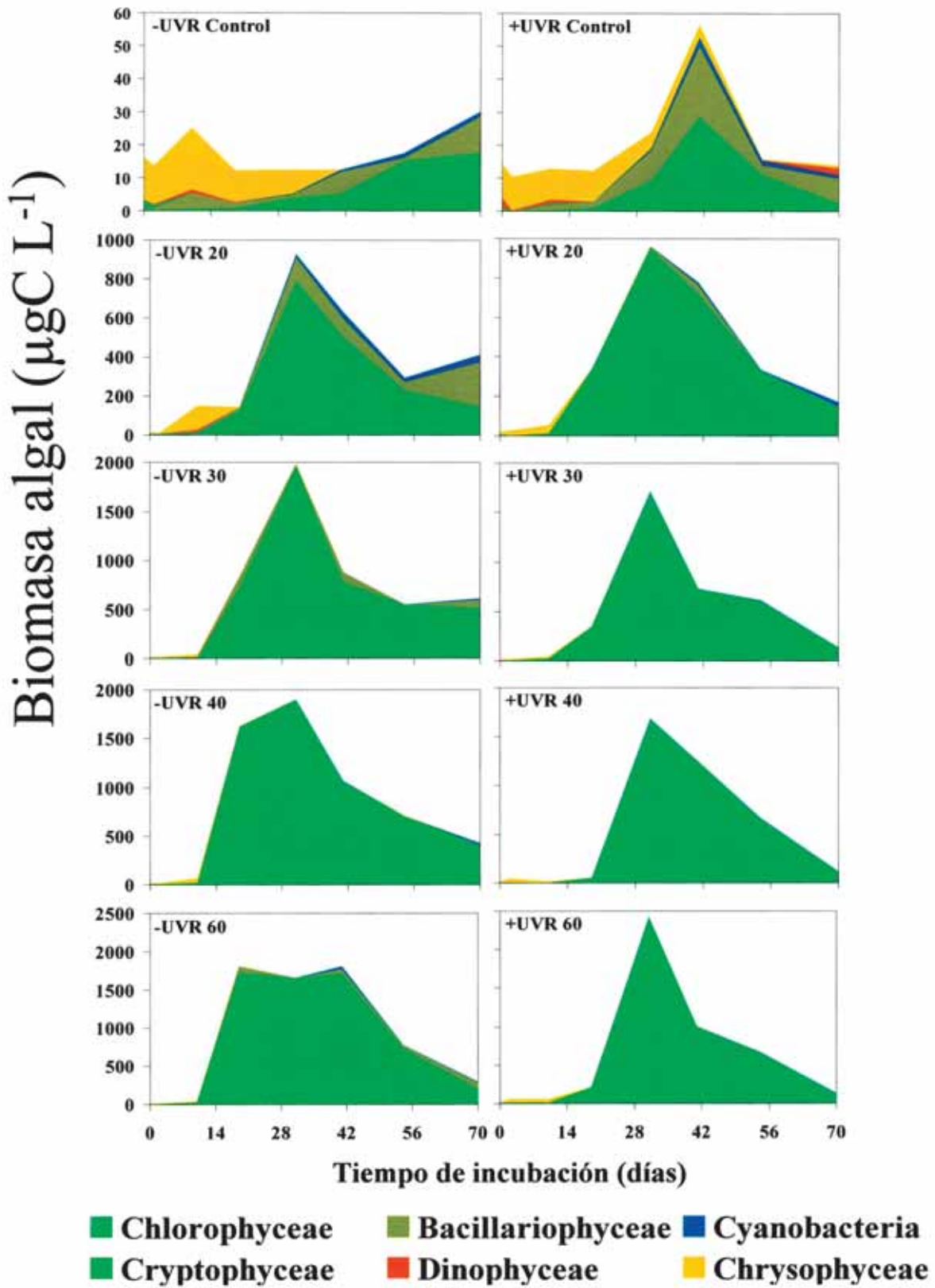
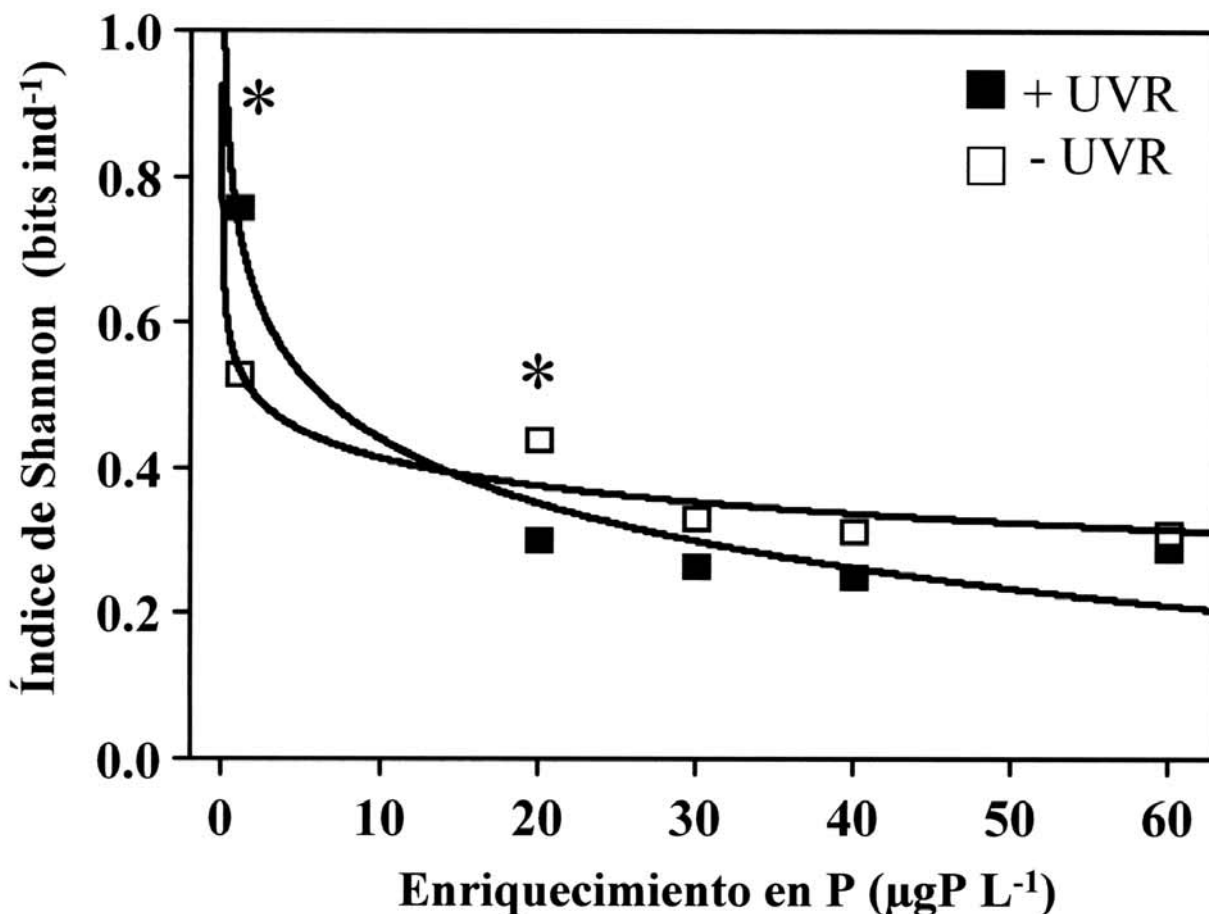


