







# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva  
Departamento de Microbiología y Ecología  
Programa de Doctorado en  
Biodiversidad y Biología Evolutiva

## **Ciclo del carbono y modelización biogeoquímica de un lago somero hipertrófico: la Albufera de Valencia**

Carbon cycling and biogeochemical modelling  
of a hypertrophic shallow lake:  
Albufera de Valencia

Gabriela Onandia Bieco, 2015

Dirigida por:

Maria Rosa Miracle Solé  
Eduardo Vicente Pedrós



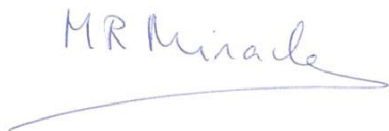


Tesis presentada por Gabriela Onandia Bieco para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Valencia



Firmado: Gabriela Onandia Bieco

Tesis dirigida por los doctores Maria Rosa Miracle Solé y Eduardo Vicente Pedrós.



Firmado: M<sup>a</sup>Rosa  
Miracle Solé

Firmado: Eduardo  
Vicente Pedrós

Este trabajo ha sido financiado por un proyecto del Ministerio de Innovación y Ciencia (CGL2009-12229) y una beca predoctoral FPI (BES-2010-032212).



*A Acame,  
mis padres  
y mi hermano*

*¿Será un ser vivo  
muere y nace otra  
vez la primavera?*

*Chuan-Mi*



## Agradecimientos

Amanece mientras me siento a pensar en la aventura que ha supuesto el escribir esta tesis y en las muchas personas que me han acompañado. Entre ellas, quiero agradecer especialmente a mis padres y a mi hermano su apoyo incondicional durante todos estos años. También a Acame, por estar ahí literalmente día tras día. Aunque estas palabras no pueden expresar completamente mi gratitud: ¡Muchísimas gracias por todo!

Agradecer también a mis directores la posibilidad de participar en este proyecto de investigación, que despertó en mí la curiosidad por realizar una tesis doctoral. Rosa, gracias por todos los conocimientos que has compartido conmigo y por tu inmensa disponibilidad y disposición para responder a tantas y tantas preguntas. Gracias Eduardo por tu apoyo y por cuidar en todo momento de los detalles logísticos necesarios para poder llevar a término este trabajo. Agradeceremos a ambos además vuestra gran implicación en todos los trabajos de campo y laboratorio.

Cristina, ¿qué decirte? Sabes lo agradecida que te estoy por lo mucho que me has ayudado, pero ante todo, por tu amistad: gracias. Siempre recordaremos los planetas alineados sobre la Albufera y el monstruo del embarcadero ;). Carlos, sin palabras. Mil gracias por tu paciencia, por tu disposición y por haberme enseñado tantas cosas. Toni, me has brindado tu consejo y ayuda en los momentos más críticos: muchísimas gracias. Gracias a todas las personas del departamento por contribuir de una u otra manera a esta empresa: Ana Amorin, Juan Antonio Villaescusa, María Sahuquillo, Mari Loli Sendra, Antonio Picazo, Carmen Ferriol, Raquel Ortells, Javier Armengol, Jose Antonio-Gil Delgado, Francesc Mezquita, y sobre todo, a los compañeros con los que he compartido muchos ratos y algunas veladas en la Albufera y sus acequias, pero también en el laboratorio: Cristina, Juan Miguel Soria, Xavi Soria, Olga Kramer y Juliana Dias. Como no, agradecer también al personal de la Oficina Técnica Devesa-Albufera, y en especial a Pepe y Rebeca, que hicieran posibles nuestros muestreos.

The stays abroad have been a very meaningful part of my PhD. I have felt at home both in Veszprém and in Toronto thanks to the wonderful people I met. I would like to especially thank Judit Padisák for giving me the opportunity to join the limnology group and having such an enriching experience in Hungary: Köszönöm! Thanks also to the colleges there: Katja, Katja, Suszan, Vicky, Ernő and of course my adventures's companion: Paula.

Likewise, I feel extremely grateful to George Arhonditis for offering the chance to join the Ecological Modelling Lab and learning so much: THANKS! I would also like to thank the whole team for sharing their knowledge but most important, for their friendship: Yuko, Mary, Maryam, Gurbir, Vicent, Alex, Dong-Kyun, Tony, Monir, Samarth, Ariola, Chrysa, Chris and Serguei. Also during my stays in Canada, I enjoyed the company of very good friends like María, Temok, Janet and Vicky, the people of Wine&Yoga, my camping friends, and above all, the great support of Marie, Greg, Athyo and D.J: Thank you!

