

SEGUIMIENTO INTERANUAL Y ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE FACTORES DE CAMBIO GLOBAL (UVR Y ENTRADAS DE P) SOBRE LOS PRODUCTORES PRIMARIOS EN LAGOS DE ALTA MONTAÑA

**PRESENTACIÓN CARRILLO¹, JUAN MANUEL MEDINA-SÁNCHEZ²,
MANUEL VILLAR-ARGAIZ², CRISTINA DURÁN¹, GUILLERMO HERRERA¹,
IRENE DORADO¹, MARCO J. CABRERIZO¹, VIRGINIA E. VILLAFÁÑE³,
Y E. WALTER HELBLING³**

RESUMEN

Múltiples factores de estrés relacionados con el cambio global [sequía, aumento de la radiación ultravioleta, aerosoles atmosféricos, aumento de la temperatura, cambio en el régimen de mezcla vertical] actúan produciendo un impacto acumulativo sobre los ecosistemas acuáticos, en particular sobre los ecosistemas de alta montaña del sur de Europa. Nuestra hipótesis de trabajo fue que la entrada de nutrientes de origen atmosférico (alta frecuencia y /ó intensidad) pueden exceder los umbrales de tolerancia de las comunidades de algas frente a múltiples factores de estrés. La hipótesis fue puesta a prueba mediante diseños experimentales complejos y estudios de series temporales a través de diferentes niveles de la organización. Se han obtenido cuatro grandes grupos de resultados:

1.- Efectos de la radiación ultravioleta (UVR) y la intensidad de los pulsos de nutrientes: el enriquecimiento con nutrientes a alta intensidad produjo interacciones no aditivas UVRxNutrientes, generando un desenmascaramiento y /ó potenciación de los efectos negativos de la UVR sobre variables estequiométricas y funcionales, pero con escaso efecto sobre la abundancia de las algas, en una escala temporal corta (una semana). En una escala temporal larga (tres semanas), la interacción UVRxNutrientes de un pulso de alta intensidad se atenuó, evidenciando una alta capacidad de adaptación de los autótrofos a través de mecanismos fisiológicos y ecológicos.

2.- Efectos de la radiación ultravioleta (UVR) y la frecuencia de pulsos de nutrientes: los pulsos de alta frecuencia generaron una respuesta de magnitud mayor que la obtenida por un pulso único, para la mayoría de las variables medidas. Sin embargo, la naturaleza de la interacción UVRxNutrientes fue similar y sinérgica sobre las variables estequiométricas, al acentuarse los efectos estimuladores de UVR. Por lo tanto, ambos factores equilibraron la composición elemental del fitoplancton, lo que se tradujo en el aumento de la producción primaria, la reducción de la excreción de carbono y la atenuación de los efectos dañinos de UVR sobre el porcentaje de carbono liberado. A largo plazo, el aumento de la incorporación de carbono invirtió la interacción sinérgica UVRxNutrientes sobre la abundancia de algas

¹ Instituto Universitario de Investigación del Agua, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain. Tel. 958 241 000 ext 20002. E-mail address: pcl@ugr.es

² Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain. Tel. 958 241 000 ext 20061. E-mail address: jmmedina@ugr.es; Tel. 958 241 000 ext 20075. mvillar@ugr.es

³ Estación de Fotobiología Playa Unión, Casilla de Correos N°15, 9103, Rawson, Chubut (Argentina). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). E-mail: virginia@efpu.org.ar; E-mail: whelbling@efpu.org.ar

umentó la diversidad, lo que indica la elasticidad del ecosistema para hacer frente al aumento de la frecuencia de entradas de polvo del Sahara relacionada con perturbaciones climáticas.

3.- Efectos de la radiación ultravioleta (UVR), la mezcla vertical y nutrientes: la mezcla vertical aumentó la inhibición fotosintética en lagos opacos mientras que contrarrestó los efectos nocivos de la UVR en lagos claros. La adición de nutrientes invirtió este efecto en cada tipo de lago.

4.- Estudio a largo plazo en el lago de La Caldera: la biomasa de fitoplancton y de zooplancton se correlacionaron fuertemente con la intensidad y la frecuencia de la deposición de aerosoles, la precipitación y la UVR. Sin embargo, el aumento de la biomasa algal asociada a aportes atmosféricos más intensos y frecuentes afectó negativamente a los copépodos, produciéndose un desacople en la transferencia de energía entre los productores primarios y los consumidores.

Palabras clave: UVR, pulsos de nutrientes, intensidad *vs* frecuencia, mezcla vertical, estudio a largo plazo, fitoplancton.

SUMMARY

Multiple anthropogenic stress factors related to global change [drought, increased ultraviolet radiation (UVR), atmospheric aerosols, temperature increase, change in vertical mixing regime] act producing a cumulative impact on aquatic ecosystems, particularly in high-mountains lakes in southern Europe. We test the hypothesis that atmospheric nutrient inputs (high frequency and /or intensity) may exceed the tolerance thresholds of algal communities to cope with multiple stressors by performing complex experimental designs and time series studies through different levels of organization. Four groups of results were found:

1.- Effect of UVR and intensity of nutrient pulses: nutrient enrichment with high intensity produced non additive UVRxNutrient interactions, unmasking and /or accentuating the negative effects of UVR on stoichiometric and functional variables, but with scarce effect on algal abundance at short-term scale (one week). At long-term scale (three weeks), the UVRxNutrient interaction of a high-intensity pulse was attenuated, evidencing a high adaptability of autotrophs through physiological and ecological mechanisms.

2.- Effect of UVR and frequency of nutrient pulses: high-frequency pulses generated a response of greater magnitude than that of a single pulse for most of the measured variables. However, the nature of the UVRxNutrient interaction was similar and synergistic on stoichiometric variables, because the stimulatory effects of UVR were accentuated. Therefore, both factors balanced the elemental composition of phytoplankton, which was translated into increase in primary production, decrease in carbon excretion, and attenuation of UVR damaging effects on the percentage of carbon release. At long-term, the increase in carbon incorporation reversed the UVRxNutrient synergistic interaction on algal abundance, and diversity increased. These findings indicate the resilient capability of the ecosystem to cope with an increase in frequency of Saharan dust inputs related to climatic disturbances.

3.- Effects of UVR, vertical mixing and nutrients: vertical mixing increased photosynthetic inhibition in opaque lakes while offset the damaging effects of UVR in clear lakes. The nutrient addition reversed this effect on each type of lake.

4.- Long-term study in lake La Caldera: phytoplankton and zooplankton biomass were strongly correlated to intensity and frequency of aerosol deposition, precipitation, and UVR. However, the increase in algal biomass associated with more intense and frequent atmospheric inputs can adversely affect the copepods, decoupling the energy transfer between primary producers and consumers.

Key words: UVR, nutrient pulse intensity *vs* frequency, vertical mixing, long-term study, phytoplankton.

INTRODUCCIÓN

Un objetivo de la investigación sobre el cambio global es evaluar y predecir cómo el impacto antrópico altera la diversidad biológica (STEFFEN *et al.*, 2004), el funcionamiento (BATTARBEE *et al.*, 2008), o los servicios del ecosistema (TALLIS *et al.*, 2008). El impacto de un factor de estrés de cambio global sabemos que depende de los efectos de otros factores de estrés que intervienen simultáneamente (THOMAS *et al.*, 2006). Sin embargo, carecemos de la información suficiente para predecir cómo los efectos interactivos de múltiples factores de cambio global podrían mitigar o exacerbar sus efectos individuales y su influencia sobre el funcionamiento del ecosistema (CARPENTER *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006). La falta de información en buena medida se debe a la escasez de experimentos multifactoriales (DARLING y CÔTÉ 2008; CRAIN *et al.*, 2008) que, unido a la complejidad y dinamismo de los sistemas ecológicos complica la predicción sobre cómo se verán afectados los procesos del ecosistema en un escenario futuro de cambio global. Indudablemente cualquier política para mitigar el impacto ecológico del cambio global ha de estar basada en un conocimiento científico robusto, ya que las escalas temporales y espaciales de los problemas ambientales globales son tan amplias que la comprensión de un mecanismo basado en relaciones causa-efecto son poco fiables (BARON *et al.*, 2008). La situación de cambio actual, por tanto, requiere experimentación sobre ecosistemas modelo con evaluación del cambio en procesos básicos del ecosistema sobre distintas escalas temporales de análisis para conocer la escala más apropiada a las que debería ajustarse los planes de gestión-control de las instituciones (BENTON *et al.*, 2007; BARON *et al.*, 2008).

Como es bien conocido, los lagos de alta montaña son laboratorios naturales y centinelas de cambio global debido a sus especiales características: aguas frías, oligotróficas, con baja diversidad, pobre redundancia funcional y relativamente bajos niveles de perturbación humana (VINEBROOKE y LEAVIT, 2005; CATALÁN *et al.*, 2006; WILLIAMSON *et al.*, 2009). Existe una tendencia creciente de impacto del cambio glo-

bal sobre los ecosistemas de montaña, siendo la radiación ultravioleta (UVR) y la polución por fósforo (P) y nitrógeno (N) algunos de los más importantes factores de cambio global con particular relevancia en estos ecosistemas (CARPENTER *et al.*, 2006). Aunque recientes estudios han sugerido que el efecto de UVR podría ser menos pronunciado debido a una potencial aclimatación y adaptación de los organismos como resultado de una historia de larga exposición a intensa irradiancia en estos lagos de aguas transparentes (VINEBROOKE y LEAVIT, 2005), el verdadero impacto de un incremento en UVR sobre los lagos de alta montaña depende más de la interacción con otros factores de estrés que sólo de un incremento en los flujos de UVR. Esto es particularmente cierto en latitudes meridionales de Europa donde son comunes las sequías (VILLAR-ARGAIZ *et al.*, 2001; DELGADO-MOLINA, 2009; JURADO-GARCÍA *et al.*, 2012), las entradas de nutrientes vía atmosférica procedentes de áreas desérticas (desierto del Sáhara que exporta nutrientes en forma de tormentas de polvo ricas en P, hierro y calcio; CARRILLO *et al.*, 1990; VILLAR-ARGAIZ *et al.*, 2001; 2002; PULIDO-VILLENNA *et al.*, 2006; MORALES-BAQUERO *et al.*, 2006a), o el incremento de temperatura (MORALES-BAQUERO *et al.*, 2006b; DURÁN, 2014). Todos ellos son factores de cambio global que están relacionados con anomalías de variaciones climáticas periódicas (North Atlantic Oscillation, NAO) y oscilaciones de las Zona de Convergencia Intertropical (ITZC), destacando el incremento registrado en la frecuencia e intensidad de intrusiones de aerosoles de origen sahariano debido a cambios en los patrones de precipitación global (ESCUADERO *et al.*, 2005).

Muchos modelos de cambio climático predicen un incremento en la variabilidad del clima como consecuencia del calentamiento global, que genera eventos climáticos extremos más intensos y más frecuentes (IPCC 2007). La velocidad del cambio ambiental favorece estos eventos climáticos extremos, con efectos directos sobre los ecosistemas, particularmente aquellos controlados por pulsos de nutrientes, como los lagos de alta montaña (YANG *et al.*, 2008). Por tanto, el cambio climático puede causar que los umbrales ecológicos sean excedidos y se favorezcan cambios

abruptos en la estructura de los ecosistemas, cuya naturaleza es impredecible y difícil de revertir. Por tanto, conocer si los umbrales están siendo excedidos (y cómo podrían serlo en el futuro) requerirá del establecimiento de condiciones de referencia, lo que implica el modelado de un rango de posible intensidad de factores de estrés y de las respuestas en ecosistemas vulnerables al cambio global, como los lagos de alta montaña.

Un primer paso en la investigación sobre múltiples factores de estrés es cuantificar el impacto de un incremento cuantitativo de pulso de nutrientes (intrusiones) sobre ecosistemas estresados por UVR. Esto implica responder a algunas cuestiones sobre los efectos individuales e interactivos de UVR×Nutrientes. Así, aunque está ampliamente establecido que el efecto de UVR sobre las algas es inhibitorio a nivel molecular [daño en el ADN (HELBLING *et al.*, 2001), inhibición de las actividades enzimáticas (KORBEE *et al.*, 2012)] o a nivel funcional [decrece el consumo de nutrientes (FAUCHOT *et al.*, 2000) y la producción primaria (CARRILLO *et al.*, 2002)], este efecto inhibitorio es atenuado o suprimido en el nivel de organización de población o comunidad (ej., tasas de crecimiento o abundancia algal (HALAC *et al.*, 1997; CABRERA *et al.*, 1997; MOSTAJIR *et al.*, 1999; DELGADO-MOLINA *et al.*, 2009). Por el contrario, el efecto de la adición de nutrientes (principalmente P) es generalmente estimulador de la producción primaria (CARRILLO *et al.*, 2008b; JOINT *et al.*, 2002) y del crecimiento algal (ej.: HILL y FANTA, 2008; CARRILLO *et al.*, 2008b), incrementando la abundancia y biomasa algal (ej.: VINEBROOKE y LEAVITT, 1998; CARRILLO *et al.*, 2008a). A pesar de estar bien establecidos estos efectos individuales contrapuestos (UVR depresor y enriquecimiento en nutrientes estimulador), los escasos estudios realizados sobre el efecto interactivo UVR×Nutrientes muestran resultados contradictorios tanto a nivel molecular y fisiológico (LITCHMAN *et al.*, 2002; HERAUD *et al.*, 2005; MEDINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2006) como sobre la estructura y sucesión de las comunidades pelágicas (BERGERON y VINCENT, 1997; XENOPOULOS *et al.*, 2002; XENOPOULOS y FROST, 2003).

Por ello, nos preguntamos si el signo del efecto interactivo depende de la escala temporal de respuesta, o por el contrario depende de la intensidad o frecuencia de los pulsos o incluso de una conjunción de situaciones particulares que intrínsecamente se relacionan con los umbrales ecológicos de los sistemas. Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo ha sido evaluar el papel de la intensidad *vs.* frecuencia de los pulsos de nutrientes e incremento en temperatura generando efectos interactivos UVR×Nutrientes y UVR×Mezcla-vertical×Nutrientes sobre comunidades autotróficas en distintas escalas temporales. Para realizar este trabajo hemos elegido como comunidad «diana» los productores primarios debido a su relevancia ecológica en el ciclo del carbono y su papel dominante en la estructura de la comunidad planctónica en los lagos de alta montaña (STRAŠKRABOVÁ *et al.*, 1999; CARRILLO *et al.*, 2006).