Figura 13. Cambios en la abundancia (células  $\text{mL}^{-1} \times 1.000$ ) de los diferentes grupos taxonómicos durante el período incubación en todos los tratamientos de nutrientes (control, 20, 30, 40 y 60- $\mu\text{g P L}^{-1}$ ) y luz (-UVR, +UVR).

Figure 13. Variations in abundance (cells  $\text{mL}^{-1} \times 1,000$ ) of different algal groups during the incubation period in all nutrients (control, 20, 30, 40 and 60- $\text{mg P L}^{-1}$  and light (-UVR, +UVR) treatments.

brayar que, bajo UVR y sin adición de nutrientes, se encontraron los mayores valores de diversidad algal sobre escalas temporales largas (Fig. 14, ver controles). La mayor diversidad resultó de una mayor riqueza específica debido a la persistencia de Chrysophyceae, al desarrollo de Bacillariophyceae (Fig. 13), y a un aumento de la equitatividad entre las especies que constituyen la comunidad de algal. Estos resultados contrastan con los efectos negativos ejercidos por UVR sobre la diversidad algal en lagos boreales (XENOPOULOS & FROST 2003) o la falta de respuesta encontrada en otros ecosistemas de alta montaña de los Alpes (HALAC *et al.* 1997). Sin embargo incrementos semejantes en la diversidad por efecto de la UVR fueron encontrados en comunidades de algas epi-

líticas intensamente expuestas a UVR (BOTHWELL *et al.* 1993). La ausencia de un patrón generalizado de respuesta de la diversidad algal a UVR, en los pocos estudios realizados hasta la fecha, puede radicar en las diferentes escalas temporales consideradas en estos estudios. Así, el efecto de UVR sobre la diversidad fue nulo (HALAC *et al.* 1997; VILLAFANE 2004; este estudio) o negativo (XENOPOULOS & FROST 2003) en incubaciones inferiores a dos semanas (<16 días), pero claramente estimulador en incubaciones que excedían el mes (CABRERA *et al.* 1997; BOTHWELL *et al.* 1993; este estudio). La persistencia de las especies de Chrysophyceae (ej. *Chromulina nevadensis*) bajo UVR, contrasta con otros resultados publicados (XENOPOULOS *et al.* 2000;



**Figura 14.** Índice de diversidad de Shannon-Wiener (bits ind<sup>-1</sup>) de la comunidad algal medida en todos los tratamientos de nutrientes (control, 20, 30, 40 y 60-µg P L<sup>-1</sup>) y luz (-UVR, +UVR) durante el período de incubación completo. Líneas: ajustes de modelos de regresión no lineales. Significación de t-test pareados entre tratamientos de luz para cada nivel de P: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

**Figure 14.** Shannon-Wiener diversity index (bits ind<sup>-1</sup>) of algal community measured in all nutrients (control, 20, 30, 40 and 60 µg P L<sup>-1</sup>) and light (-UVR, +UVR) treatments during full experimental periods. Regression lines of non-linear models (exponential) are inserted. Significance of paired t-test between light treatments for each phosphorus level: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ns, not significant.

XENOPOULOS & FROST 2003) y sugiere una mayor tolerancia de estas especies flageladas a altos flujos de UVR. Esta tolerancia podría estar relacionada con su capacidad mixotrófica (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2004, ver arriba) y la posesión de flagelos, que le permiten moverse verticalmente en la columna de agua y evitar intensidades altas de UVR (CARRILLO *et al.* 1991; LEECH & WILLIAMSON 2001). El desarrollo de diatomeas bajo UVR puede ser explicada por mecanismos estructurales y fisiológicos. Así, las especies con tamaños celulares grandes pueden ser menos susceptible al daño inducido por UVR ya que la distancia entre la superficie de la célula y el núcleo es mayor, y además se posibilita la posesión de un mayor contenido de pigmentos fotoprotectores intracelulares (KARENTZ *et al.* 1991; GARCÍA-PICHEL 1994). En resumen, la mayor diversidad y abundancia bajo UVR está de acuerdo con la propuesta de VINEBROOKE & LEAVITT (2005) que indica que organismos expuestos a UVR durante largos períodos (ej., en lagos de alta montaña) pueden tener una alta tolerancia a UVR. De hecho, nuestros resultados sugieren que las algas pueden tomar ventaja de esta adversidad (CARRILLO *et al.* 2002).