También me siento muy afortunada por los momentos geniales que he compartido a lo largo de estos años con mis amigos: Sara, Jose Luis, Elena, Jonás, Nick, Alis, Iván, Maria y Mari, Blanca, Juan Mi, Tere, Anna-Karin, Luisa, Pedro, Felo, Eva, Belén, Jose, Susana y los carallos: Juanciño, Guillermo y David. Sara, gracias por estar siempre. Alis, gracias por esa frase tuya tan sabia. Además, me siento afortunada por los nuevos amigos que me ha regalado Valencia: Paco, David, Pietro, Itzi, Sara, David Flores, René, Clara, Carla, Nayeli, Alba, Iván, Maru, Sara, Maykol, Fátima, Vanesa, Priscila, Mycon. Gracias también a la familia Vidal Tomás al completo y como no a Mari y familia. Por último, Carla, gracias por el apoyo en esta última etapa de la tesis, y Alba, Iván y Nayeli, por vuestro gran empujón en la recta final.

¡Gracias también por las horas llenas de tai-chí a Magda y mis compis y por esas horas llenas de música que duran minutos a los Thirty Silver Coins!

Quiero agradecer al Ministerio de Innovación y Ciencia la financiación de esta tesis doctoral a través de una beca FPI (BES -2010-032212) y de sus ayudas asociadas para la realización de estancias breves, así como por la financiación del proyecto en el que esta se enmarca (CGL2009-12229). Además, agradezco la información cedida por la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) y la Confederación Hidrográfica del Júcar.

¡Gracias a todos!

## Abstract

Shallow lakes are one of the most abundant lake type in the world. During the last decades, many of these lakes have shifted from a clear to a turbid state as a consequence of cultural eutrophication. This is the case of Albufera de Valencia, a lake that shifted to turbid state in the beginning of the 1970s. Today the lake remains turbid and can be regarded as hypertrophic, therefore illustrating the final state of eutrophication. The present work aims to improve the knowledge on the ecological functioning of shallow hypertrophic lakes, for which information is scarce, especially in the warm-temperate zone. In order to do so, we investigated diel and seasonal variations in bacterial secondary production (BP) by measuring  $^3\text{H}$ -leucine and  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation rates (LIR and TIR). We assessed the effect of light/dark incubations on LIR and TIR and explored the upper limit of BP in hypertrophic systems. In the present work, we also analysed the diel and seasonal variations in phytoplankton primary production (PP) and its relationship with BP. Moreover, we characterized the grazing habits of the natural zooplankton community in the lagoon during two distinct periods: end of winter/onset of spring and mid spring, characterized by non-cyanobacteria vs cyanobacteria dominance, respectively. Likewise, we studied the contribution of different algal and bacterioplankton size fractions to zooplankton feeding. Finally, we developed a model aiming to reproduce the ecological processes that determine phytoplankton dynamics in the lake. The model simulates two elemental cycles (N and P), two phytoplankton groups (cyanobacteria and non-cyanobacteria), and heterotrophic bacteria. We examined the ability of the model to simulate the observed plankton dynamics, while taken into consideration the uncertainty associated with the external forcing factors. We performed a sensitivity analysis to detect the most influential parameters and utilized the model to evaluate the phytoplankton response to potential restoration actions. These actions involved the modification of both external nutrient loadings and flushing rates. We found that under hypertrophic conditions, bacterial activity shows an evident diel pattern with an increasing trend during the night that opposes diel variations in DOC. Our study indicates that BP remains fairly constant across seasons but declines in late winter during a period of high water flow through the lagoon and concomitant minimum chlorophyll-*a* values. Seasonal variations in the LIR:TIR ratio are apparently related to dissolved organic carbon (DOC) availability, with higher concentrations favoring the incorporation of leucine. The light:dark ratio of LIR and