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudios experimentales

Efecto interactivo UVR, intensidad vs. frecuencia de pulsos de nutrientes

Se llevó a cabo una aproximación experimental *in situ* sobre 18 mesocosmos de polietileno, material con una transmitancia del espectro de radiación solar comprendida entre el ~60% a 280 nm y superior al 80% a 700 nm de longitud de onda. Los mesocosmos tuvieron 1 m de diámetro, 1,3 m de profundidad y 100 L de capacidad, y fueron llenados con agua del lago tomada a una profundidad comprendida entre 50 y 100 cm, pre-filtrada por una red de nylal de 45 μ m de tamaño de malla para eliminar el zooplancton.

El diseño experimental consistió en un análisis factorial 2×3, con tres réplicas para cada tratamiento: dos tratamientos de luz (uno con espectro de radiación completa [+UVR] y otro con exclusión de radiación ultravioleta [-UVR]) utilizando un filtro de UVR (UV-Process Supply Inc., IL, USA) y tres tratamientos de nutrientes (sin adición [control], adición de un único pulso

de nutrientes al comienzo del experimento con una concentración de $30 \mu\text{gP L}^{-1}$ [pulso intenso] y adición de un pulso de nutrientes con una concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ [pulso moderado] cada 3 días durante 21 hasta alcanzar una concentración final de $30 \mu\text{gP L}^{-1}$, con objeto de simular la frecuencia e intensidad de entrada de pulsos de polvo sahariano a estos ecosistemas). Para evitar la limitación de los organismos por nitrógeno (N) se adicionó NH_4NO_3 manteniendo una razón N:P atómica de 30; el fósforo (P) se añadió como Na_2HPO_4 . Los mesocosmos se mantuvieron desde el 30 de agosto hasta el 18 de septiembre de 2011 y las muestras fueron tomadas los días 4, 7, 9, 12, 15 y 18 de septiembre.

Efecto interactivo entre UVR, mezcla vertical y pulso de nutrientes

Los experimentos consistieron en un diseño factorial $2 \times 2 \times 2$ con los siguientes tratamientos: a) radiación solar: radiación UV + PAR (280-700 nm) vs. PAR (400-700 nm); b) adición de nutrientes: adición de fósforo (P) y nitrógeno (N), siendo la adición de P de $30 \mu\text{gP L}^{-1}$ y la de N la necesaria hasta alcanzar una razón N:P= 31, vs. no adición; c) mezcla vertical: movimiento en epilimnion de las comunidades algales desde la superficie hasta 3 m de profundidad (velocidad: 1m cada 4 minutos, con un total de 10 ciclos) vs. estática (más detalles en HELBLING *et al.*, 2013).

Estudio de seguimiento interanual a largo plazo

Se analizaron series temporales de datos de las comunidades planctónicas en diferentes intervalos (de 2 días, hasta un mes) del período libre de hielo en la laguna de La Caldera desde 1975. Aunque el programa de muestreo mostró algunas interrupciones, cada década incluye un mínimo de 2 a 6 años de muestreo intensivo. Las muestras fueron recolectadas en una estación situada sobre la profundidad máxima, y consistieron en 120 mL de agua de diferentes profundidades para la cuantificación del fitoplancton, y 18 ó 24 L de agua, filtradas a través de una red de nylon de $45 \mu\text{m}$ de tamaño de malla para la cuan-

tificación del zooplancton. Todos los taxones fueron identificados a nivel de especie mediante microscopía invertida. Los protocolos de análisis y los datos originales están publicados en diferentes fuentes (CARRILLO *et al.*, 1995; VILLAR-ARGAIZ *et al.*, 2001).

VARIABLES ESTRUCTURALES: FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS:

VARIABLES FÍSICAS:

En cada día de muestreo, y coincidiendo con la máxima verticalidad del sol, se midieron los perfiles de temperatura y de atenuación vertical de distintas regiones del espectro de radiación solar (305 nm, 320 nm, 380 nm y PAR) en la columna de agua, usando un radiómetro BIC sumergible (Biospherical Instruments Inc., CA, USA). Los coeficientes de atenuación vertical 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 longitud de onda.

VARIABLES ESTEQUIOMÉTRICAS:

El análisis de la composición elemental de algas se realizó mediante filtración (con agua prefiltrada por $45 \mu\text{m}$) 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 C y sin combustión para el de P. El P sestónico se analizó mediante oxidación previa del contenido de los respectivos filtros con mezcla oxidante y siguiendo la técnica espectrofotométrica del molibdato (APHA 1992). Los filtros para el análisis de C se mantuvieron a 20°C y en campana de desecación hasta que se procesaron en un analizador elemental CNH Perkin-Elmer, modelo 2400 (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA).

VARIABLES FUNCIONALES:

La producción primaria (PP) fue medida con el método del ^{14}C propuesto por STEEMAN-NIELSEN (1952). Conjuntos de cuatro frascos de

cuarzo de 70 ml (tres claros y uno oscuro), con 0,37 MBq de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (actividad específica: 310,8 MBq mmol^{-1}) añadido fueron expuestos horizontalmente a la irradiación media de la columna de agua durante 4 h. La producción primaria total (PP_T) se midió como carbono orgánico total por acidificación de una alícuota de 4 ml en un vial de centelleo de 20 ml con 100 μL de HCl 1N ($\text{pH} < 2$). Posteriormente, los viales se mantuvieron abiertos en una campana extractora durante 24 horas para retirar los restos de ^{14}C inorgánico (LIGNELL, 1990). La producción primaria particulada (PP_P) fue determinada tras filtración de una alícuota de 60 mL a través de filtros Nuclepore de 25 mm de diámetro y 1.0 μm de tamaño de poro. Los filtros obtenidos se dispusieron en viales de centelleo de 20 mL y el DI^{14}C fue eliminado por adición de 100 μL de HCl 1N. El filtrado que se corresponde con el carbono orgánico excretado (EOC) por las algas también fue recogido y tratado como se ha descrito para el caso del PP_T . Posteriormente, se añadió líquido de centelleo (Ecoscint A) a todos los viales y se midieron en un contador de centelleo provisto de autocalibración (Beckman LS 6000TA). El $^{12}\text{CO}_2$ total del agua se estimó a partir de las medidas de alcalinidad y pH (APHA, 1992).

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

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

Variables biológicas:

La cuantificación de la abundancia de fitoplancton, se realizó siguiendo el método propuesto por UTHERMÖL (1958). Se sedimentó cada alícuota de muestra en una cámara Uthermöl durante 48 horas para asegurar la sedimentación de las células más pequeñas. En un microscopio óptico invertido (Leitz, Labovert) se contaron al menos 200 individuos de la especie más abundante. El biovolumen celular se estimó en cada muestra mediante análisis de imagen (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 propuestos específicos (CARRILLO *et al.*, 1995).

Análisis estadísticos:

El efecto individual e interactivo de UVR y nutrientes se cuantificó mediante análisis de la variancia de 2 vías (2-way ANOVA) y el efecto de UVR y nutrientes a lo largo del tiempo se empleó mediante ANOVA de medidas repetidas (RM-ANOVA). La normalidad (por medio del test de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de varianzas (por medio de los tests de Cochran y de Levene) fueron comprobadas en cada grupo de datos para verificar las asunciones de homocedasticidad o de esfericidad (por medio del test de Manchly) requeridas por los análisis ANOVA y RM-ANOVA. Los datos fueron transformados cuando estas condiciones no se cumplían. Cuando el ANOVA mostró un efecto interactivo significativo, el efecto individual de cada factor fue analizado mediante un test de comparaciones múltiples post hoc de Bonferroni. Un análisis de regresión por pasos se llevó a cabo para evaluar el efecto de los factores predictores: temperatura, precipitaciones, irradiación UVR, intensidad, y frecuencia de aerosoles (índice de aerosoles TOMS-AI) que controlan a largo plazo las dinámicas del zooplancton en el lago de La Caldera (ver detalles en VILLAR-ARGAIZ *et al.*, 2012). La linealidad y ortogonalidad entre las variables independientes fueron verificadas mediante el análisis de correlación previo (STATSOFT, 1997).

RESULTADOS

Efecto interactivo UVR e intensidad de un pulso de nutrientes

Variables estequiométricas:

En la figura 1 se representan los resultados del efecto de UVR e intensidad de pulso de nutrientes sobre distintas variables respuesta de la comunidad fitoplanctónica. En la figura 1A se muestra que el contenido de P en el seston sólo fue afectado significativamente por UVR en tratamientos de pulso intenso, mientras que la adi-

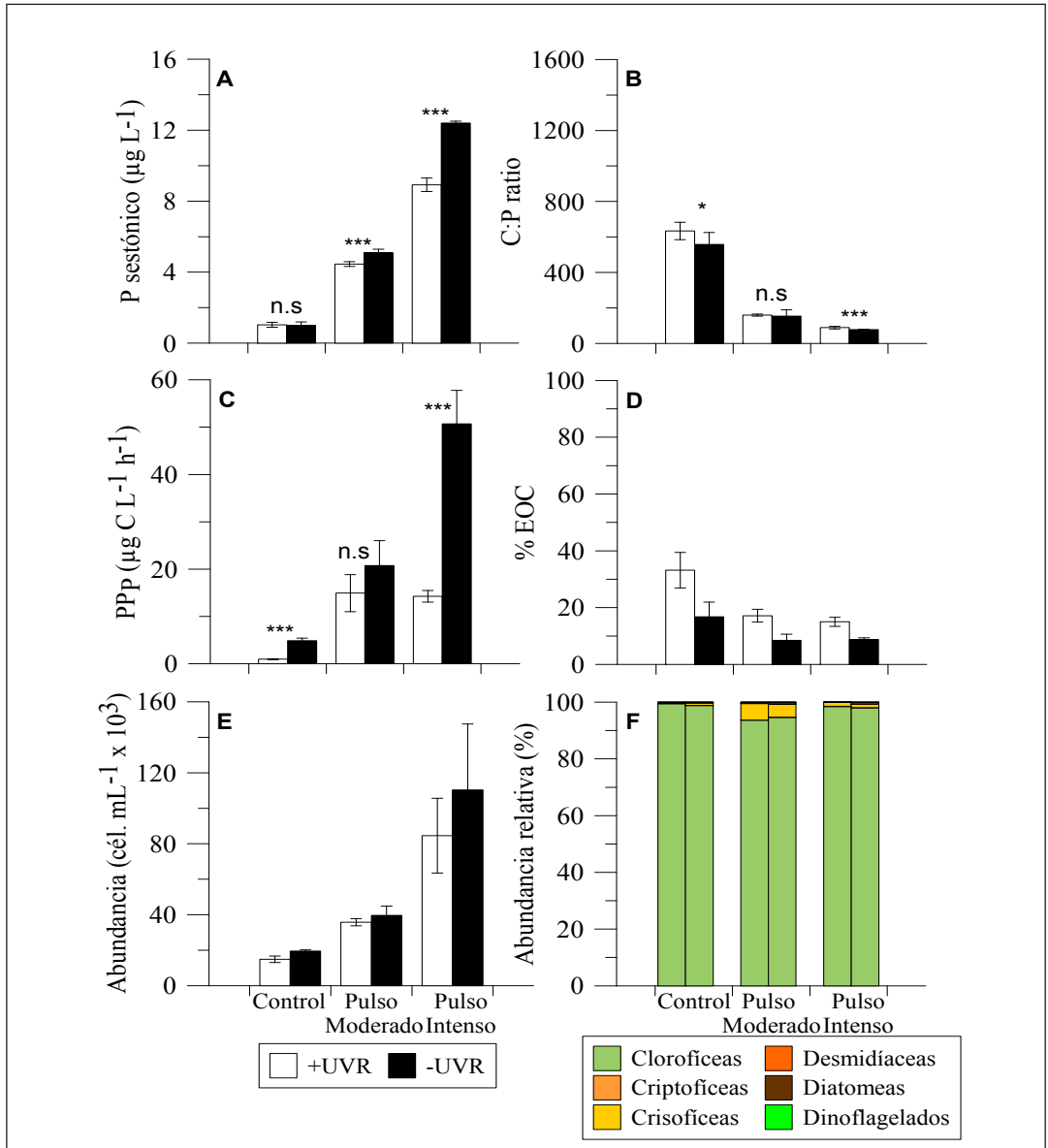


Figura 1. Respuestas de la comunidad algal a la radiación solar (280-700 nm) [+UVR], radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm)[-UVR] y pulsos de nutrientes de distinta intensidad (pulso moderado [5µgP L⁻¹] y pulso intenso [30µgP L⁻¹] después de una semana de incubación. (A) P sestónico, (B) razón C:P sestónica, (C) Producción Primaria Particulada (PPP), (D) Porcentaje de Carbono Orgánico Excretado (% EOC), (E) Abundancia y (F) Composición taxonómica fitoplanctónica. Los datos son expresados como valores promedio ± SD (n=3). Los asteriscos indican valores significativamente entre tratamientos de luz. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; n.s., no significativo.

Figure 1. Algal responses to solar radiation (280-700 nm) [+UVR], Photosynthetically Active Radiation(400-700 nm) (-UVR) and nutrient pulse intensity (moderated pulse [5µgP L⁻¹] and intense pulse [30µgP L⁻¹] after a week of incubation time (A) Sestonic P, (B) Sestonic C:P ratio, (C) Particulate Primary Production (PPP), (D) Percentage Excreted Organic Carbon (% EOC), (E) Abundancia and (F) taxonomical composition of phytoplankton. Error bars mean±SD (n=3). Asterisks indicate significantly differences between light treatments. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; n.s. not significant.

ción de nutrientes ejerció un efecto estimulador significativo, incrementando el contenido en P del seston, en tratamientos de pulso moderado (5 veces) y pulso intenso (10 veces), independientemente del tratamiento de luz aplicado. Por tanto, un pulso intenso generó un efecto interactivo sinérgico ya que la adición de nutrientes desenmascaró un efecto negativo de UVR (Fig.1A, Tabla 1A). La razón C:P sestónica, como es esperable, mostró un patrón de respuesta opuesto al del P sestónico. La UVR no ejerció un efecto significativo en ninguno de los tratamientos y el enriquecimiento en nutrientes (pulsos moderado e intenso) disminuyó significativamente la razón C:P independientemente de las condiciones de luz, generando un efecto significativo UVRxNutrientes (Fig.1B, Tabla 1A).