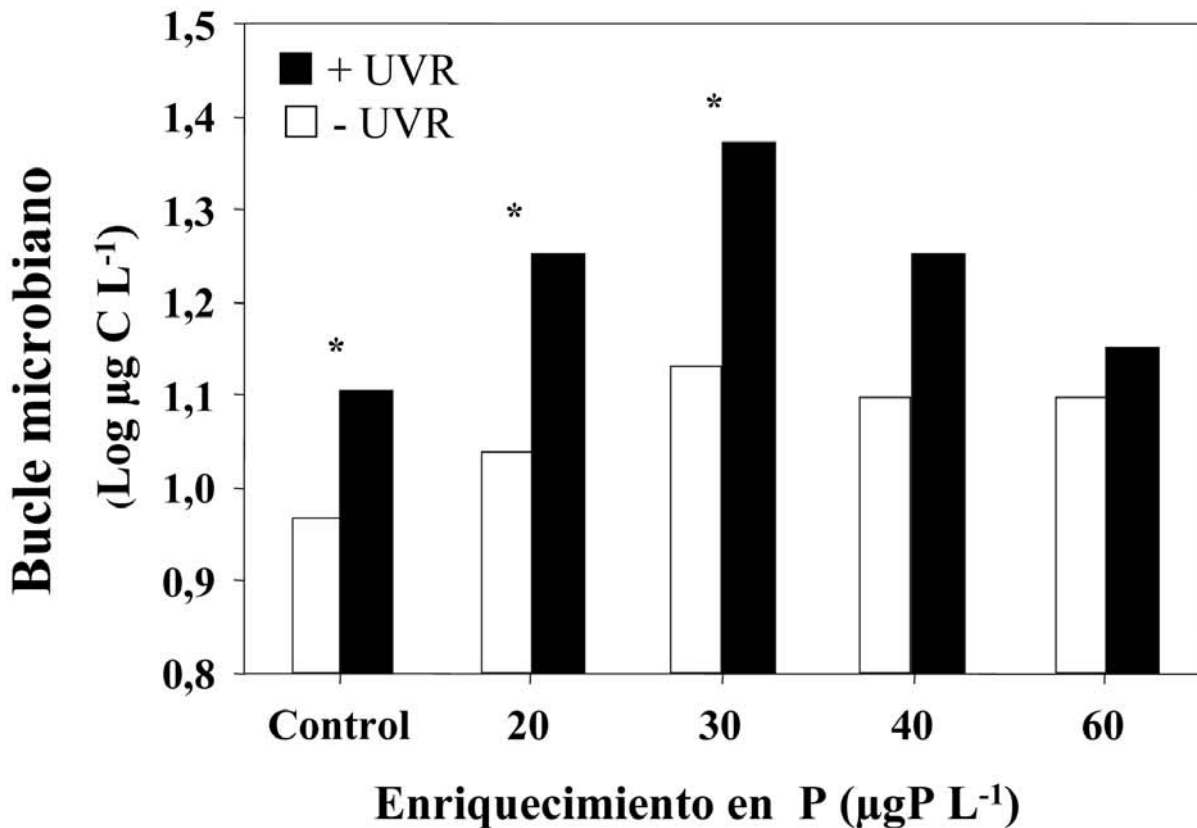
El efecto interactivo UVR x P sobre la diversidad y la uniformidad de la comunidad fitoplanctónica fue antagónico negativo (Fig. 14), ya que los pulsos de P favorecieron a una especie de crecimiento rápido tolerante a UVR (*D. chlorelloides*) y desaparecieron los flagelados y diatomeas. De todo lo anterior, se deduce que las condiciones de oligotrofia imperantes, junto con la sensibilidad de las algas a UVR, son factores que justifican y explican la presencia de los mixótrofos en el ecosistema, dada su ventaja adaptativa frente a la adversidad (oligotrofia y estrés de radiación) por su capacidad para obtener de sus presas nutrientes limitantes y carbono en condiciones de inhibición de la fotosíntesis y de la captura de nutrientes disueltos, a la vez que eliminan a sus presas como competidores (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2004 y sus referencias). Sin embargo, nuestros resultados evidencian que la entrada pulsada de nutrientes en altas concentraciones acelera la dinámica algal que tiende hacia el predominio de los autótrofos estrictos en densidades de hasta tres órdenes de magnitud superiores a las habituales del sistema. Por ello, la

tolerancia de las especies a UVR y a P están correlacionadas negativamente (es decir negativa co-tolerancia de especies *sensu* VINEBROOKE *et al.* 2004) debido a sus respectivos mecanismos compensatorios ("trade-offs") de tolerancia a UVR y capacidad competitiva por nutrientes. Por lo tanto, la interacción sinérgica entre UVR y P sobre una comunidad sensible al estrés inducido por UVR representa el peor escenario de pérdida de especies claves propuesto por VINEBROOKE *et al.* (2004)

#### *Efecto interactivo UVR x nutrientes sobre el bucle microbiano*

La UVR y enriquecimiento en P actuaron sinérgicamente estimulando la biomasa del bucle microbiano heterotrófico, aunque este efecto solo tuvo lugar sobre una escala temporal media (<20 días) y la comunidad microbiana heterotrófica se redujo tras el agotamiento del pulso (Fig. 15). Sorprendentemente, este efecto interactivo sinérgico no se observó sobre la abundancia y biomasa bacteriana pero sí sobre la producción bacteriana (PB). El efecto estimulador que UVR y P ejerció sobre la PB podría estar relacionada con un incremento en la tolerancia a UVR en condiciones de no limitación de C (mediada por UVR, CARRILLO *et al.* 2002) y con la ausencia de limitación por P tras un pulso del mismo (VILLAR-ARGAIZ *et al.* 2002). La tolerancia de las bacterias está relacionada con los mecanismos de fotorreparación. El bajo coste energético de estos mecanismos (WEINBAUER *et al.* 1997) los hace particularmente eficientes en ecosistemas oligotróficos que usualmente reciben altos flujos de UVR (DAVIDSON & VAN DER HEIJDEN 2000), y constituyen una explicación del elevado grado de adaptación de las bacterias del lago de La Caldera a UVR (CARRILLO *et al.* 2002; MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2002; 2006).

Sorprendentemente, el efecto interactivo sinérgico UVR x P observado sobre la PB no se transfirió a la abundancia bacteriana. La falta de relación que generalmente se estableció entre producción y biomasa bacterianas sugiere una regulación de la PB por depredación (BILLEN *et al.* 1990). De hecho, el efecto interactivo UVR x P sobre la PB se transmitió como sendos efectos sinérgicos positivos UVR x P sobre las abundancias de ciliados y de virus, sus depredadores en este



**Figura 15.** Abundancia media de los organismos que componen el bucle microbiano (virus, bacterias y ciliados), en ambos tratamientos de luz (espectro de radiación solar completa; +UVR) y radiación fotosintéticamente activa (PAR; -UVR) en tratamientos no enriquecidos (control) y diferentes tratamientos con concentración creciente de P. Significación de t-test pareados entre tratamientos de luz para cada nivel de P: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns, no significativo. Barras representan valores medios durante el período de disponibilidad de fósforo tras el pulso.

**Figure 15.** Microbial loop (virus, bacteria and ciliates) measured under full sunlight (+UVR) and PAR (-UVR) light treatments in un-enriched (control) and enriched treatments. Significance of paired t-test between light treatments for each phosphorus level: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns, not significant. Bars represent mean values for P-availability period.

ecosistema, ya que los nanoflagelados heterotróficos (HNF) no se desarrollaron durante el experimento, de acuerdo con su escasa representación interanual en este ecosistema (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2004). Los valores promedio de la PB se relacionaron logarítmicamente con la biomasa conjunta de virus y de ciliados (biomasa de consumidores bacterianos =  $7,59 \text{ Log (PB)} + 8,34$ ,  $R^2 = 0,88$   $p < 0,05$ , DELGADO-MOLINA 2009). Distintos estudios evidencian que en ecosistemas estresados la bacterivoría es el principal factor que impide el aumento de abundancia bacteriana tras un estímulo de PB bajo UVR (GUSTAVSON *et al.* 2000) o tras pulsos de nutrientes (DUARTE *et al.* 2005; MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2006).

A raíz de esta información, podemos afirmar que la lisis viral y bacterivoría por ciliados impidió que el

efecto interactivo sinérgico UVR  $\times$  P observado sobre la función de la comunidad bacteriana se transmitiera a su estructura. A pesar de que el efecto interactivo UVR  $\times$  P fue de naturaleza sinérgica negativa sobre la comunidad algal y sinérgica positiva sobre la PB y la estructura del bucle microbiano, las algas dominaron, particularmente tras la aplicación de los pulsos de nutrientes.