TIR is close to 1 but tends to be  $>1$  when DOC concentrations were lower, namely in winter. In view of the latter results, we support the use of either light or light/dark combined incubations for the estimation of BP. Despite our BP estimations are considerably high, they do not exceed previous values in hypertrophic lakes. In the present study, we found that PP displays noticeable diurnal variations defined by the solar radiation curve. Likewise, PP changes significantly across seasons, reaching the maximum in spring concomitant to high chlorophyll-*a* levels, and the minimum in winter, coinciding with maximum water transparency and short water residence times. Our results suggest that there is no coupling between PP and BP, with a possible explanation being the high availability of dissolved organic carbon in the water column. Further, our findings indicate that the extracellular dissolved organic carbon released by phytoplankton is sufficient to meet bacterial carbon demand in the experimental dates explored, suggesting that allochthonous carbon sources play a minor role in sustaining BP, though they cannot be excluded. Our work concerning zooplankton grazing shows that clearance rates (CR's) of *Daphnia magna* (dominant species in the end of winter/onset of spring), and *Bosmina longirostris* (dominant species in mid spring) for phytoplankton and bacteria are low, probably as a result of the high abundance of filamentous cyanobacteria. Whereas *D. magna* displays unselective feeding habits, with practically equal CR's for phytoplankton and bacteria, *B. longirostris* feeds preferably on cells 1-15  $\mu\text{m}$ . According to our results, the microbial loop and the classical grazer trophic web are strongly coupled during early spring in the lake. However, during periods of cyanobacteria dominance, the coupling between the microbial and classical trophic webs is weak, and therefore the microbial loop contributes poorly to the energy transfer to higher trophic levels. Our study also indicates that a negligible proportion of the standing stock of bacteria and especially phytoplankton biomass is consumed by zooplankton grazing, supporting the idea that the ability of zooplankton to control phytoplankton growth in hypertrophic systems is reduced. Finally, we developed a biogeochemical model that successfully simulates a series of important water quality variables in the ecosystem, comprising total chlorophyll-*a*, nitrate, ammonia, total nitrogen and total phosphorus. The sensitivity analyses revealed that the portrayal of the phytoplankton growth strategies and related settling rates is critical for obtaining a model that can be reliably utilized as a management instrument. We identified the external nitrogen and phosphorus loadings as the dominant factors defining the system dynamics and therefore, their control should constitute the main target of local management plans. Finally, our results indicate that the manipulation of the flushing rate of the lagoon could additionally serve as an efficient management tool for its restoration.



# Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	17
Los lagos someros eutróficos .....	19
Caso de estudio: la Albufera de Valencia .....	23
Producción por parte del bacterioplancton heterótrofo en condiciones hipertróficas .....	27
Producción primaria fitoplanctónica en condiciones hipertróficas .....	28
Características filtradoras de la comunidad zooplanctónica en condiciones hipertróficas .....	29
Los modelos ecológicos como herramienta de conocimiento y gestión de los ecosistemas acuáticos: el caso de la Albufera de Valencia .....	30
Objetivos .....	33
Estructura de la tesis y descripción de los capítulos que la componen .....	34
<b>Parte I. Ciclo de carbono en la Albufera de Valencia</b> .....	39
Capítulo I. Variaciones diarias y estacionales de producción bacteriana en un lago somero hipertrófico .....	41
Capítulo II. Producción primaria en condiciones hipertróficas y su relación con la producción bacteriana .....	57
Capítulo III. Consumo de poblaciones naturales de algas y bacterias por el zooplancton en condiciones hipertróficas .....	77
<b>Parte II. Modelización biogeoquímica de la Albufera de Valencia</b> .....	115
Capítulo IV. Hacia el desarrollo de un modelo biogeoquímico para abordar los problemas de eutrofización en el lago somero hipertrófico de la Albufera de Valencia, España .....	117
<b>Parte III. Síntesis de resultados y discusión general</b> .....	139
Capítulo V. Resumen global .....	141
Lugar de estudio .....	143
Metodología y diseño experimental .....	144
Resultados	
Producción por parte de las bacterias heterótrofas en condiciones hipertróficas .....	156
Producción primaria fitoplanctónica en condiciones hipertróficas y su relación con la producción bacteriana .....	158
Características filtradoras de la comunidad zooplanctónica en condiciones hipertróficas .....	161
Los modelos ecológicos como herramientas de conocimiento y gestión de los ecosistemas acuáticos: el caso de la Albufera de Valencia .....	162
Capítulo VI. Discusión global .....	171
<b>Conclusiones</b> .....	189
Conclusions .....	195
<b>Bibliografía referente a la introducción y los capítulos V y VI</b> .....	199