Variables funcionales:

Los valores medios de PP_p oscilaron desde 2.94 $\mu\text{gC L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (en tratamientos sin adición de nutrientes [+UVR] y [-UVR]) hasta 17.84 y 48.32 $\mu\text{gC L}^{-1} \text{h}^{-1}$ en tratamientos [-UVR] de pulso moderado y pulso intenso, respectivamente. UVR ejerció un efecto negativo significativo sobre la PP_p mientras que el enriquecimiento en nutrientes con pulso moderado o intenso tuvo un efecto estimulador sobre la PP_p (Fig.1C). La interacción UVRxNutrientes fue sinérgica, es decir la adición de P acentuó el efecto inhibitorio de UVR sobre la PP_p (Fig. 1C Tabla 1A). El %EOC incrementó en tratamientos [+UVR] en todos los tratamientos de nutrientes ensayados, aunque este efecto fue mayor en ausencia de éstos. La adición

A) UVR x Intensidad de pulso											
Tratamiento		P sestónico		razón C : P		PP _p		%EOC		Abundancia	
	df	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
UVR	1	182,03	<0,001	676,51	<0,001	121,44	<0,001	54,02	<0,001	66,27	n.s.
Nutrientes	2	3.116,07	<0,001	149,13	<0,001	262,91	<0,001	27,06	<0,001	424,23	<0,001
UVR x Nutrientes	2	115,21	<0,001	42,47	<0,001	12,77	<0,001	0,47	n.s.	15,39	<0,001
B) UVR x Frecuencia de pulso											
Tratamiento		P sestónico		razón C : P		PP _p		%EOC		Abundancia	
	df	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
UVR	1	212,93	<0,001	113,85	<0,001	7,74	<0,05	4,74	n.s.	277,23	<0,001
Nutrientes	2	634,05	<0,001	23,47	<0,001	189,36	<0,001	2,99	n.s.	117,98	<0,001
UVR x Nutrientes	2	36,16	<0,001	224,06	<0,001	7,62	<0,01	15,57	<0,001	52,96	<0,001
C) UVR x Intensidad de pulso x Tiempo											
Tratamiento		P sestónico		razón C : P		PP _p		%EOC		Abundancia	
	df	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
UVR	1	14,47	<0,01	252,97	<0,001	102,82	<0,001	51,24	<0,001	21,3	<0,01
Nutrientes	1	1.460,75	<0,001	2.965,3	<0,001	1.451,93	<0,001	21,2	<0,01	1.220,24	<0,001
Tiempo	1	76,41	<0,001	1,79	n.s.	96,34	<0,001	31,45	<0,001	645,08	<0,001
UVR x Nutrientes x Tiempo	1	17,52	<0,001	88,7	<0,001	0,04	n.s.	1,13	n.s.	4,96	n.s.

Tabla 1. Resultados de doble vía ANOVA del efecto de UVR, nutrientes (A) intensidad de pulso, B) frecuencia de pulso y C) doble vía RM-ANOVA (UVR, nutrientes y tiempo) sobre el P sestónico, razón C:P sestónica, Producción Primaria Particulada (PP_p), Porcentaje de Carbono Orgánico Excretado (%EOC) y abundancia algal. df: grados de libertad. p < 0,05 en negrita.

Table 1. Two-way ANOVA results of UVR, nutrients effect (A) pulse intensity, B) pulse frequency; and C) RM-ANOVA two ways (UVR, nutrients and time) on sestonic P. Sestonic C:P ratio, Particulate Primary Production (PP_p) Percentage of Excreted Organic Carbon (%EOC) and algal abundance. df: degrees of freedom. p < 0.05 in bold.

de un pulso de nutrientes disminuyó el %EOC; en un 51% (pulso moderado) y en un 45% (pulso intenso) bajo [+UVR] y en un 50% (pulso moderado e intenso) bajo [-UVR], sin diferencias entre niveles de enriquecimiento, de ahí que no se existiera un efecto interactivo significativo UVR×Nutrientes sobre el % EOC (Tabla 1A).

Variables estructurales:

UVR no ejerció un efecto significativo sobre la abundancia algal, mientras que tanto la composición taxonómica como la abundancia algal se afectaron por el pulso intenso, incrementando la abundancia algal hasta cinco veces con respecto a las condiciones control, con independencia de las condiciones de luz. Las clorofíceas (principalmente *Monoraphidium sp.*) fue el grupo dominante (93,70% en [+UVR] y pulso moderado) y el 99,50% en [+UVR] Control) en todos los tratamientos de nutrientes y en ambas condiciones de luz.

Efecto interactivo UVR y frecuencia de pulso de nutrientes

Variables estequiométricas:

En relación con el contenido en P de la fracción sestónica, los resultados muestran un efecto interactivo entre la frecuencia de pulso de nutrientes y la radiación UV. Este efecto es de naturaleza sinérgica positiva ya que, bajo UVR, los pulsos de nutrientes (baja y alta frecuencia) incrementaron significativamente el contenido de P sestónico; este efecto estimulador se potenció cuando los pulsos fueron de alta frecuencia, alcanzando valores de $8,6 \mu\text{gP L}^{-1}$ (Fig. 2A, Tabla 1B). El incremento en el P sestónico en el tratamiento [+UVR] disminuyó la razón C:P entre un 30% en tratamiento de baja frecuencia de pulso y un 50% en el tratamientos control y de alta frecuencia de pulso. La adición de nutrientes, por tanto, generó un efecto interactivo con UVR, disminuyendo el efecto UVR en el tratamiento de baja frecuencia. Puesto que una razón C:P más baja está relacionada con un mayor contenido en P sestónico, valores más bajos de la razón C:P in-

dican un contenido elemental más equilibrado para crecer, de ahí que la acción conjunta de ambos factores mejorando la razón C:P sea denominada como sinérgico positivo. Los valores de C:P sestónico decrecieron desde $822 \mu\text{gP L}^{-1}$ (tratamientos control) hasta 151 (tratamientos alta frecuencia) ó $207 \mu\text{gP L}^{-1}$ (tratamientos baja frecuencia) (Fig. 2B).

Variables funcionales:

La radiación UV no ejerció un efecto negativo significativo sobre la PP_p ni en tratamientos control ni en tratamientos de pulso de baja frecuencia (Fig. 2C). Por el contrario, el enriquecimiento en nutrientes estimuló significativamente la PP_p , independientemente de la frecuencia de pulso aplicada y del tratamiento de luz; sus valores oscilaron entre $0,36 \mu\text{gC L}^{-1}\text{h}^{-1}$ en tratamientos control y valores promedio de 14,15 y $11,60 \mu\text{gC L}^{-1}\text{h}^{-1}$ en tratamientos de alta y baja frecuencia de pulso. El %EOC respondió de distinta forma en función de la frecuencia del pulso aplicada. Así, bajo UVR, la entrada de nutrientes de alta frecuencia generó un marcado efecto interactivo antagónico sobre el %EOC, es decir, el enriquecimiento disminuyó en un 60% los valores de %EOC entre el tratamiento control y el pulso de alta frecuencia, mientras que el pulso de baja frecuencia no ejerció efecto sobre el %EOC en ningún tratamiento de luz, y por tanto no se generó un efecto interactivo entre ambos factores (Fig. 2D).

Variables estructurales:

La adición de nutrientes y UVR ejerció un efecto estimulador sobre la abundancia algal tanto en tratamientos de alta como de baja frecuencia de pulso. En relación con cambios en la composición específica de la comunidad algal, podemos destacar que, en tratamientos control, *Monoraphidium sp.* (clorofícea) representó el 93-99%; en los tratamientos con pulso de nutrientes y UVR, *Chromulina nevadensis* (crisofícea) representó el 49% de la abundancia total en tratamientos de alta frecuencia, y el 70% en tratamientos de baja frecuencia.

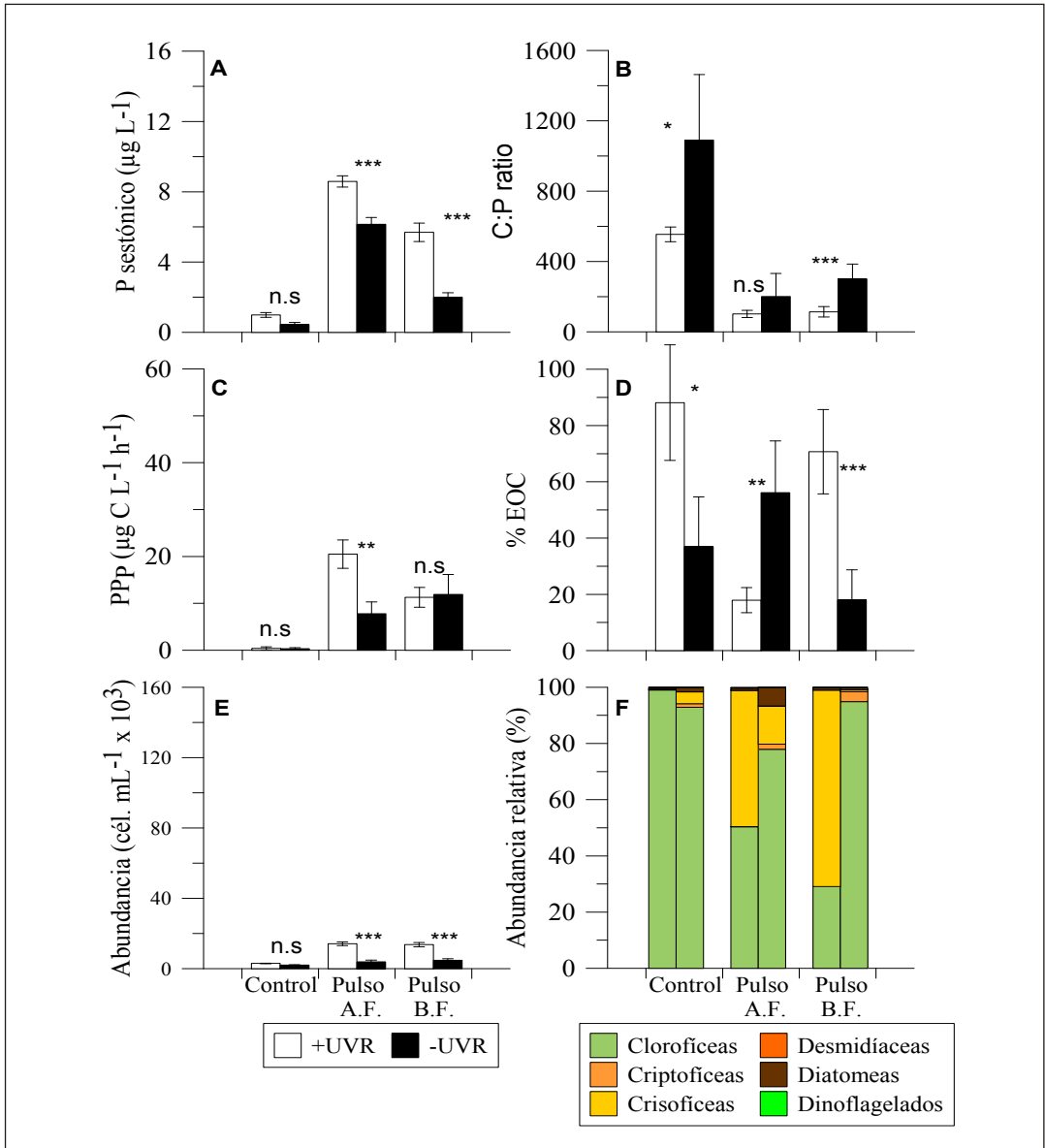


Figura 2. Respuestas de la comunidad algal a la radiación solar (280-700 nm) [+UVR], radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm)[-UVR] y frecuencia de pulsos de nutrientes (pulso de alta [AF] baja [BF] frecuencia [$30\mu\text{gP L}^{-1}$]) después de una tres semanas de incubación. (A) P sestónico, (B) razón C:P sestónica, (C) Producción Primaria Particulada(PPP), (D) Porcentaje de Carbono Orgánico Excretado (%EOC), (E) Abundancia y (F) Composición taxonómica fitoplanctónica. Los datos son expresados como valores promedio \pm SD (n=3). Los asteriscos indican valores significativamente entre tratamientos de luz. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; n.s. no significativo.

Figure 2. Algal responses to solar radiation (280-700 nm) [+UVR], Photosynthetically Active Radiation(400-700 nm) [-UVR] and nutrient pulse frequency (high frequency and low frequency) after three weeks of incubation time. (A) Sestonic P, (B) Sestonic C:P ratio (C) Particulate Primary Production (PPP), (D) Percentage Excreted Organic Carbon (%EOC), (E) Abundance and (F) taxonomical composition of phytoplankton. Error bars mean \pm SD (n=3).Asterisks indicate significantly differences between light treatments. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; n.s. not significant.

Efecto interactivo de la UVR, nutrientes y tiempo

Variables estequiométricas:

La radiación UV no ejerció un efecto significativo sobre el contenido en P del seston ni sobre la razón C:P; sin embargo, la adición de nutrientes tuvo un efecto positivo significativo sobre estas razones a lo largo del tiempo en ambos tratamientos de luz. Así, el P sestónico incrementó 11 veces a medio plazo (1 semana) y 4 veces a largo plazo (3 semanas), y la razón C:P disminuyó 6 veces con respecto a las condiciones iniciales (Fig. 3A, B). UVR, Nutrientes y Tiempo ejercieron un efecto interactivo significativo de carácter sinérgico sobre el P sestónico, y antagónico sobre la razón C:P (Tabla 1C).