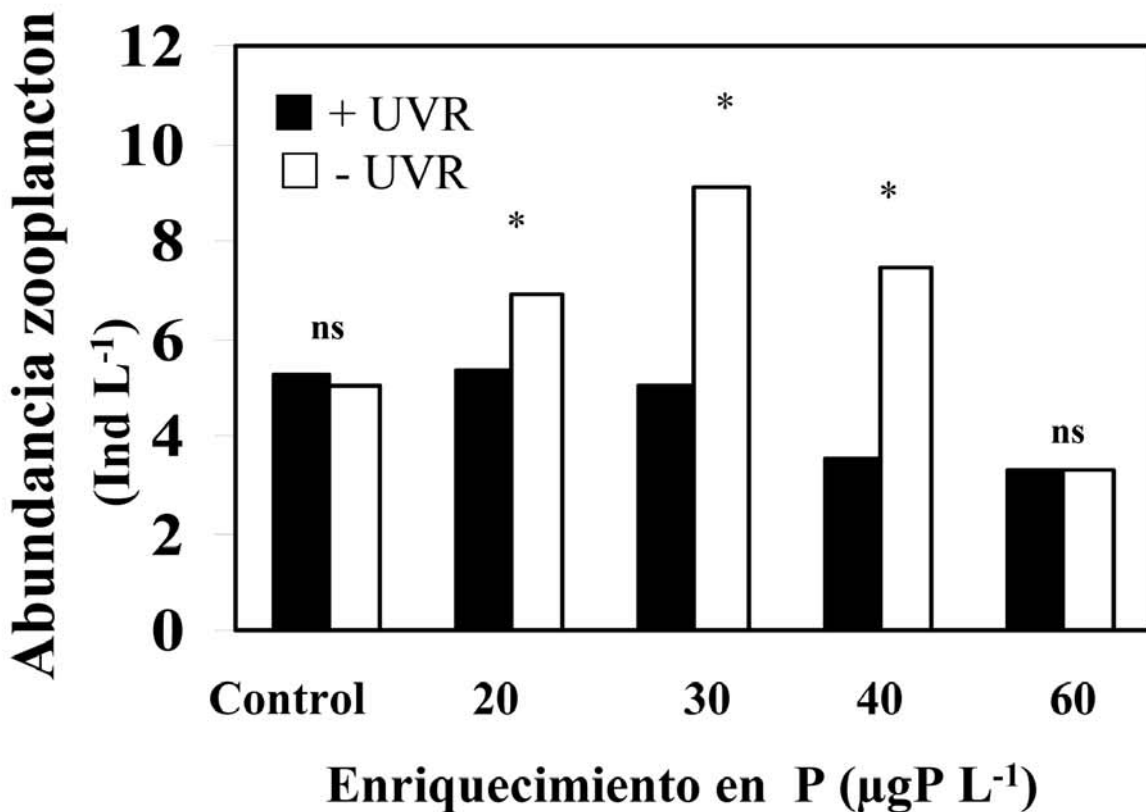
#### *Efectos interactivos UVR x nutrientes sobre la interfase productor-consumidor*

El fuerte incremento en el desarrollo de la comunidad fitoplanctónica (Fig. 12) que tuvo lugar tras la adición nutrientes no se tradujo en un aumento de la biomasa de herbívoros (ver abundancia y biomasa de zooplancton en + UVR en Fig. 16). Sin embargo, en condiciones en las que se supri-

mió la UVR, el zooplancton incremento su crecimiento pero sólo en niveles intermedios de adición de nutrientes, lo que sugiere que el zooplancton se puede beneficiar de incrementos moderados de biomasa de fitoplancton cuando los efectos perjudiciales de UVR son excluidos. Por lo tanto, UVR restringió el crecimiento del zooplancton, y nuestros resultados sugieren que este efecto fue directo, debido (i) a la ausencia de una relación directa entre la biomasa de zooplancton y fitoplancton en ambas calidades de luz, lo que indica que el zooplancton no estuvo limitado por la cantidad de alimento; (ii) al efecto beneficioso de UVR mejorando "aparentemente" la calidad de alimento para el zooplancton (disminuyendo la razón C:P sestónica), y que no se transfirió como un mayor crecimiento del zooplancton. Estos resultados están de acuerdo con

aquellos que muestran una escasa o nula respuesta de copépodos calanoides (*Diaptomus* sp.) frente a enriquecimientos en P y bajas razones C:P sestónicas en relación con la respuesta de cladóceros (*Diaphanosoma* y *Daphnia*) (URABE *et al.* 2002).

Los efectos deletéreos de UVR sobre *M. lacinitatus* (copépodo calanoide) no eran esperados debido a su capacidad para migrar en la columna de agua y a su contenido en fotoprotectores (carotenos). Sin embargo, UVR no ejerció un efecto perjudicial neto sobre el zooplancton en tratamientos que recibieron las mayores concentraciones de nutrientes ( $60 \mu\text{gP L}^{-1}$ ) (Fig. 16). Por tanto, intensas entradas de nutrientes (que representan el doble de los valores medios de nutrientes que recibe el sistema) llevan a un fuerte



**Figura 16.** Abundancia del zooplancton, en ambos tratamientos de luz (espectro de radiación solar completa; +UVR) y radiación fotosintéticamente activa (PAR; -UVR) en tratamientos no enriquecidos (control) y tratamientos enriquecidos. Significación de t-test pareados entre tratamientos de luz para cada nivel de P: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns, no significativo. Barras representan valores medios para todo el período de experimentación.

**Figure 16.** Zooplankton abundance measured under full sunlight (+UVR) and PAR (-UVR) light treatments in unenriched (control) and enriched treatments. Significance of paired t-test between light treatments for each phosphorus level: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant. Bars represent mean values for entire period.

desacople entre productores y herbívoros primarios. Este proceso es un fenómeno general en la naturaleza y se reconoce extensamente como la "paradoja de enriquecimiento" (ROSENZWEIG, 1971). Así, la adición de altos pulsos de nutrientes a ecosistemas oligotróficos hace que se exceda la capacidad de los consumidores para "manejar" la abundancia de algas, impidiendo el crecimiento de los herbívoros, decreciendo la eficiencia en la transferencia de energía entre ambos niveles tróficos y llevando al ecosistema a la inestabilidad. Además, la disminución en la abundancia de zooplancton en el tratamiento  $60 \mu\text{gPL}^{-1}$  cuando UVR es suprimido (PAR; Fig. 16) indica que el alimento en exceso ejerce una interferencia mecánica durante el proceso de consumo de los herbívoros.