Variables funcionales:

La interacción UVR×Nutrientes×Tiempo no mostró un efecto significativo sobre la PP_p o el %EOC. Sin embargo, los tres factores ejercieron un efecto individual significativo sobre estas variables. La incubación a largo plazo eliminó el efecto sinérgico negativo UVR×Nutrientes generado en la primera semana sobre PP_p (Fig. 3C). Por tanto, el tiempo modificó la interacción UVR×Nutrientes desde sinérgica a antagónica. En el caso del %EOC, los nutrientes disminuyeron el %EOC en ambas condiciones de luz y tras una semana de incubación, mientras que la respuesta a largo plazo implicó un aumento del efecto de UVR sobre esta variable de hasta un 70% (Fig. 3D).

Variables estructurales:

La respuesta a la interacción UVR×Nutrientes×Tiempo de la comunidad algal en términos de abundancia siguió un patrón diferente. La adición de fósforo ejerció un efecto estimulador significativo a medio plazo independientemente de las condiciones de luz, produciendo un incremento en la abundancia de células de casi cinco veces ($10 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$) respecto a las condiciones iniciales. Después de tres semanas, la abun-

dancia algal retornó a valores similares a los de las condiciones iniciales, y hubo un efecto inhibidor significativo de UVR (Fig. 3E).

Los cambios en la abundancia algal estuvieron acompañados de cambios en la composición taxonómica (Fig. 3F) de forma que, a medio plazo tras el enriquecimiento en nutrientes, el grupo dominante fue el de las clorofíceas (*Monoraphidium sp.*), con porcentajes de abundancias superiores al 90% tanto en [+UVR] como [-UVR]. A largo plazo existieron grandes diferencias en la composición taxonómica dependiendo de las condiciones de luz; así, bajo UVR, las crisofíceas (*Chromulina nevadensis*) fueron el grupo dominante (70%), seguido por las clorofíceas (29%), mientras que en tratamientos [-UVR] continuaron siendo dominantes las clorofíceas (95%). El efecto UVR×Nutrientes×Tiempo sobre la composición específica y la abundancia fue significativo (Tabla 1C) y de carácter sinérgico positivo, es decir el enriquecimiento en Nutrientes y UVR a largo plazo incrementó la diversidad algal.

Efecto interactivo de la UVR, mezcla vertical y nutrientes.

En condiciones no enriquecidas y con radiación UV, la mezcla vertical atenúo los efectos negativos de UVR sobre la PP_p y disminuyó la liberación de carbono orgánico disuelto (EOC) en los lagos transparentes de Sierra Nevada (La Caldera y La Yeguas) mientras que incrementó la inhibición fotosintética de algas y la liberación de EOC en el lago más opaco (lago Enol, Picos de Europa). El pulso de nutrientes invirtió los efectos ejercidos por la UVR y mezcla vertical; así, en los lagos de aguas claras (La Caldera y Las Yeguas) se acentuó la inhibición fotosintética durante la mezcla, mientras que en el lago más opaco (Enol) la adición de nutrientes contrarrestó el impacto negativo de UVR generado durante la mezcla (Fig. 4 A, B,C).

Con el fin de comparar los resultados obtenidos en los tres lagos modelo y proponer un modelo más general de inhibición por UVR, se normalizaron los valores de inhibición por la irradiancia media recibida por las células en cada ecosis-

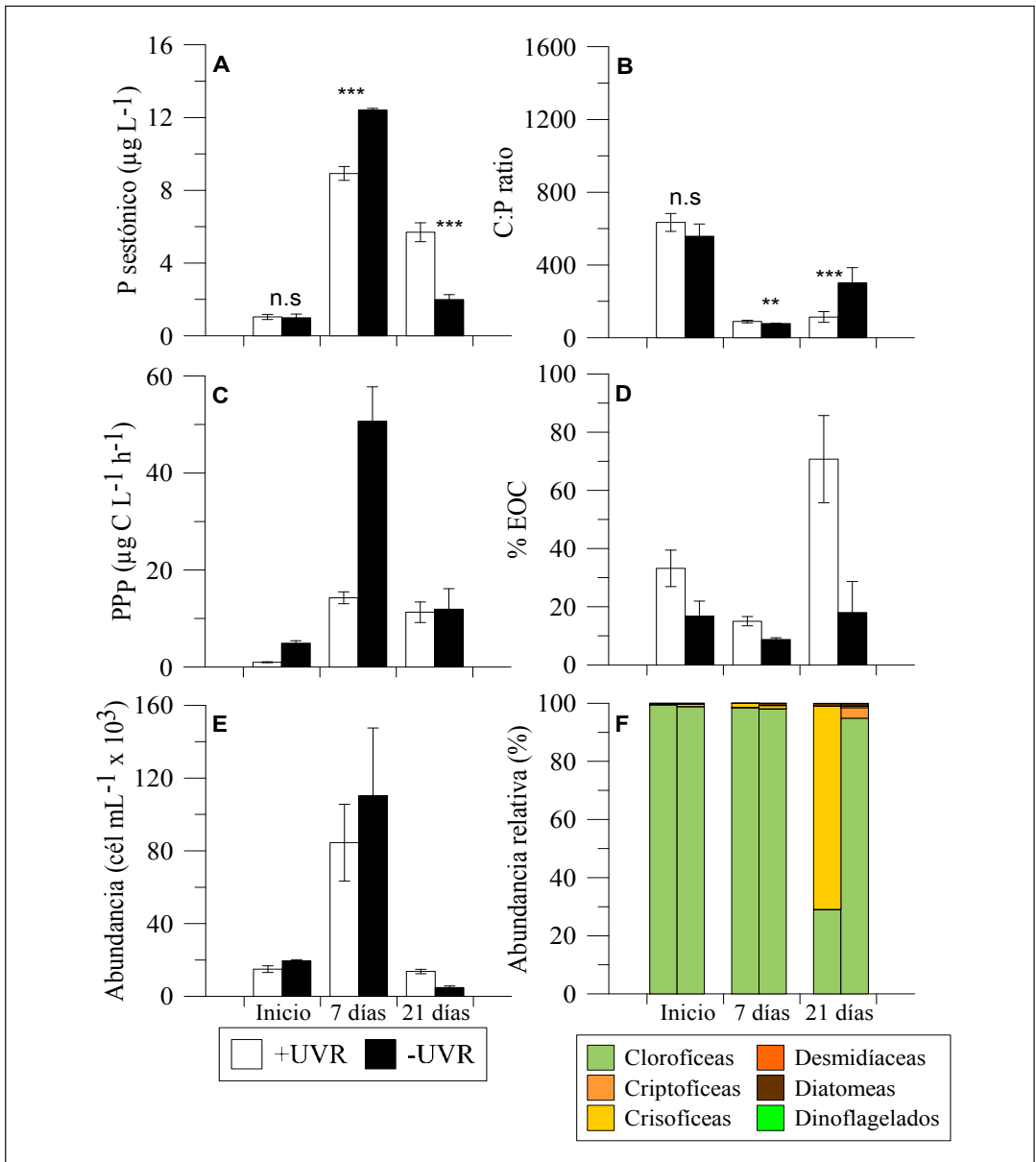


Figura 3. Respuesta temporal de la comunidad algal a la radiación solar (280-700 nm) [+UVR], radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) [-UVR] y diferentes concentraciones de fósforo (ambiente vs. 30 µg PL-1). (A) P sestónico, (B) razón C:P sestónica, (C) Producción Primaria Particulada (PPP), (D) Porcentaje de Carbono Orgánico Excretado (%EOC), (E) Abundancia y (F) Composición taxonómica fitoplanctónica. Los datos son expresados como valores promedio ± SD (n=3). Los asteriscos indican valores significativamente entre tratamientos de luz. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; n.s., no significativo.

Figure 3. Temporal algal response to solar radiation (280-700 nm) [+UVR], Photosynthetically Active Radiation (400-700 nm) [-UVR] and different phosphorus concentration (ambiente vs 30 µgP L⁻¹). (A) Sestonic P, (B) Sestonic C:P ratio and (C) Particulate Primary Production (PPP), (D) Percentage Excreted Organic Carbon (%EOC), (E) Abundance and (F) taxonomical composition of phytoplankton. Error bars mean±SD (n=3). Asterisks indicate significantly differences between light treatments. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; n.s., not significant.

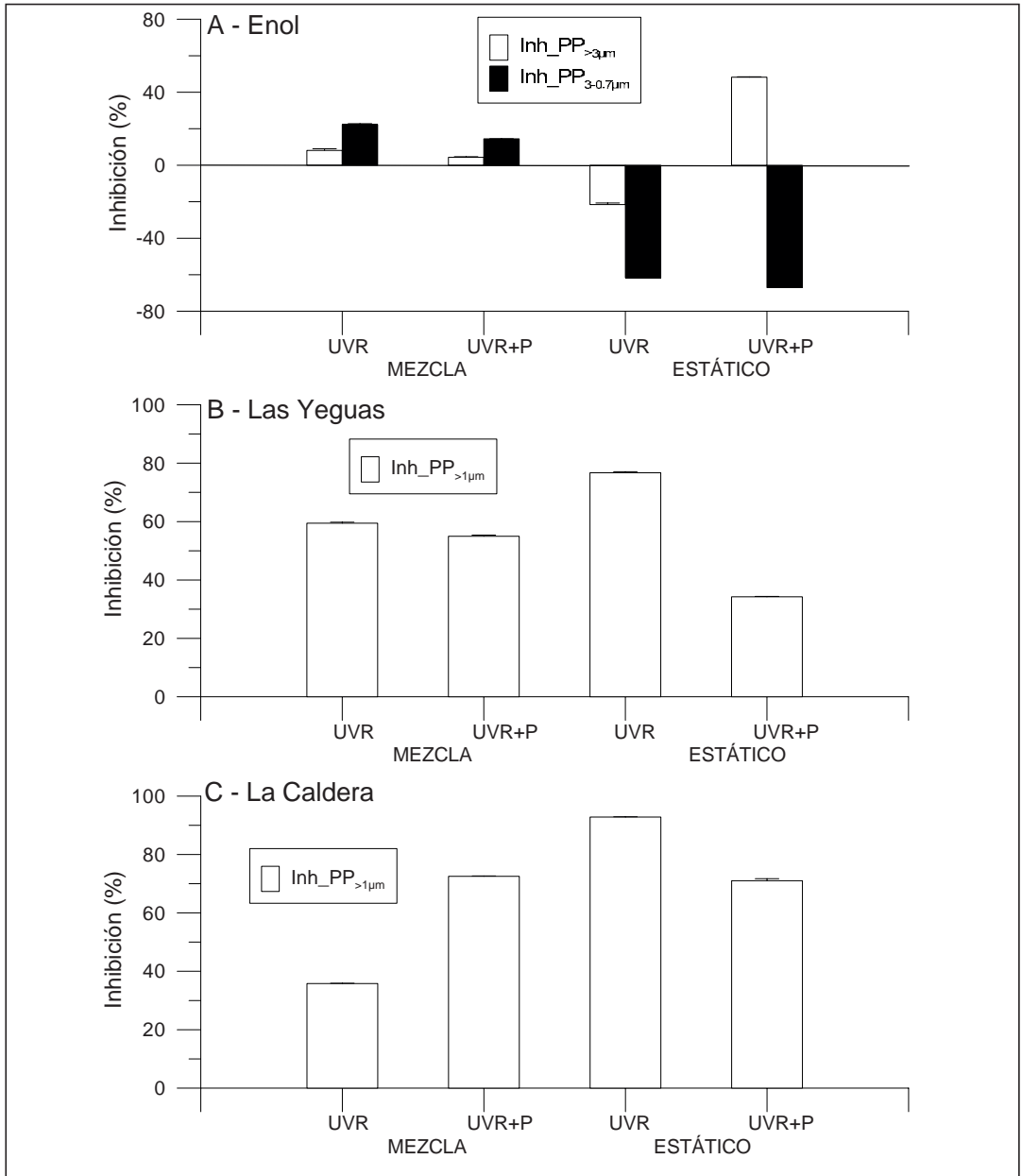


Figura 4. Porcentaje de inhibición de la Producción Primaria Particulada (PPP) (%) debido a UVR, en diferentes concentraciones de fósforo (ambiente vs $30 \mu\text{g PL}^{-1}$) y régimen de mezcla (mezcla vs estática) en: (A) Lago Enol (LE: fracción $> 3 \mu\text{m}$ (barras blancas), fracción de $3-0,7 \mu\text{m}$ mm (barras grises), total (barras rayadas); (B) Laguna de Las Yeguas (LY) y (C) Laguna de La Caldera (LC). Las líneas en la parte superior de las barras representan el desviación estándar ($n=3$). Gráfica modificada de HELBLING *et al.* (2012).

Figure 4. Percentage inhibition of Particulate Primary Production (PPP) (%) due to UVR under different phosphorus concentration (ambient versus $30 \mu\text{g PL}^{-1}$) and mixing regime (mixing versus static) conditions in: (A) Lake Enol (LE): $>3 \mu\text{m}$ fraction (white bars), $3-0.7 \mu\text{m}$ fraction (gray bars), total (hatched bars); (B) Lake Las Yeguas (LY); and (C) Lake La Caldera (LC). The lines on top of the bars are the standard deviation ($n=3$). Modified from HELBLING *et al.* (2012).

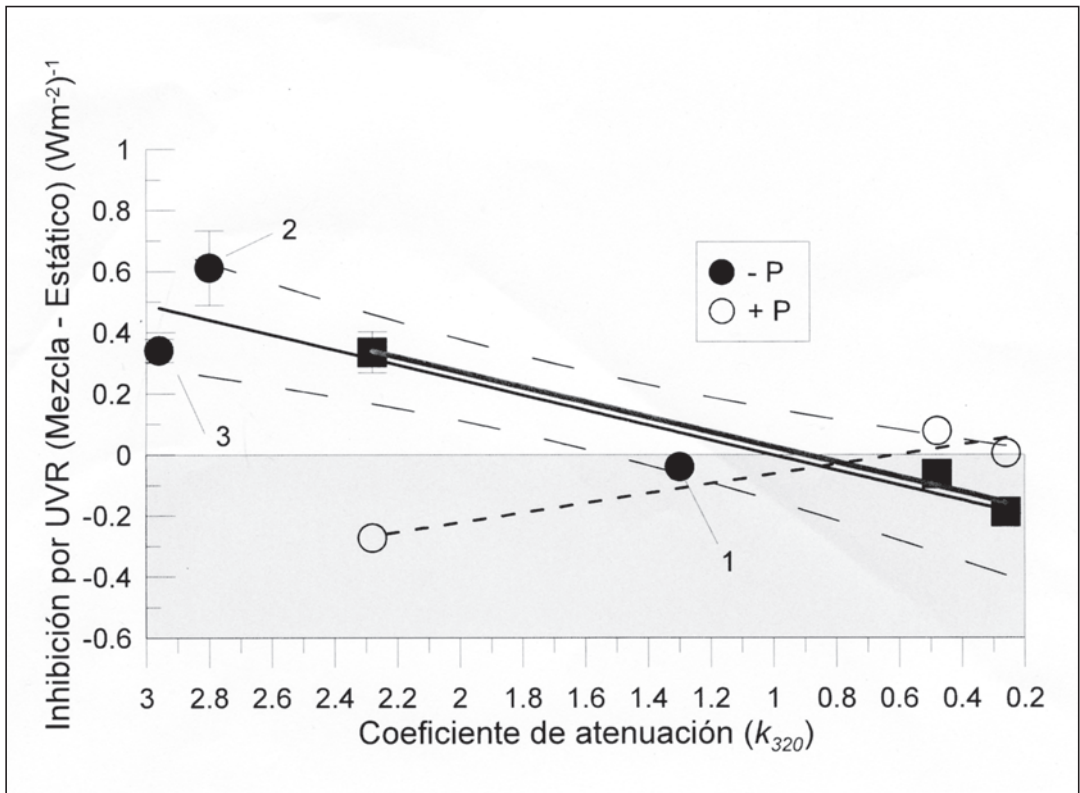


Figura 5. Inhibición por UVR de la Producción Primaria Particulada (PP_p) de muestras mezcladas menos estáticas, normalizada por la irradiancia media recibida por las células, como una función del coeficiente de atenuación para las muestras, con la adición de nutrientes (círculos blancos) y sin la adición de nutrientes (círculos negros y cuadrados). Las líneas representan el ajuste de regresión lineal para seis lagos (línea negra); para los tres lagos de este estudio sin (línea gris gruesa) o con (línea discontinua) adición de nutrientes. Las líneas discontinuas finas son los límites de confianza del 95% para el ajuste de los seis lagos. Los datos adicionales calculados son a partir de: 1) VILLAFANE *et al.* (2007); 2) HIRIART-BAER y SMITH (2005); y 3) KOHLER *et al.* (2001) (ver HELBLING *et al.*, 2013).

Figure 5. UVR inhibition Particulate Primary Production (PP_p) of mixed minus static samples, normalized by the mean irradiance received by the cells, as a function of the attenuation coefficient for samples with nutrient addition (white circles) and without (black circles and squares) nutrient addition. The lines represent the fit of linear regression for six lakes (black line); for the three lakes of this study without (gray thick line) or with (dashed line) nutrient addition. The dashed thin lines are the 95% confidence limits for the fit of six lakes. Additional data calculated from: (1) KÖHLER *et al.* (2001), (2) HIRIART-BAER & SMITH (2005); and (3) VILLAFANE *et al.* (2007); (see HELBLING *et al.*, 2013).

tema y se incluyeron datos recopilados de la literatura. En la Figura 5 se representan dichos valores en función del coeficiente de atenuación ($K_{d_{320}}$), teniendo en cuenta de forma independiente los tratamientos con o sin adición de nutrientes. Encontramos una tendencia significativa en la inhibición de PP_p en muestras sin adición de nutrientes; así, en lagos con alta K_{320}

(es decir, lagos opacos) fue mayor la inhibición bajo mezcla que en condiciones estáticas, y disminuyeron hacia lagos de aguas transparentes, alcanzando valores negativos, lo que indica que la inhibición fue mayor en las condiciones estáticas y que la mezcla contrarresta los efectos negativos de la radiación UV en los lagos más transparentes.

Seguimiento del cambio global en ecosistemas modelo

La entrada de aerosoles sobre Sierra Nevada indica un aumento de la magnitud y frecuencia de incursiones de polvo del desierto vía atmosférica (Fig. 6), que se relaciona positivamente con la biomasa del fitoplancton en la laguna de La Caldera (ver BULLEJOS *et al.*, 2010). Sin embargo, el incremento en biomasa fitoplanctónica no es seguido de un mayor desarrollo en la biomasa de zooplancton a partir de la década de los 90, resultando en una dinámica desacoplada entre ambos niveles tróficos a largo plazo (Fig. 7). La entrada de una alta carga atmosférica favorece el desarrollo de fitoplancton y limita el crecimiento de herbívoros en lagos de alta montaña Mediterráneos.

El análisis de series temporales evidencia una relación negativa entre la abundancia de copépodos y las entradas atmosféricas en concierto con la mayor capacidad de *Daphnia* sp. para explotar mayores niveles de alimento sestónico (Tabla 2). Por tanto, estos resultados sugieren que los cambios en la intensidad y frecuencia de los aerosoles sustancialmente afectan también a la estructura de la comunidad de zooplancton, facilitando el establecimiento de cladóceros y rotíferos, más susceptibles a la limitación de carbono y fósforo sestónico, que los copépodos (Fig. 8). Finalmente, el efecto de la radiación UV sobre el crecimiento del zooplancton depende de la especie de consumidor y de la disponibilidad de nutrientes. Así, a bajas condiciones de nutrientes, la UVR favorecería a los rotíferos por la disminución de la relación C:P de su alimento y afectaría negativamente el crecimiento de los copépodos y cladóceros. Estos efectos negativos de UVR serían, sin embargo, compensados en el escenario de aumento nutrientes asociados a cargas atmosféricas más frecuentes. Claramente, los modelos predictivos sobre los efectos del cambio global en la estructura biológica de los ecosistemas acuáticos deben tener en cuenta la entrada de polvo, la radiación UV y la precipitación, ya que afectan directa e indirectamente a los consumidores herbívoros a través de la alteración en la cantidad y calidad de su alimento.

DISCUSIÓN

Este estudio responde a la demanda de investigación sobre los efectos interactivos entre múltiples factores de estrés (radiación UV, pulsos de nutrientes, mezcla vertical) sobre la biodiversidad y el funcionamiento de ecosistemas acuáticos. Hemos analizado los efectos interactivos entre (i) intensidad y/o frecuencia de pulsos de nutrientes y la UVR sobre los productores primarios, (ii) la UVR, mezcla vertical y pulso de nutrientes sobre el metabolismo de los productores primarios, (iii) entrada de aerosoles, UVR, precipitación y temperatura en series temporales a largo plazo.

Efectos interactivos UVR×nutrientes:

Efecto de la intensidad

De acuerdo con resultados previamente obtenidos en la laguna de La Caldera (CARRILLO *et al.*, 2002; MEDINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2006; KORBEE *et al.*, 2012) y otros lagos de alta montaña (HIRIART *et al.*, 2002), la UVR como factor individual inhibió la producción primaria e incrementó el porcentaje de carbono liberado por las algas (%EOC). Este resultado es reflejo de la existencia de un desacople entre la fotosíntesis y el crecimiento algal bajo estas condiciones de estrés a nivel funcional (BERMAN-FRANK y DUBINSKY, 1999) y por tanto es un indicador de estrés fisiológico. Este efecto negativo no se manifestó a nivel de cambios en la composición específica ni en la diversidad algal en condiciones sin adición de nutrientes, lo que contrasta con los efectos negativos ejercidos por UVR en lagos boreales (XENOPOULOS y FROST, 2003) y los obtenidos en este estudio después de 21 días de incubación. La ausencia de un patrón generalizado de respuesta de la diversidad algal frente a UVR parece estar relacionado con la distinta escala temporal empleada en los estudios desarrollados hasta la fecha, de ahí que el efecto de UVR fue nulo cuando la escala temporal fue inferior a una semana (VILLAFANE, 2004; este estudio) o negativo cuando excedió de 2 semanas (XENOPOULOS y FROST, 2003; CARRILLO *et al.*, 2009).

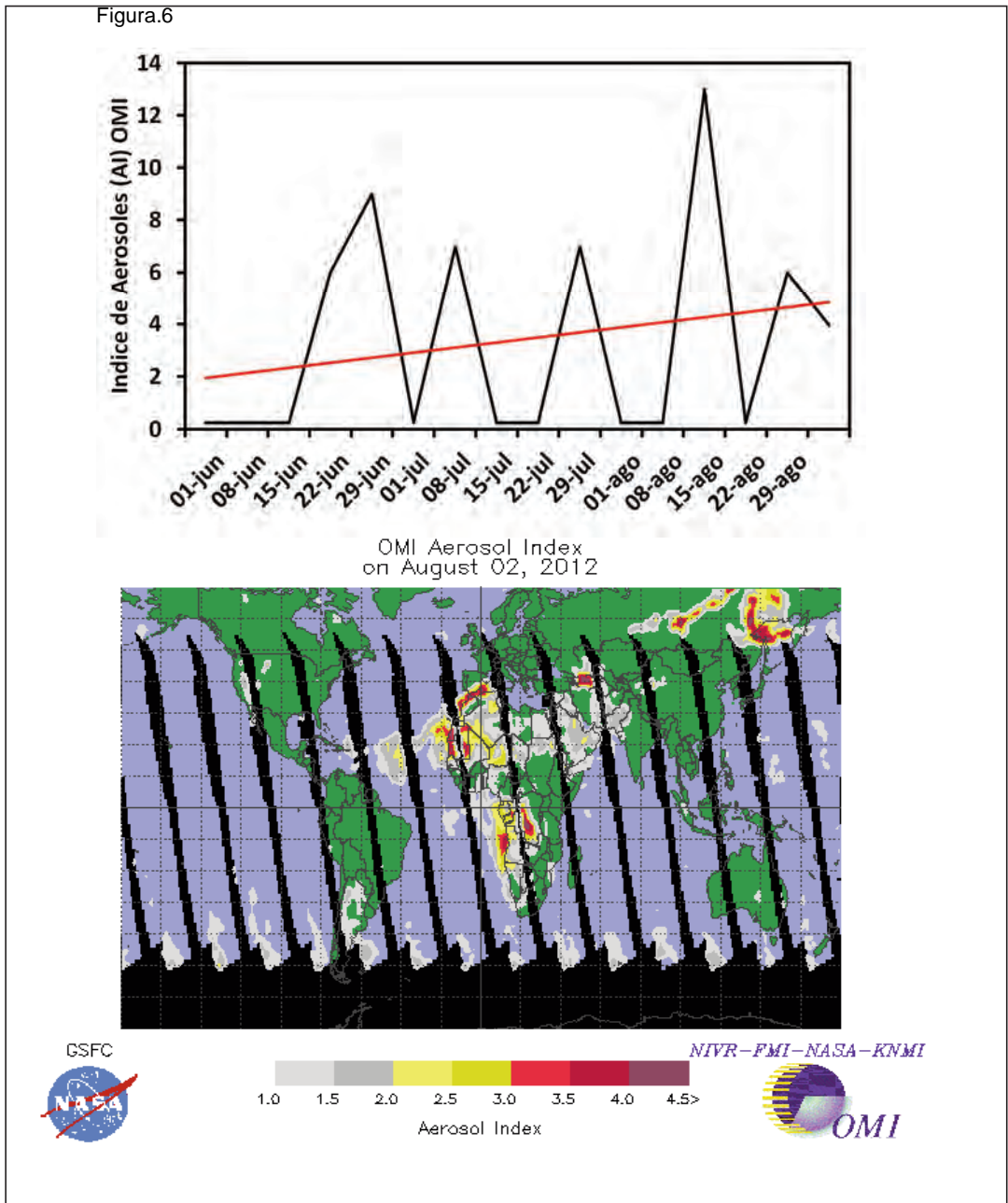


Figura 6. (A) Índice de Aerosoles (AI) obtenido a través del satélite OMI de la NASA para los meses de Junio-Agosto en el área de Sierra Nevada. (B) Imagen obtenida a través del satélite OMI del día 2 de Agosto que muestra las entradas de polvo sahariano que llegan al sur de la Península Ibérica.

Figure 6. (A) Aerosol Index (AI) obtained through the NASA OMI satellite for the months of June to August in the area of Sierra Nevada. (B) Image obtained through satellite OMI August 2 showing Saharan dust inputs arriving south of the Iberian Peninsula.

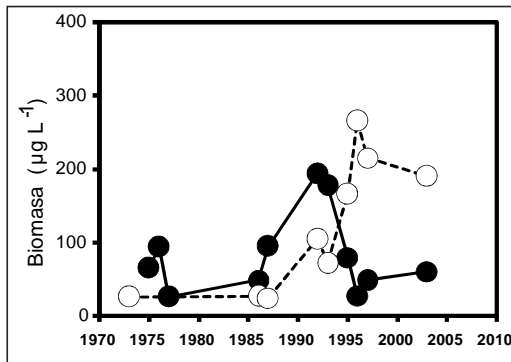


Figura 7. Dinámica a largo plazo de biomasa de fitoplancton (círculos blancos) y zooplancton (círculos negros) en la Laguna de la Caldera. Unidades de biomasa son μg de peso fresco L^{-1} de phytoplankton μg de peso seco L^{-1} para el zooplancton.
Figure 7. Long term dynamics of phytoplankton (white circle) and zooplankton biomass (black circle) in the Laguna de LA Caldera. Biomass units are μg fresh weight L^{-1} for phytoplankton and μg dry weight L^{-1} for zooplankton.