Es importante, sin embargo, reconocer que la selección natural juega un papel crucial determinando qué organismos habitan estos ecosistemas de alta montaña. Nuestros experimentos evidencian que los copépodos calanoides pueden explotar y beneficiarse de entradas moderadas de nutrientes al sistema; indudablemente en presencia de otras especies como *Daphnia*, con una mayor capacidad filtradora, habría tenido como resultado un mejor acople y una mayor eficiencia en la transferencia energética. De hecho, estudios previos en el lago de La Caldera han mostrado que *Daphnia* se desarrolló después de entradas naturales de nutrientes de origen atmosférico (CARRILLO *et al.* 1995; VILLAR-ARGAIZ *et al.* 2001).

## CONCLUSION

Aunque tradicionalmente la UVR ha sido considerada un factor dañino para los organismos (*ver revisión Häder et al.* 2007) las comunidades planctónicas de los lagos de Sierra Nevada expuestas experimentalmente a UVR fueron más diversas. Este resultado indica que las comunidades planctónicas están altamente aclimatadas a UVR y a la extrema oligotrofia característica de estos ecosistemas, ya que han desarrollado numerosas estrategias de metabólicas, fisiológicas y bioquímicas para soportar esta adversidad. Nuestros resultados muestran que la entrada de P vía atmosférica genera una pérdida de diversidad y, por lo tanto, la entrada de P, más que su escasez, actúa como

un factor estrés en ecosistemas crónicamente limitados por nutrientes minerales.

El efecto sinérgico negativo entre UVR y P sobre la comunidad algal y el descenso en la diversidad después de un intenso pulso de P indica una correlación negativa entre la tolerancia de las especies a UVR y su tolerancia a la entrada de nutrientes alóctonos. Consecuentemente, si las algas flageladas con metabolismo mixotrófico predominan en los lagos de Sierra Nevada como resultado de su aclimatación a severas condiciones de limitación por nutrientes y estrés por UVR (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* 2004), el incremento en la frecuencia e intensidad de las entradas de nutrientes inorgánicos a través del transporte de aerosoles de polvo sahariano, asociado con anomalías de la oscilación del Atlántico Norte (NAO) y el cambio global (WOODWARD *et al.* 2005, ESCUDERO *et al.* 2005), puede conducir a la desaparición de este grupo funcional clave. La pérdida de algas mixótrofas que constituyen un cortocircuito en el flujo de carbono entre el bucle microbiano y la cadena de pastoreo puede afectar el funcionamiento del ecosistema (Fig. 17). Este efecto será exacerbado en los lagos de alta montaña donde los mixótrofos son más del 50% de la comunidad planctónica.

El empobrecimiento biológico asociado a la pérdida de estas especies clave podría reducir la resiliencia del ecosistema a perturbaciones producidas por una mayor frecuencia de aerosoles (mayor carga de P desde las áreas de desierto). Finalmente la pérdida de mixótrofos, que son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), reduce la calidad de alimento disponible para los herbívoros disminuyendo la eficiencia en la transferencia energética en los ecosistemas de alta montaña de Sierra Nevada.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias a la colaboración del Parque Nacional de Sierra Nevada. Especialmente queremos destacar el apoyo de José Pino, Sub-Director del Parque Nacional, por facilitar la realización de los experimentos de mesocosmos en la laguna de La Caldera.



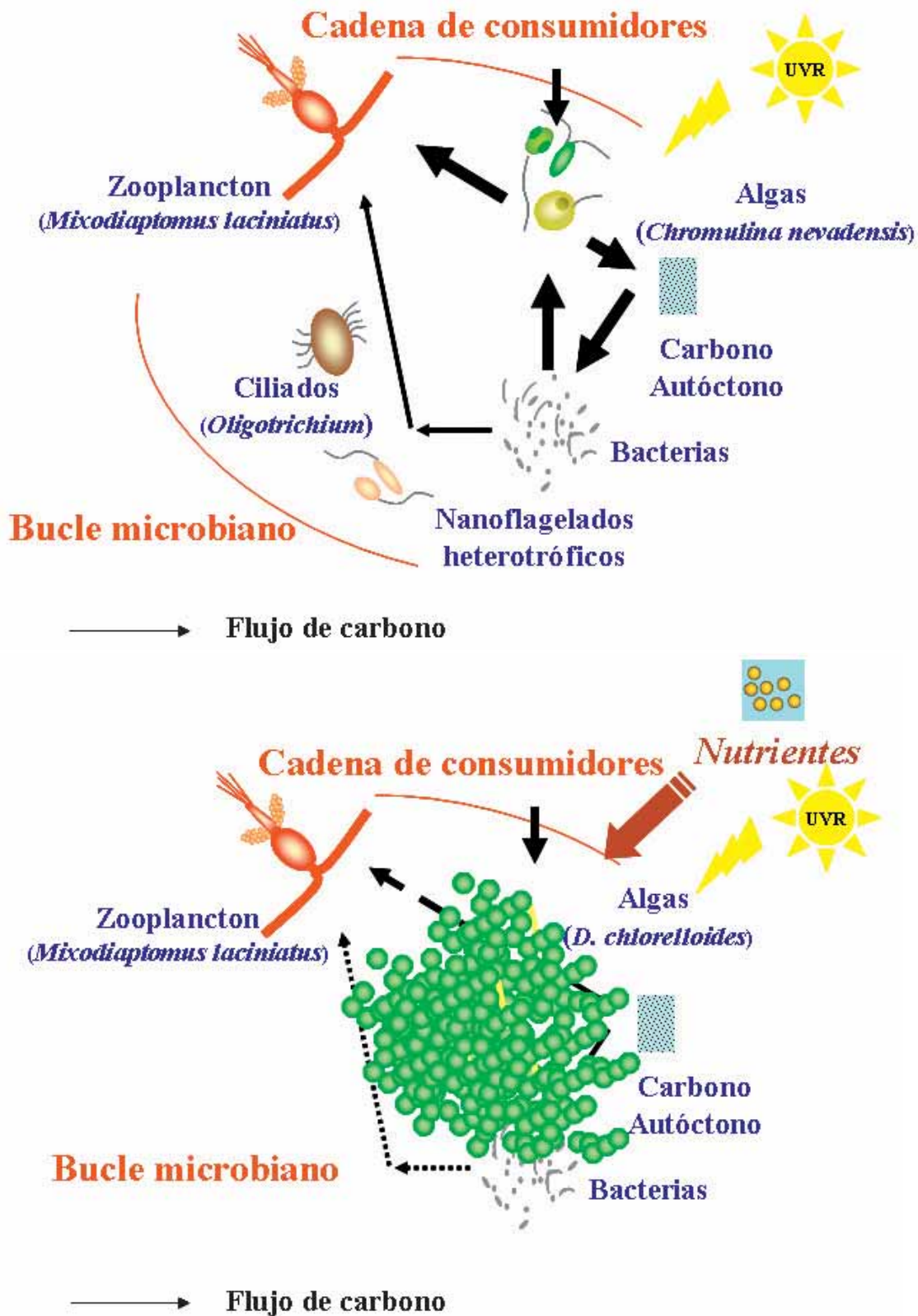


Figura 17. (a) Modelo de estructura y flujo de carbono de la red trófica de lagos de alta montaña. El grosor de las flechas indica la importancia relativa del flujo del carbono. Modificada de MEDINA-SÁNCHEZ *et al.* (2004). (b) Cambios en la estructura de la red trófica y flujo de Carbono tras la entrada pulsada de nutriente minerales.