En relación con los efectos interactivos, en una escala temporal media, un enriquecimiento en fósforo de intensidad moderada y alta estimuló el consumo de P por las algas. Es interesante destacar que sólo el pulso intenso generó un efecto interactivo con UVR sobre el P sestónico, que se

propagó hasta la maquinaria fotosintética (Chl a datos no mostrados) e incrementó el efecto en las variables funcionales, como la producción primaria. Este efecto fue de naturaleza sinérgica, es decir, la adición de un pulso intenso de P desenmascaró el efecto negativo de la UVR, similar a los encontrado por KORBEE *et al.*, (2012) sobre escalas temporales medias y de CARRILLO *et al.*, (2008a) sobre escalas temporales largas.

Ambos pulsos, moderado e intenso, estimularon proporcionalmente la abundancia algal, aunque el pulso moderado incrementó 5 veces más la diversidad algal que el pulso intenso. Estos resultados evidencian la fuerte limitación por P que experimentan los organismos en estos ecosistemas y se corresponden con estudios previos que mostraban una ventaja competitiva de las algas para capturar el P disponible en forma pulsada, tanto en condiciones naturales (VILLAR-ARGAIZ *et al.*, 2001; MORALES-BARQUERO *et al.*, 2006b) como experimentales a diferentes escalas temporales de respuesta (horas, VILLAR-ARGAIZ *et al.*, 2002; días, CARRILLO *et al.*, 2008a), desarrollando estrategias de crecimiento masivo (ROMO y VILLENA, 2005; CARRILLO *et al.*, 2008b; DELGADO-MOLINA *et al.*, 2009).

Variable dependiente	Variable independiente	Beta	Múltiple r^2	r^2 cambio	df1	df2	F	p
Biomasa copépodos (log)	Precipitación	-0,842	0,78	0,61	2	34	12,27	0,008
	TOMS AI	-0,515	0,92	0,24	2	25	10,75	0,014
	UVR	0,306	0,97	0,09	2	35	8,09	0,029
Biomasa total zooplancton (log)	Precipitación	-0,853	0,78	0,62	2	34	12,84	0,007
	TOMS AI	-0,532	0,93	0,26	2	25	14,10	0,007
	UVR	0,309	0,98	0,09	2	35	15,26	0,008

Beta, coeficiente de regresión estandarizado; Múltiple r^2 , coeficiente de determinación múltiple; r^2 cambio, cambio en Múltiple r^2 causado por la introducción de una nueva variable en un solo paso (análisis jerárquico); df1, df2, grados de libertad; Fdf₁,df₂, resultados del F-test de la relación entre la variable dependiente y las variables independientes incluidas en el análisis.

Beta, coefficient of standardized regression; r^2 multiple, coefficient of multiple determination; r^2 change, change in Multiple r^2 caused by the introduction of a new variable in one-step (hierarchical analysis); df1, df2, degrees of freedom; Fdf₁,df₂, Results of F-test on the relationship between the dependent variable and the independent variables included in the analysis.

Tabla 2. Resultados del análisis de regresión múltiple por pasos entre el zooplancton y los predictores potenciales (precipitación, intensidad y frecuencia de TOMS-AI, UVR y temperatura) en el Lago de La Caldera.

Table 2. Results of multiple stepwise regression analysis between zooplankton and potential predictors (precipitation, intensity and frequency of TOMS-AI, UVR, and temperature) for Lake La Caldera.

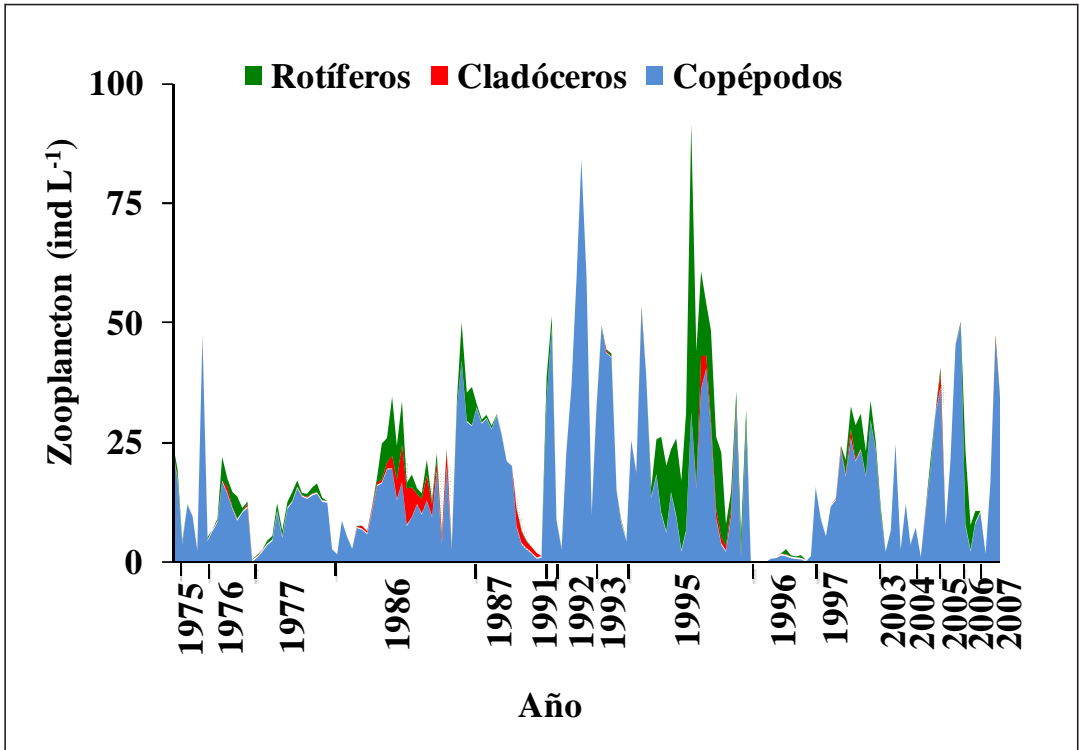


Figura 8. Dinámica a largo plazo de la contribución relativa de diversos grupos de zooplancton a la abundancia total de zooplancton para el período libre de hielo entre 1975 y 2007 en la Laguna de La Caldera.

Figure 8. Long-term dynamics of the relative contribution of various zooplankton groups to total zooplankton abundance for the ice-free period between 1975 and 2007 in Lake La Caldera.

Efectos interactivos UVR×Nutrientes:

Efecto de la frecuencia de pulsos de nutrientes

En el contexto de los recursos pulsados, los ecosistemas con entradas recurrentes de recursos, como los lagos del Sur de Europa, experimentan eventos que son impredecibles en su duración y magnitud (BOUTIN *et al.*, 2006). Por ello, una cuestión clave es conocer el efecto de la entrada de pulsos que difieren exclusivamente en su frecuencia, manteniendo la concentración del input de P y el tiempo de respuesta, sobre la estructura y funcionamiento de los productores primarios en ecosistemas oligotróficos claros.

Nuestros resultados evidencian un patrón muy consistente, ya que un pulso frecuente generó

una respuesta de mayor magnitud («menos es más») que un pulso único, para casi todas las variables respuesta analizadas. Sin embargo, la naturaleza de la interacción de UVR×Nutrientes-pulso de alta frecuencia, y UVR×Nutrientes-pulso de baja frecuencia fueron similares. Así, UVR×Nutrientes generó una respuesta sinérgica de signo positivo sobre las variables estequiométricas (P sestónico y razón C:P), es decir, los pulsos frecuentes o único incrementaron los efectos estimuladores de UVR. Por lo tanto, ambos factores actuaron equilibrando la composición elemental del fitoplancton para crecer. Este efecto se propagó con un incremento en la PP y una disminución de la liberación de carbono, que anuló los efectos negativos de la UVR sobre %EOC. El incremento en la incorporación de carbono ge-

neró una interacción sinérgica UVR×Nutrientes sobre la abundancia algal y un incremento de la diversidad, en línea con otros resultados en lagos de alta montaña (HALAC *et al.*, 1997), estuarios (MOSTAJIR *et al.*, 1999) y ecosistemas marinos costeros (VILLAFANE, 2004) sobre similares escalas temporales (15-20 días).

Es destacable el consistente efecto que UVR ejerce disminuyendo la razón C:P, tanto en condiciones no enriquecidas como tras el enriquecimiento con pulsos de distinta frecuencia. Este resultado concuerda con los obtenidos en estudios previos en este ecosistema (CARRILLO *et al.*, 2008b; KORBEE *et al.*, 2012), en lagos boreales (WATKINS *et al.*, 2001; XENOPOULOS *et al.*, 2002; TANK *et al.*, 2003), árticos (LEU *et al.*, 2007; HESSEN *et al.*, 2008) y andinos (SOUZA *et al.*, 2010). La disminución en la razón C:P por UVR se explica por el efecto estimulador de ésta sobre el contenido en P del seston; el mecanismo subyacente a este incremento en P sestónico puede estar relacionado con el efecto estimulador de la UVR sobre la actividad de la fosfatasa alcalina (APA) extracelular, que es una respuesta generalizada a la UVR en distintos tipos de ecosistemas: lagos de alta montaña (KORBEE *et al.*, 2012); lagos del escudo canadiense (SEREDA *et al.*, 2011) y ecosistemas marinos (HERRERA comunicación personal), y descarta el efecto depresor de la UVR sobre el consumo de P por las algas (HESSEN *et al.*, 1997). La interpretación de estos resultados implicaría que dosis bajas o moderadas de radiación UV podrían favorecer la incorporación de P, lo que podría compensar la disminución de la tasa de síntesis de proteínas bajo estrés por UVR, mediante la asignación de más P a los ribosomas, favoreciendo los procesos de fotorreparación.

La disminución de la razón C:P bajo UVR es atribuida a: (i) inhibición de adquisición de carbono (fotosíntesis neta reducida) (XENOPOULOS *et al.*, 2002.), (ii) incremento en la respiración o en la liberación de carbono (CARRILLO *et al.*, 2002; 2008a) y (iii) disminución en el crecimiento de bacterias, que son generalmente competidores más eficaces por el P, lo que resulta en una mayor disponibilidad de P para las algas (CURRIE y KALFF, 1984). En los presentes experimentos, sin

embargo, UVR no ejerció un efecto negativo sobre la incorporación de carbono ni sobre la respiración (Herrera, comunicación personal), aunque si aumentó las tasas absolutas y relativas de liberación de C en ausencia de enriquecimiento y en condiciones de pulso de baja frecuencia. Además, UVR ejerció un efecto inhibitorio sobre la producción bacteriana durante los experimentos (Cabrerizo, comunicación personal). Es importante destacar que en el presente estudio, la disminución de la C:P bajo UVR se debió principalmente a un aumento en el contenido de P sestónico. Debido a que el efecto dañino de la UVR depende más del estado nutricional de la célula que de la disponibilidad de nutrientes externos (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2002; 2006), este resultado puede contribuir a la comprensión de los mecanismos de aclimatación del fitoplancton en ecosistemas con alto flujo de UVR. Por lo tanto, el aumento del contenido de P junto al reciclaje intracelular del mismo podría satisfacer la necesidad de P para reparar las células (HESSEN *et al.*, 1995; LEU *et al.*, 2007; HESSEN *et al.*, 2008). De hecho, es conocido que las células aumentan su contenido en ARN (una biomolécula rica en P) bajo UVR para activar la producción de proteínas de reparación o proporcionar metabolitos necesarios para la reparación celular (por ejemplo, ATP) (HERAUD *et al.*, 2005; JAHID *et al.*, 2006). El fósforo también se requiere para la desaturación de ácidos grasos, ya que el grupo acilo se debe enlazar a fosfolípidos durante la inserción de dobles enlaces (HELDT y HELDT 2005). Este proceso es fundamental para mantener la funcionalidad de las membranas celulares, lo que implica la síntesis o la elongación de nuevos ácidos grasos poliinsaturados con un alto número de dobles enlaces en el fitoplancton, de ahí que la concentración de éstos se incremente por UVR (LEU *et al.*, 2007; VILLAR-ARGAIZ *et al.*, 2009).

Razones C:P equilibradas para crecer por la acción combinada de UVR y pulsos de P implicaron un incremento de clorofila *a* y de la producción primaria, evidenciándose a lo largo de distintos niveles de organización biológica (subcelular a comunidad) que el crecimiento de los autótrofos es modulado por ambos factores de estrés. Es particularmente relevante el efecto sobre la composición específica y la diversidad, con cambios

desde una comunidad dominada por autótrofos estrictos (clorofíceas), a codominancia de éstas con crisofíceas (*C. nevadensis*) e incluso la dominancia de las crisofíceas en el tratamiento de pulso único de P. Estos resultados contrastan con resultados publicados por XENOPOULOS *et al.* (2000) y XENOPOULOS y FROST (2003), y sugieren una mayor tolerancia de estas especies flageladas a altos flujos de UVR y pulsos de P. De acuerdo con MEDINA-SANCHEZ *et al.* (2004), esta tolerancia podría estar relacionada con su capacidad mixotrófica, que les permiten obtener nutrientes limitantes y carbono en condiciones de inhibición de la fotosíntesis, y con la posesión de flagelos, que les permiten desplazarse verticalmente en la columna de agua y evitar así las altas intensidades de UVR dominantes en estos ecosistemas de aguas transparentes (CARRILLO *et al.*, 1991; LEECH y WILLIAMSON, 2001).

El mayor crecimiento en términos de abundancia bajo UVR y condiciones enriquecidas está acompañado de una mayor diversidad algal, de modo que la entrada de pulsos de P de alta frecuencia eliminó el efecto inhibitorio de UVR sobre la diversidad, y el pulso único incluso invirtió este efecto. Estos resultados sugieren que existen umbrales temporales de respuesta de los organismos a partir de los cuales la respuesta neta a la combinación de factores invierte el efecto negativo que cada factor de cambio global por separado ejerce sobre los organismos.

Efectos interactivos UVR×Nutrientes:

Efecto del tiempo

El tiempo jugó un papel muy significativo sobre los patrones de respuesta a pulsos de alta intensidad en todas las variables, y modificó la naturaleza de los efectos interactivos generados por la acción simultánea de UVR y nutrientes. Así, a medio plazo (una semana), la razón C:P alcanzó valores próximos a 100, lo que implica que los autótrofos presentaban una razón óptima para crecer (STERNER y ELSER, 2002). De hecho, la abundancia algal incrementó 5 veces, sin diferencias entre los tratamientos de luz, y sin cambios en la diversidad. El efecto estimulador del P sobre el crecimiento del fitoplancton, que implica

un estímulo en la maquinaria fotosintética y en la incorporación de carbono, generó un desenmascaramiento o intensificación de los efectos dañinos de UVR (sinergismo). Esto es consistente con los hallazgos de estudios recientes (XENOPOULOS *et al.*, 2002; XENOPOULOS y FROST 2003; DOYLE *et al.*, 2005; CARRILLO *et al.*, 2008a; KORBEE *et al.*, 2012). KARENTZ *et al.* (1991) interpretan estos efectos como el resultado de un rápido crecimiento estimulado por el enriquecimiento con los nutrientes y una limitación en la tasa de síntesis de ADN. Así, puede haber una mayor propensión al daño del ADN inducido por UVR, haciendo los efectos de la radiación UV en la división celular más evidentes tras el enriquecimiento, aunque en nuestros experimentos este efecto sobre la abundancia no fue significativo. Sin embargo, el efecto intensificador de daño por UVR fue observado sobre la producción primaria, variable respuesta que no está necesariamente ligada a la división celular. En este caso, el desenmascaramiento o intensificación puede resultar de un aumento de la respiración oscura o la activación de sumideros alternativos de electrones, tales como la fotorrespiración o una reducción del oxígeno molecular (parte de la reacción de Mehler), como sugieren FLAMELING y KROMKAMP (1998). Mientras que el primer proceso puede considerarse como una pérdida de energía, el segundo puede conducir a estrés oxidativo y explicar el efecto negativo de la UVR observado.

Después de tres semanas de incubación, el agotamiento del input de P determinó una drástica disminución de la abundancia algal hasta niveles semejantes a los iniciales. Sin embargo, el conjunto de respuestas obtenidas de esta comunidad «residual» y su mayor desarrollo bajo UVR y P sugieren una aclimatación de las células a ambos factores de estrés. Esta aclimatación de la comunidad residual puede sustentarse por la acción conjunta de:

Mecanismos fisiológicos. La razón C:P se mantuvo equilibrada gracias a un incremento en el contenido en P del seston relacionado con procesos enzimáticos (KORBEE *et al.*, 2012), reciclado bacteriano y aumento en la liberación de carbono. Estos procesos implican eliminación de poder reductor (CARRILLO *et al.*, 2008a) e incremento en

nutrientes para reparar daños producidos por la UVR. La composición elemental equilibrada permite que la maquinaria fotosintética (concentración de clorofila) y la incorporación de carbono se pudieran mantener sin diferencias a lo largo del tiempo en los tratamientos con UVR. Estos mecanismos «homeostáticos» no funcionarían en ausencia de UVR (tratamientos [-UVR]).

Incrementos en la diversidad y cambios de la comunidad hacia la dominancia de mixótrofos. Esta variación estructural está sustentada en el metabolismo *mixotrófico* de las cristoófitas que les permitiría superar los efectos nocivos de la radiación UV (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2004) y desplazar a los *autótrofos* estrictos, menos competitivos a bajas concentraciones de nutrientes minerales disueltos (CHRISTAKI *et al.*, 1999).

Mecanismos ecológicos. La liberación de carbono por las algas permite el crecimiento de la comunidad bacteriana, lo que propicia la interacción mutualista, de forma que las bacterias reciclan los nutrientes minerales, facilitando el crecimiento de algas, o bien pueden crecer debido a su mayor capacidad de consumir P a bajas concentraciones y ser consumidas por las algas mixotróficas (DAUFRESNE y LOREAU, 2001; MEDINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2004; CARRILLO *et al.*, 2006).

De acuerdo con YANG *et al.* (2008), nuestros resultados evidencian que a pesar de que los recursos pulsados son eventos cortos por definición, los efectos ecológicos que generan persisten en el tiempo y se expresan incluso después de que el pulso haya cesado, de manera que los efectos obtenidos sobre variables estructurales ocurren con un desfase temporal y, por lo tanto, el estado de un sistema con pulsos recurrentes es la resultante de los «fantasmas» de recursos pulsados pasados (sensu YANG *et al.*, 2008).

Del conjunto de resultados obtenidos, y contrariamente a nuestra hipótesis de trabajo, podemos concluir que, a largo plazo, tras pulsos únicos-intensos, o frecuentes-moderados, se incrementa la diversidad de la comunidad planctónica, lo que implica una gran capacidad adaptativa y un incremento en la resiliencia del ecosistema frente a un aumento en la frecuencia de perturbaciones cli-

máticas que implican una mayor entrada de polvo sahariano (concentración de P).

En base a todo esto, consideramos pertinente proponer algunas implicaciones o conclusiones del presente estudio:

1. Los pulsos moderados de nutrientes tapan los efectos dañinos que UVR ejerce sobre los productores primarios, permitiendo la persistencia de las algas en estos ecosistemas altamente estresados por UVR, mientras que los pulsos intensos desenmascaran o acentúan los efectos dañinos sobre UVR.
2. La entrada frecuente de pulsos moderados ejerce un efecto estimulador mayor bajo UVR que el pulso único.
3. El incremento de diversidad tras el agotamiento del pulso de nutrientes nos indica que este ecosistema es muy resiliente, lo cual coincide con la idea de que la mayoría de las poblaciones de los sistemas naturales son dinámicamente estables a pesar de la considerable variabilidad ambiental. Por lo tanto, un paso más requiere modelar los límites de la resiliencia ecológica frente a periodos de rápidos cambio medioambiental.

Efectos interactivos UVRxnutrientes: Papel de la mezcla vertical

Nuestros resultados, sorprendentemente, muestran que imponer un régimen de radiación fluctuante (es decir, imitando la mezcla en la capa superior de los lagos estratificados, debido al calentamiento global) promueve la inhibición de los productores primarios por UVR en los ecosistemas opacos, efecto que se invierte después de los pulsos de nutrientes. Este resultado tiene importantes implicaciones en relación con el papel del carbono orgánico disuelto (DOC) como pantalla frente a la radiación ultravioleta.

En base a estos resultados, proponemos un modelo conceptual (Fig. 9) donde se incluyen algunas de las variables relacionadas con el cambio climático implícitamente consideradas en nues-

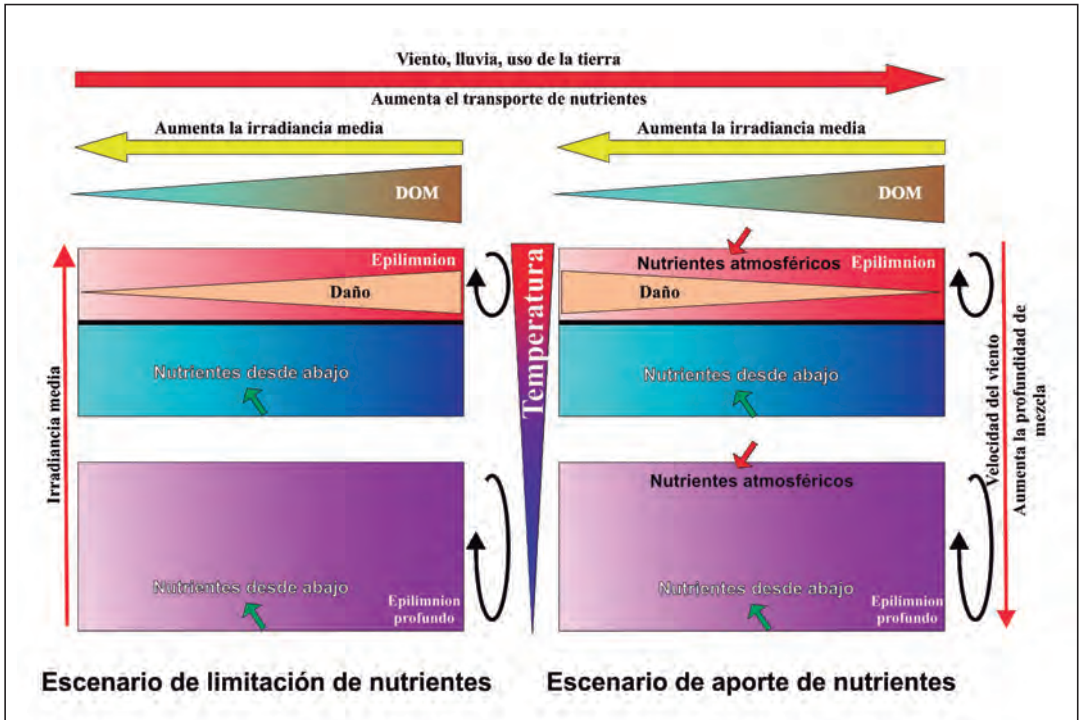


Figura 9. Modelo de gráfica conceptual de las respuestas fotosintéticas (PPp y EOC), cuando se somete a las interacciones entre la mezcla vertical, los nutrientes y la exposición a las fluctuaciones de la radiación UV. Los degradados de color indican la transparencia del color de agua. Las flechas indican entradas de nutrientes por debajo del epilimnion (verde) o por deposición atmosférica o uso del suelo (rojo). Gráfica modificada de HELBLING *et al.* (2012).

Figure 9. Conceptual graphical model of photosynthetic responses (PPp and EOC), when subjected to interactions among vertical mixing, nutrients and exposure to fluctuating UVR. Color gradients indicate water color transparency. Arrows indicates nutrients input from below the epilimnion (green) or from atmospheric deposition or land use (red). (Modified from HELBLING *et al.* (2012).

tro diseño experimental: (i) el aumento de la temperatura, que implicaría aislar el epilimnion de las aguas más profundas y más frías de la columna, y que impide que los nutrientes hipolimnéticos alcance zona fotoactiva (BEARDALL *et al.*, 2009; NEALE *et al.*, 2003), (ii) las cargas pulsadas de nutrientes por el viento o por escorrentía (LÓPEZ-MERINO *et al.*, 2011; CARRILLO *et al.*, 2008a; MORALES-BAQUERO *et al.*, 2006a); (iii) la mezcla vertical, debido al aumento del forzamiento del viento, la cual hace que las células queden expuestas a un campo de radiación fluctuante que va de baja irradiancia (en la base del epilimnion) hasta irradiancia máxima en la superficie.

Estos cambios en pulsos de nutrientes, junto con fluctuación de las condiciones de radiación, afectaría de forma distinta a los lagos cristalinos que a los más opacos. En conclusión, debido a su papel clave para el flujo de carbono, variables como la mezcla, la UVR y los nutrientes pueden actuar de manera sinérgica o antagónica dependiendo de la aclimatación al régimen de luz previo por parte de las algas. Esta interacción de factores no sólo afecta a la fotosíntesis y a la producción en los lagos, sino que podría también influir en el bucle microbiano y en las interacciones tróficas a través del incremento en la disponibilidad de carbono orgánico vía EOC (MEDINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2006) bajo exposición a la radiación UV fluctuante.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación otorgada por el Organismo Autónomo de Parques Nacionales (Ministerio de Medio Ambiente (PN2009/069), Ministerio Economía y