Figure 17. (a) Model of structure and carbon flux of the food web in high mountain lakes. Thickness of arrows indicates the relative importance of C flux. (b) Alterations in the structure and carbon flux of food web after mineral nutrient inputs.

Agradecemos a José Luis, Isacio, Conrado, Felipe, Ángeles y demás técnicos del Parque su inestimable ayuda en el trabajo de campo. Este proyecto fue financiado por el Organismo Autónomo de Parques Nacionales (Ministerio de Medio Ambiente (PN2003/25), Ministerio de Educación y Ciencia (GL2005/01564/BOS),

Ciencia e Innovación (CGL2008-01127/BOS) y la Consejería de Ciencia e Innovación de la Junta de Andalucía (Excelencia P07-CVI-02598). José Antonio Delgado-Molina y Francisco José Bullejos obtuvieron sendas becas del Plan de Formación del Personal Universitario (Ministerio de Educación y Ciencia).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edition. American Public Health Association, Washington, USA.
- ANDERSSON, A., SAMUELSSON, K., HAECKY, P. & ALBERTSSON, J. 2006 Changes in the pelagic microbial food web due to artificial eutrophication. *Aquat. Ecol.*, 40: 299-313.
- BERGERON, M. & VINCENT, W. F. 1997. Microbial food web response to phosphorus supply and UV radiation in a subarctic lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 12: 239-249.
- BERMAN-FRANK, I. & DUBINSKY, Z. 1999. Balanced growth in aquatic plants: myth or reality? *Bio-science* 49: 29-37.
- BILLEN, G., SERVAIS, P. & BECQUEVORT, S. 1990. Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control? *Hydrobiologia* 207: 37-42.
- BLANCK H. 2002. A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. *Human Ecology and Risk Assessment*, 8: 1003-1034.
- BOELEN, P., VELDHUIS, M.J.W. & BUMA, A.G.J. 2001. Accumulation and removal of UVBR-induced DNA damage in marine tropical plankton subjected to mixed and simulated non-mixed conditions. *Aquat. Microb. Ecol.*, 24: 265-274.
- BOTHWELL, M. L., SHERBOT, D., ROBERGE, A. C & DALEY R. J. 1993. Influence of natural ultraviolet-radiation on lotic periphytic diatom community growth, biomass accrual, and species composition - short-term versus long-term effects. *J. Phycol.*: 29, 24-35.
- BREITBURG, D. L., SANDERS, J. G., GILMOUR, C. C., HATFIELD, C. A., OSMAN, R. W., RIEDEL, G. F., SEITZINGER, S. B. & SELLNER, K. G. 1999. Variability in response to nutrients and trace elements, and transmission of stressor effects through an estuarine food web. *Limnol. & Oceanogr.*, 44: 837-863.
- BULLEJOS, F. J., VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., DELGADO-MOLINA, J. A. & CARRILLO, P. 2008. Impacts of UV radiation and nutrients on the elemental composition of zooplankton in a Mediterranean high mountain lake. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 30 (4): 623-626.
- BUMA, A.G.J., ENGELEN, A.H. & GIESKES, W.W.C. 1997. Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 153:91-97.
- CABRERA, S., LÓPEZ, M. & TARTAROTTI, B. 1997. Phytoplankton and zooplankton response to ultraviolet radiation in a high-altitude Andean lake: short- versus long-term effects. *J. Plankton Res.*, 19: 1565-82.
- CALLIERI, C., MORABITO, G., HUOT, Y. NEALE P. J. & LITCHMAN E. 2001. Photosynthetic response of pico- and nanoplanktonic algae to UVB, UVA and PAR in a high mountain lake. *Aquat. Sci.*, 63:286-293.
- 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(1-2):189-204.

- CARRILLO, P., SÁNCHEZ-CASTILLO, P. & CRUZ-PIZARRO, L. 1991. Coincident zooplankton and phytoplankton diel migration in an oligotrophic mountain lake (La Caldera, Sierra Nevada, Spain). *Arch. Hydrobiol.*, 122: 57-67.
- CARRILLO, P., CRUZ-PIZARRO, L. & SÁNCHEZ-CASTILLO, P. 1990. Analysis of phytoplankton-zooplankton relationships in an oligotrophic lake under natural and manipulated conditions. *Hydrobiologia* 200/201:49-58.
- CARRILLO, P., DELGADO-MOLINA, J. A., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., BULLEJOS, F. J. & VILLAR-ARGAIZ, M. 2008a. Phosphorus inputs unmask negative effects of ultraviolet radiation on algae in a high mountain lake. *Global Change Biol.*, 14: 423-39.
- CARRILLO, P., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M. & VILLAR-ARGAIZ, M. 2002. The interaction of phytoplankton and bacteria in a high mountain lake: Importance of the spectral composition of solar radiation. *Limnol., Oceanogr.*, 47: 1294-1306.
- CARRILLO, P., RECHE, I., SÁNCHEZ-CASTILLO, P. & CRUZ-PIZARRO, L. 1995. Direct and indirect effects of grazing on the phytoplankton seasonal succession in an oligotrophic lake. *J. Plankton Res.*, 17 (6): 1363-1379.
- CARRILLO, P., VILLAR-ARGAIZ, M. & MEDINA-SÁNCHEZ, J. M. 2008b. Does microorganism stoichiometry predict microbial food web interactions after a phosphorus pulse? *Microb. Ecol.*, 56: 350-363.
- CHAPIN III, F. S., *et al.* 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405: 234-242.
- CHRISTENSEN, M. R., GRAHAM, M. D., VINEBROOKE, R. D., FINDLAY, D. L., PATERSON, M. J. & TURNER, M. A. 2006. Multiple anthropogenic stressors cause ecological surprises in boreal lakes. *Global Change Biol.*, 12: 2316-22.
- CRAIN, C. M., KROEKER, K. & HALPERN, B. S. 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.*, 11: 1304-1315.
- CRUZ-PIZARRO, L., CONDE-PORCUNA, J. M. & CARRILLO, P. 1998. Diel variation in the egg ratio of *Hexarthra bulgarica* in the high mountain lake La Caldera (Spain). *Hydrobiologia*, 387/388: 295-300.
- DAVIDSON, A.T. & VAN DER HEIJDEN, A. 2000. Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on bacterioplankton. *Aquat Microb. Ecol.*, 21:257-264.
- DELGADO-MOLINA, J. A., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M. VILLAR-ARGAIZ, M., BULLEJOS, F. J. & CARRILLO, P. 2009. Induced algal community changes by UV radiation and nutrient inputs: A long-term experimental study in Lake La Caldera (Sierra Nevada, Spain): *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 30 (6): 919-922.
- DELGADO-MOLINA, J. A., CARRILLO, P., MEDINA-SANCHEZ, 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(6):619-634.
- DÍAZ, S. & CABIDO, M. 2001. Vive la difference: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends Ecol Evol* ,16:646-655
- DÖHLER, G. 1997. Effect of UVB radiation on utilization of inorganic nitrogen by Antarctic microalgae. *Photochem. Photobiol.*, 66: 831-836
- DUARTE, C. M., DACHS, J., LLABRES, M., ONSO-LAITA, P., GASOL, J. M., TOVAR-SÁNCHEZ, A., SANUDO-WILHEMY, S. & AGUSTÍ S. 2006. Aerosol inputs enhance new production in the subtropical northeast Atlantic. *Geophys. Res-Diogeosa*, 111, G04006 (doi:10.1029/2005 JG000140).
- DUARTE, C. M., AGUSTÍ, S., VAQUE, D., AGAWIN, N. S. R., FELIPE, J., CASAMAYOR, EMILIO & O. GASOL, M. 2005. Experimental test of bacteria-phytoplankton coupling in the Southern Ocean. *Limnol. & Oceanogr.* 50(6): 1844-1854.
- ELSER, J. J., DOBBERFUHL, D. R., MACKAY, N. A. AND SCHAMPEL, J. H. 1996. Organism size, life history and N:P stoichiometry. *BioScience*, 46: 674-684.
- ELTON, C. 1927. *Animal Ecology*. Sidgwick and Jackson, Ltd., London.

- ESCUADERO, M., CASTILLO, S., QUEROL, X., AVILA, 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.-Atmosphere*, 110, D18S08 (doi: 10.1029/2004JD004731).
- FIGUEROA, F. L., CARRILLO, P., KORBEE, N., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., MATA, M., BONOMI, J. & SÁNCHEZ-CASTILLO, P. M. 2009. The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain). *J. Limnol.* (In press).
- FIGUEROA, F. L., SALLES, S., AGUILERA, J., JIMÉNEZ, C., MERCADO, J., VIÑEGLA, B., FLORES-MOYA, A. & ALTAMIRANO, M. 1997. Effects of solar irradiance on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 151: 81-90.
- FOLIN, O. & CIOCALTEU, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 12: 239-243.
- FOLT, C. L., CHEN, C. Y., MOORE, M. V. & BURNAFORD, J. 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. & Oceanogr.*, 44: 864-77.
- GARCÍA-PICHEL, F. 1994. A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. & Oceanogr.*, 39: 1704-17.
- GUNDERSON, L. H. 2000. Ecological resilience - in theory and application. *Annu Rev Ecol Syst.*, 31: 425-439.
- GUSTAVSON, K., GARDE, K., WÄNGBERG, S. Å. & SELMER, J. S. 2000. Influence of UV-B radiation on bacterial activity in coastal waters. *J. Plankton Res.*, 22: 1501-1511.
- HÄDER, D. P., KUMAR, H. D., SMITH, R. C. & WORREST, R. C. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6: 267-85.
- HALAC, S., FELIP, M.S., CAMARERO, L., SOMMARUGA-WOGRATH, S., PSENNER, R., CATALÁN, J. & SOMMARUGA, R. 1997. An in situ enclosure experiment to test the solar UVB impact on plankton in a high-altitude mountain lake. I. Lack of effect on phytoplankton species composition and growth. *J. Plankton Res.*, 19: 1671-86.
- HEALEY, F. P. & HENDZEL, L.L. 1980. Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 37: 442-453.
- HELBLING, E. W. & ZAGARESE, H. 2003. (eds.) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK, pp. 329-56.
- HESSEN, D. O., VAN DONK, E., ANDERSEN, T. 1995. Growth responses, P-uptake and loss of flagella in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to UV-B. *J. Plankton Res.*, 17:17-27.
- HOLT, R. D. 1995. Linking species and ecosystems: where's Darwin? In: *Linking Species & Ecosystems* (eds. Jones C. G. & Lawton J. H.), pp. 273-279. Chapman & Hall, New York.
- ISAKSSON, A., BERGSTROM, A. K., BLOMQUIST, P. & JANSSON, M. 1999. Bacterial grazing by phagotrophic phytoflagellates in a deep humic lake in northern Sweden. *J. Plankton Res.*, 21: 247-68.
- KARENTZ, S., CLEAVER, J. E. & MITCHELL, D. L. 1991. DNA damage in the Antarctic. *Nature*, 350, 28.
- KINZIE, R. A. III; BANASZAK, A. T. & LESSER, M. P. 1998. Effects of ultraviolet radiation on primary productivity in a high altitude tropical lake. *Hydrobiologia* 385:23-32.
- KNEITEL, J. M. & CHASE, J. M. 2004. Trade-offs in community ecology: linking spatial scales and species coexistence. *Ecol. Lett.*, 7: 69-80.
- KORBEE, N., CARRILLO, P., MATA, M. T., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M. & FIGUEROA, F. Potential mechanisms governing non-additive ecological effects of UVR and nutrients on phytoplankton in a high mountain lake. *J. Phycol.* (submitted).
- KORBEE, N., DÍAZ, R. T. A., FIGUEROA, F. L. & HELBLING, E. W. 2004. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J. Phycol.*, 40: 248-59.
- LAURION, I., LAMI, A. & SOMMARUGA, R. 2002. Distribution of mycosporine-like amino acids and photoprotective carotenoids among freshwater phytoplankton assemblages. *Aquat. Microb. Ecol.*, 26: 283-294-