Competitividad (CGL2011-23681) y a la colaboración del Parque Nacional de Sierra Nevada. Cristina Durán, Guillermo Herrera y Marco J. Cabrerizo obtuvieron las correspondientes becas del Plan de 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.
- BARON, J. S., JULIUS, S. H., WEST, J.M., JOYCE, L. A., BLATE, G., PETERSON, C.H., PALMER, M., KELLER, D.B., KAREIVA, P., SCOTT, J. M. & GRIFFITH, B. 2008. Some guidelines for helping natural resources adapt to climate change. *IHDP Update* 46-52.
- BATTARBEE, R., COX, P., FREEMAN, C., LAWTON, J., MACE, G., MACKAY, A., READ, D. & SHEPHERD, J. 2008. *Biodiversity-climate interactions: adaptation, mitigation and human livelihoods*. The Royal Society. London.
- BEARDALL, J., SOBRINO, C. & STOJKOVIC, S. 2009. Interactions between the impacts of ultraviolet radiation, elevated CO₂, and nutrient limitation on marine primary producers, *Photochemical & Photobiology Science* 8:1257-1265.
- BENTON, T.G., JUSTIN, M. S., TRAVIS, M. J. & SATT, S. M. 2007. Microcosm experiments can inform global ecological problems. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 516-521.
- BERGERON, M. & VINCENT, W. F. 1997. Microbial food web response to phosphorus supply and UV radiation in a subarctic lake. *Aquatic Microbial Ecology* 12: 239-249.
- BERMAN-FRANK, I. & DUBINSKY, Z. 1999. Balanced growth in aquatic plants: myth or reality? *BioScience* 49: 29-37.
- BOUTIN, S., WAUTERS, L.A., MCADAM, A.G., HUMPHRIES, M.M., TOSI, G. & DHONDT, A.A. 2006. Anticipatory reproduction and population growth in seed predators. *Science* 314: 1928-1930.
- BULLEJOS, F.J., CARRILLO, P., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., VILLAR-ARGAIZ, M. 2010. Roles of phosphorus and ultraviolet radiation in the strength of phytoplankton-zooplankton coupling in a Mediterranean high mountain lake. *Limnology and Oceanography* 55: 2549-2562.
- 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. *Journal of Plankton Research* 19: 1565-82.
- CARPENTER, S.R., DEFRIES, R., DIETZ, T., MOONEY, H. A., POLASKY, S., REID, W. V. & SCHOLLES, R. J. 2006. Millennium Ecosystem Assessment: research needs. *Science* 314: 257-258.
- 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). *Archive fur Hydrobiologie*, 122: 57-67.
- 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. *Limnética* 25: 189-204
- 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 Biology* 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. *Limnology and Oceanography* 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. *Journal of Plankton Research* 17:1363-1379.
- CARRILLO, P., VILLAR-ARGAIZ, M. & MEDINA-SÁNCHEZ, J.M. 2008b. Does microorganism stoichiometry predict microbial food web interactions after a phosphorus pulse? *Microbial Ecology* 56: 350-363.
- CARRILLO, P., VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M. DELGADO-MOLINA, J.A. BULLEJOS, F., ROSILLO, S., DURÁN, C., FIGUEROA, F. & KORBEE, N. 2009. Especies claves en el funcionamiento de las redes tróficas pelágicas de ecosistemas de alta montaña: estrategias adaptativas. *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales 2005-2008*. pp. 145-174.
- CATALÁN, J., CAMARERO, L., FELIP, M., PLA, S., VENTURA, M., BUCHACA, T., BARTUMEUS, F., DE MENDOZA, G., MIRÓ, A., CASAMAYOR, E.O., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., BACARDIT, M., ALTUNA, M., BARTRONS, M. & DE QUIJANO, D.D. 2006. High mountain lakes: extreme habitats and witnesses of environmental changes. *Limnética* 25: 551-584.
- CURRIE, D.J. & KALFF, J. 1984. A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnology and Oceanography* 28: 298-310.
- CHRISTAKI, U., VAN WAMBEKE, F. & DOLAN, J.R. 1999. Nanoflagellates (mixotrophs, heterotrophs and autotrophs) in the oligotrophic eastern Mediterranean: standing stocks, bacterivory and relationships with bacterial production. *Marine Ecology-Progress Series*, 181: 297-307.
- CRAIN, C. M., KROEKER, K. & HALPERN, B. S. 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters* 11: 1304-1315.
- DARLING, E.S. & CÔTÉ, I.M. 2008. Quantifying the evidence for ecological synergies *Ecology Letters* 11:1278-1286.
- DAUFRESNE, T., & LOREAU, M. 2001. Ecological stoichiometry, primary producer-decomposer interactions, and ecosystem persistence. *Ecology* 82: 3069-3082
- DAVIDSON, A.T. & VAN DER HEIJDEN, A. 2000. Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 21:257-264.
- DELGADO-MOLINA, J.A., CARRILLO, P., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., VILLAR-ARGAIZ, M. & BULLEJOS, F.J. 2009. Interactive effects of phosphorus loads and ambient ultraviolet radiation on the algal community in a high-mountain lake. *Journal of Plankton Research* 31:619-634
- DOYLE, S.A., SAROS, J.E. & WILLIAMSON, C. E. 2005. Interactive effects of temperature and nutrient limitation on the response of alpine phytoplankton growth to ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* 50: 1362-1367.
- DURÁN, C. 2014. Multiple stressors acting on the algal-bacterial interaction in Mediterranean oligotrophic systems. Ph.D. dissertation, Granada University. 252 pp
- ESCUDERO, M., CASTILLO, S., QUEROL, X., ÁVILA, A., ALARCÓN, M., VIANA, M.M., ALASTUEY, A., CUEVAS, E. & RODRÍGUEZ, S. 2005. Wet and dry African dust episodes over eastern Spain. *Journal of Geophysical Research-Atmosphere*, 110, D18S08, doi: 10.1029/2004JD004731.
- FAUCHOT, J., GOSSELIN, M., LEVASSEUR, M., MOSTAJIR, B., BELZILE, C., DEMERS, S., ROY, S. & VILLEGAS, P. Z. 2000. Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton. *Journal of Phycology* 36: 484-496.
- FLAMELING I.A. & KROMPKAMP, J. 1998. Light dependence of quantum yield for PSII charge separation and oxygen evolution in eucariotic algae. *Limnology and Oceanography* 43: 284-297.
- 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. *Journal of Plankton Research* 19: 1671-86.
- HELBLING, E.W. & ZAGARESE, H. 2003. (eds.) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK, pp. 329-56

- HELBLING, E.W., CARRILLO, P., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., DURÁN, C., HERRERA, G., VILLARARGAIZ, M. & VILLAFANE, V. 2013. Interactive effects of vertical mixing, nutrients and ultraviolet radiation: In situ photosynthetic responses of phytoplankton from high mountain lakes of Southern Europe. *Biogeosciences* 10: 1037–1050.
- HELBLING, W.E., CARRILLO, P., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., DURÁN, C., HERRERA, G., VILLARARGAIZ, M. & VILLAFANE, V. 2012. Interactive effects of vertical mixing, nutrients and ultraviolet radiation: In situ photosynthetic responses of phytoplankton from high mountain lakes of Southern Europe. *Biogeosciences discussion* 9: 9791-9827, doi: 10.5194/bgd-9-97-91-9827.
- HELBLING, W.E., VILLAFANE, V.E., BUMA, A.G.J., ANDRADE, M. & ZARATTI, F. 2001. DNA damage and photosynthetic inhibition induced by solar ultraviolet radiation in tropical phytoplankton (Lake Titicaca, Bolivia). *European Journal of Phycology* 36: 157-166.
- HELDT, H.W. & HELDT, F. 2005. *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- HERAUD, P., ROBERTS, S., SHELLY, K. & BEARDALL, J. 2005. Interactions between UV-B exposure and phosphorus nutrition. II. Effects on rates of damage and repair. *Journal of Phycology* 41: 1212-1218.
- HESSEN, D.O., VAN DONK, E. & ANDERSEN, T. 1995. Growth responses, P-uptake and loss of flagella in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to UV-B. *Journal of Plankton Research* 17:17-27
- HESSEN, D.O., DE LANGE, H.J. & VAN DONK, E. 1997. UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshwater Biology* 38: 513-524.
- HESSEN, D.O., LEU, E., FÆRØVIG, P.J. & PETERSEN, S.F. 2008. Light and spectral properties as determinants of C:N:P ratios in phytoplankton. *Deep-Sea Research, PT II*, 55: 2169–2175.
- HILL, W.R. & FANTA, S.E. 2005. Phosphorus and light colimit periphyton growth at subsaturating irradiances. *Freshwater Biology* 53: 215-225.
- HIRIART, V.P., GREENBERG, B.M., GUILDFORD, S.J. & SMITH, R.E.H. 2002. Effects of ultraviolet radiation on rates and size distribution of primary production by Lake Erie phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 317-328.
- IPCC, 2007: *Climate Change 2007: The physical science basis*. Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Marquis, M., Averyt, K., Tignor, M.M.B., Miller, L.R., Jr, and Chen, Z. (ed). Cambridge University Press, New York, USA, 996 pp.
- JAHID, I.K., SILVA, J.A. & BENITEZ, J.A. 2006. Polyphosphate stores enhance the ability of *Vibrio cholerae* to overcome environmental stresses in a low-phosphate environment. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7043-7049.
- JURADO-GARCÍA, F., DE VICENTE, I., GALOTTI, A., ANDREAS, R., JIMÉNEZ-GÓMEZ, F. & GUERRERO, F. 2012. Effect of Drought Conditions on Plankton Community and on Nutrient Availability in an Oligotrophic High Mountain Lake Arctic, Antarctic, and Alpine Research 44: 50-61
- KARENTZ, S., CLEAVER, J.E. & MITCHELL, D.L. 1991. DNA damage in the Antarctic. *Nature*, 350, 28.
- KORBEE, N., CARRILLO, P., MATA, M.T., ROSILLO, S., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M. & FIGUEROA, F.L. 2012. Effects of ultraviolet radiation and nutrients on the structure-function of phytoplankton in a high mountain lake. *Photochemical & Photobiological Sciences* 11: 1087-1098.
- LEECH, D.M. & WILLIAMSON, C.E. 2001. *In situ* exposure to ultraviolet radiation alters the depth distribution of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 46: 416-420.
- LEU, E., FALK-PETERSEN, S. & HESSEN, D.O. 2007. Ultraviolet radiation negatively affects growth but not food quality of arctic diatoms. *Limnology and Oceanography* 52: 787-797.
- LIGNELL, R. 1990. Excretion of organic carbon by phytoplankton: its relation to algal biomass, primary productivity and bacterial secondary productivity in the Baltic Sea. *Marine Ecology-Progress Series* 68: 85-99.
- LITCHMAN, E., NEALE, P.J. & BANASZAK, A.T. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnology and Oceanography* 47: 86-94.

- LÓPEZ-MERINO, L., MORENO, A., LEIRA, M., SIGRÓ, J., GONZÁLEZ-SAMPÉRIZ, P., VALERO-GARCÍES, B.L., LÓPEZ-SÁEZ, J.A., BRUNET, M. & AGUILAR, E. 2011. Two hundred years of environmental change in Picos de Europa National Park inferred from sediments of Lago Enol, northern Iberia. *Journal of Paleolimnology* 46: 453-467.
- 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 Biology* 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. *Limnology and Oceanography* 49: 1722-33.
- MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., VILLAR-ARGAIZ, M. & CARRILLO, P. 2006. Solar radiation-nutrient interaction enhances the algae-bacteria link in a high-mountain lake. *Limnology and Oceanography* 51: 913-924.
- MORALES-BARQUERO, R., CARRILLO, P., BAREA-ARCO, J., PÉREZ-MARTÍNEZ, C. & VILLAR-ARGAIZ, M. 2006a. Climate-driven changes on phytoplankton-zooplankton coupling and nutrient availability in high mountain lakes of Southern Europe. *Freshwater Biology* 51: 989-998.
- MORALES-BAQUERO, R., PULIDO-VILLENA, E. & RECHE, I. 2006b. Atmospheric inputs of phosphorus and nitrogen to the southwest Mediterranean region: Biogeochemical responses of high mountain lakes. *Limnology and Oceanography* 51: 830-37.
- MOSTAJIR, B., DEMERS, S., DE MORA, S., BELZILE, C., CHANUT, J.P., GOSSELIN, M., ROY, S., VILLEGAS, P.Z., FAUCHOT, J. & BOUCHARD, J. 1999. Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnology and Oceanography* 44: 586-596.
- NEALE, P.J., HELBLING, E.W., & ZAGARESE, H.E. 2003. Modulation of UVR exposure and effects by vertical mixing and advection, in: *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*, Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology, edited by: Helbling, E.W., Zagarese, H.E., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 108-134.
- PULIDO-VILLENA, E., RECHE, I. & MORALES-BAQUERO, R. 2005. Significance of atmospheric inputs of calcium over the southwestern Mediterranean region: High mountain lakes as tools for detection. *Global Biogeochemical Cycles*, 20. doi:10.1029/2005GB002662.
- ROMO, S. & VILLENA, M.J. 2005. Phytoplankton strategies and diversity under different nutrient levels and planktivorous fish densities in a shallow Mediterranean lake. *Journal of Plankton Research* 27: 1273-1286.
- SEREDA, J.M., VANDERGUCHT, D.M. & HUDSON, J.J. 2011. Disruption of planktonic phosphorus cycling by ultraviolet radiation. *Hydrobiologia* 665: 205-217.
- SOUZA, M.S., MODENUTTI, B.E., CARRILLO, P., VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., BULLEJOS, F.J. & BALSEIRO, E.G. 2010. Stoichiometric dietary constraints influence the response of copepods to UVR induced oxidative stress. *Limnology and Oceanography* 55: 1024-1032.
- SPACEBASED-MEASUREMENTS OF OZONE AND AIR QUALITY. 2012. <http://ozoneaq.gsfc.nasa.gov/OMIAerosol.md> (accessed 1 September 2012).
- STATSOFT, INC. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
- STEFFEN, W., SANDERSON, A., TYSON, P., JAEGER, J., MATSON, P., MOORE, B., OLDFIELD, F., RICHARDSON, K., SCHELLNHUBER, H., TURNER, B. & WASSON, R. 2004. *Global change and the Earth system: a planet under pressure*. 1st ed. Springer, New York, 332.
- STEEMANN-NIELSEN, E. 1952. The use of radioactive carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*, 18: 117-140.
- STERNER, R.W. & ELSER, J.J. 2002. *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- STRASKRABOVA, V., CALLIERI, C. & FOTT, J. 1999. Pelagic food webs in mountain lakes-Mountain Lakes Research Program. *Journal of Limnology* 58: 77-222.

- TALLIS, H., KAREIVA, P., MARVIER, M. & CHANG, A. 2008. An ecosystem services framework to support both practical conservation and economic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 9457-9464.
- TANK, S.E., SCHINDLER, D.W. & ARTS, M.T. 2003. Direct and indirect effects of UV radiation on benthic communities: epilithic food quality and invertebrate growth in four mountain lakes. *Oikos*, 103: 651-667.
- THOMAS, C.D., FRANCO, A. M.A. & HILL, J.K. 2006. Range retractions and in the face of climate warming. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 415-416.
- UTHERMÖL, H. 1958. Zur wemlkommung der quantitative phytoplankton methidik. *Mitt International Verein Limnologie* 9:1-38.
- VILLAFANE, 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. *Aquatic Microbial Ecology* 29: 253-266.
- VILLAR-ARGAIZ, M., BULLEJOS, F.J., RAMOS-RODRÍGUEZ, E., MEDINA-SÁNCHEZ J.M. & CARRILLO, P. 2012. Disentangling food quantity and quality effects in zooplankton response to P-enrichment and UV radiation *Limnology and Oceanography* 57: 235-250.
- VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., BULLEJOS, F.J., DELGADO- MOLINA, J. A. RUIZ-PEREZ, O., NAVARRO, J. C. & CARRILLO, P. 2009. UV radiation and phosphorus interact to influence the biochemical composition of phytoplankton *Freshwater Biology*. 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 Biology* 46: 1017-34.
- 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.
- WATKINS, E.M., SCHINDLER, D.W., TURNER, M.A. & FINDLAY, D. 2001. Effects of solar ultraviolet radiation on epilithic metabolism, and nutrient and community composition in a clear-water boreal lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 2059-2070.
- WILLIAMSON, C.E., SAROS, J.E. & SCHINDLER, D.W. 2009. Sentinels of change. *Science* 323: 887–888.
- XENOPOULOS, M.A. & FROST, P.C. 2003. UV radiation, phosphorus, and their combined effects on the taxonomic composition of phytoplankton in a boreal lake. *Journal of Phycology* 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.
- XENOPOULOS, M.A., PRAIRIE, Y.T. & BIRD, D.F. 2000. Influence of ultraviolet-B radiation, stratospheric ozone variability, and thermal stratification on the phytoplankton biomass dynamics in a mesohumic lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 600-609.
- YANG, L., BASTOW, J., SPENCE, K. & WRIGHT A.N. 2008. What can we learn from resource pulses? *Ecology* 89: 621-634.