- LEECH, D. M. & WILLIAMSON, C. E. 2001. In situ exposure to ultraviolet radiation alters the depth distribution of *Daphnia*. *Limnol. & Oceanogr.*, 46: 416-420.
- LITCHMAN, E., NEALE, P. J. & BANASZAK, A. T. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnol. & Oceanogr.*, 47: 86-94.
- MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., VILLAR-ARGAIZ, M., & CARRILLO, P. (2002) Modulation of the bacterial response to spectral solar radiation by algae and limiting nutrients. *Freshwater Biol.*, 47:2191-2204.
- MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., VILLAR-ARGAIZ, M. & CARRILLO, P. 2006. Solar radiation-nutrient interaction enhances the algae-bacteria link in a high- mountain lake. *Limnol. & Oceanogr.*, 51: 913-924.
- MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., VILLAR-ARGAIZ, M. & CARRILLO, P. 2002. Modulation of the bacterial response to spectral solar radiation by algae and limiting nutrients. *Freshwater Biol.*, 47: 2191-2204.
- MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., VILLAR-ARGAIZ, M. & CARRILLO, P. 2004. Neither with nor without you: A complex algal control on bacterioplankton in a high mountain lake. *Limnol. & Oceanogr.*, 49: 1722-33.
- MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., VILLAR-ARGAIZ, M., SÁNCHEZ-CASTILLO, P., CRUZ-PIZARRO, L. & CARRILLO, P. 1999. Structure changes in a planktonic food web: biotic and abiotic controls. *J. Limnol.*, 58: 213-22.
- MELIÁN, C. J. & BASCOMPTE, J. (2002). Complex networks: two ways to be robust? *Ecol. Lett.*, 5:705-708.
- MICHENER, W. K., BAERWALD, T. J., FIRTH, P., PALMER, M. A., ROSENBERGER, J. L., SANDLIN, E. A. & ZIMMERMAN, H. (2001). Defining and unraveling biocomplexity. *BioScience*, 51: 1018-1023.
- MORALES-BAQUERO, R., PULIDO-VILLENA, E. & RECHE, I. 2006. Atmospheric inputs of phosphorus and nitrogen to the southwest Mediterranean region: Biogeochemical responses of high mountain lakes. *Limnol. & Oceanogr.*, 51: 830-37.
- MÜLLER-NAVARRA, D. C., BRETT, M. T., LISTON, A. M. & GOLDMAN, C. R. 2000. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature*, 403: 74-77.
- PETCHEY, O. L., DOWNING, A. L., MITTELBACH, G. G. *et al.* 2004. Species loss and the structure and functioning of multitrophic aquatic systems. *Oikos*, 104: 467-478.
- PIMM, S. L., LAWTON, J. H. & COHEN, J. E. 1991. Food web patterns and their consequences. *Nature*, 350: 669-674.
- RAFFAELI, D. 2004. How extinction patterns affect ecosystems. *Science*, 306, 1141-1142.
- ROSENZWEIG, M. (1971) The Paradox of Enrichment. *Science*, 171: 385-387.
- ROY, S. 2000. Strategies for the minimisation of UV-induced damage. In: de Mora S, Demers S, Vernet M (eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, Cambridge, p 177-205.
- SANDERS, R. W. 1991. Mixotrophic Protists In Marine And Fresh-Water Ecosystems. *J. Protozool.*, 38: 76-81.
- SANDERS, R. W., BERNINGER, U. G., LIM, E. L., KEMP, P. F. & CARON, D. A. 2000. Heterotrophic and mixotrophic nanoplankton predation on picoplankton in the Sargasso Sea and on Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 192: 103-118.
- SHERR, E. B. & SHERR, B. F. 2002. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Anton Leeuw Int. J. G* 81: 293-308.
- STATSOFT, INC. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- STERNER, R. W. & ELSER, J. J. 2002. *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, Princeton, N.J.

- URABE, J., KYLE, M., MAKINO, W. YOSHIDA, T., ANDERSEN, T. & ELSER, J. J. 2002. Reduced light increases herbivore production due to stoichiometric effects of light/nutrient balance. *Ecology*, 83: 619–27.
- VILLAFAÑE, V. E. 2004. Ultraviolet radiation and primary productivity in temperate aquatic environments of Patagonia (Argentina). Ph.D. dissertation, Groningen. 134 pp.
- VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M. & CARRILLO, P. 2002. Microbial plankton response to contrasting climatic conditions: insights from community structure, productivity and fraction stoichiometry. *Aquat. Microb. Ecol.*, 29: 253-66.
- VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., BULLEJOS, F. J., DELGADO-MOLINA, J. A. & CARRILLO, P. 2008. Is biochemical resource quality for herbivorous consumers enhanced by the manipulation of light and nutrient regimes? *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 30 (4): 577-80.
- VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., BULLEJOS, F. J., DELGADO MOLINA, J. A. RUIZ-PÉREZ, O., NAVARRO, J. C. & CARRILLO, P. 2009. UV radiation and phosphorus interact to influence the biochemical composition of phytoplankton *Freshwater Biol.*, 54:1233-1245.
- VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J. M., CRUZ-PIZARRO, L. & CARRILLO, P. 2001. Inter- and intra-annual variability in the phytoplankton community of a high mountain lake: the influence of external (atmospheric) and internal (recycled) sources of phosphorus. *Freshwater Biol.*, 46: 1017-34.
- VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M. & CARRILLO, P. 2001. Inter- and intra-annual variability in the phytoplankton community of a high mountain lake: the influence of external (atmospheric) and internal (recycled) sources of P. *Freshwater Biol.*, 46: 1017-1034.
- VINEBROOKE, R. D., COTTINGHAM, K. L., NORBERG, J. *et al.* 2004. Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos*, 104: 451-457.
- VINEBROOKE, R. D., SCHINDLER, D. W., FINDLAY, D. L. *et al.* 2003. Trophic dependence of ecosystem resistance and species compensation in experimentally acidified Lake 302S (Canada). *Ecosystems*, 6: 101-113.
- VINEBROOKE, R. D. & LEAVITT, P. R. 2005. Mountain lakes as indicators of the cumulative impacts of ultraviolet radiation and other environmental stressors. In Huber U. M., Bugmann H.K. M. and Reasoner, M. A. (eds.), *Global change and Mountain Regions – An Overview of Current Knowledge. Series Advances in Global Change Research 23*. Springer, New York, USA, pp. 497-509.
- VISSER, P. M., SNELDER, E., KOP, A. J., BOELEN, P, BUMA, A. G. J. & VAN DUYL, F. C. (1999). Effects of UV radiation on DNA photodamage and production in bacterioplankton in the coastal Caribbean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 20: 49-58.
- WEINBAUER, M. G., WILHELM, S. W., SUTTLE, C. A. & GARZA, D. R. 1997. Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine virus communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2200–2205.
- WOODWARD, S., ROBERTS, D. L. & BETTS, R. A. 2005. A simulation of the effect of climate change-induced desertification on mineral dust aerosol. *Geophys. Res. Lett.*, 32, L18810 (doi:10.1029/2005GLO23482).
- XENOPOULOS, M. A. & FROST, P. C. 2003. UV radiation, phosphorus, and their combined effects on the taxonomic composition of phytoplankton in a boreal lake. *J. Phycol.*, 39: 291-302.
- XENOPOULOS, M. A., FROST, P. C. & ELSER, J. J. 2002. Joint effects of UV radiation and phosphorus supply on algal growth rate and elemental composition. *Ecology*, 83: 423-435.
- ZUBKOV, M. V. & TARRAN, G. A. 2008. High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature*, 455: 224-226.