## Resumen

Los lagos someros son uno de los ecosistemas acuáticos más numerosos a nivel global y hacen posible el desarrollo de multitud de actividades de interés económico y recreativo. En las últimas décadas, gran parte de estos lagos se han visto sujetos a un proceso de eutrofización cultural que a menudo conlleva una transición desde un estado “claro” caracterizado por una alta transparencia del agua y gran abundancia de macrófitos, a un estado “turbio” caracterizado por una baja transparencia del agua, dominancia de fitoplancton y macrófitos sumergidos prácticamente ausentes. El cambio que experimentó la Albufera de Valencia al estado turbio a principios de los años 1970 como resultado de un intenso proceso de eutrofización cultural, ejemplifica de manera representativa esta transición. A pesar de la ejecución en la década de los años 1990 de un plan de depuración de las aguas residuales vertidas al lago y de la reciente construcción de varios filtros verdes, a día de hoy la Albufera de Valencia es un lago hipertrófico en estado turbio. No obstante, a finales de invierno y de manera recurrente, se producen en el lago “eventos de aguas claras”. Estos eventos están propiciados principalmente por el incremento del flujo de agua circulante a través del lago, que tiene lugar cuando el agua contenida en los arrozales inundados circundantes se vierte al mar pasando por el lago y exportando gran parte de la biomasa fitoplanctónica. Como consecuencia, la transparencia del agua aumenta notablemente, se produce una marcada reducción en la proporción relativa de cianobacterias y un crecimiento de *Daphnia magna* en el lago. No obstante, se desconocía la influencia de estos eventos en diversos procesos tales como la producción primaria fitoplanctónica y la producción por parte de las bacterias heterótrofas. Asimismo, tampoco existía información referente a la posible influencia de la tasa de renovación del agua del lago en el acoplamiento entre la producción primaria y bacteriana o la transferencia de carbono de estos niveles tróficos al zooplancton. La investigación de estas cuestiones referentes al ciclo del carbono, es

---

esencial para mejorar el conocimiento sobre el funcionamiento ecológico de los lagos hipertróficos. Estos lagos representan el último estadio del proceso de eutrofización, siendo cada vez más numerosos debido al acelerado impacto antrópico. Sin embargo, la información disponible sobre ellos es limitada, en especial para aquellos situados en las zonas templadas cálidas y en latitudes subtropicales o tropicales. En este contexto, los modelos ecológicos constituyen una herramienta de gran utilidad, permitiendo ampliar la comprensión de los procesos ecológicos asociados a la eutrofización y facilitando el diseño de planes de gestión dirigidos a la mejora del estado ecológico de los lagos. La presente tesis tiene como objetivo el estudio de distintos procesos implicados en el ciclo del carbono (*e.g.* producción primaria fitoplanctónica, producción bacteriana, transferencia de carbono al zooplancton, etc...), así como el desarrollo de un modelo biogeoquímico de la Albufera de Valencia.

En primer lugar, dentro del marco general expuesto, se han estudiado las **bacterias heterótrofas**, que desempeñan un papel clave en las redes tróficas acuáticas como principales descomponedoras de materia orgánica y eslabón entre la materia orgánica disuelta y los niveles tróficos superiores. En particular, esta investigación pretende evaluar diversos aspectos referentes a la **producción bacteriana** heterótrofa tales como: i) la existencia de variaciones a escala diaria y estacional, y si estas últimas están asociadas a cambios en la tasa de renovación del lago; ii) los posibles efectos (estimulación/inhibición) de las condiciones de incubación (luz/oscuridad) en las tasas de incorporación de leucina y timidina; y iii) contribuir a ampliar el conocimiento disponible sobre el límite superior de la producción bacteriana en lagos hipertróficos. Para ello, se realizaron dos series de experimentos: la primera serie, dirigida principalmente a evaluar las variaciones estacionales de producción bacteriana y los efectos de las condiciones de incubación, se llevó a cabo *in situ* y comprendió medidas de producción bacteriana realizadas en invierno y verano a mediodía y por la tarde, tanto en condiciones de exposición a la luz como en la oscuridad y a las profundidades de 0,2, 0,8 y 1,1 m; la segunda serie de experimentos, dirigida a

comprobar la existencia de un patrón diario de producción bacteriana, consistió en dos ciclos que incluyeron incubaciones *in situ* efectuadas cada 4 horas durante 24 horas a una profundidad de 0,6 m y en condiciones de iluminación durante la primavera, época de máximo crecimiento del fitoplancton. La producción bacteriana fue estimada simultáneamente a partir de las tasas de incorporación de un aminoácido y un nucleótido marcados con tritio ( $^3\text{H}$ -leucina y  $^3\text{H}$ -timidina), que en lo sucesivo se denominarán LIR y TIR, respectivamente. Las bacterias heterótrofas fueron enumeradas en muestras teñidas con DAPI utilizando un microscopio de epifluorescencia (Zeiss III RS) y a continuación, el volumen celular fue estimado en base a medidas obtenidas de las microfotografías tras asimilar los distintos morfotipos bacterianos a formas geométricas. El contenido de carbono celular se obtuvo aplicando un factor de conversión de  $0,2 \text{ pg C } \mu\text{m}^{-3}$ .

Nuestros resultados confirman la existencia de un patrón diario de producción bacteriana en el lago, definido por una tendencia ascendente durante las horas de oscuridad y un evidente descenso al amanecer. El carbono orgánico disuelto (DOC) muestra un patrón diario opuesto en el ciclo diario. Atendiendo al ratio LIR:TIR, podemos afirmar que se produce una síntesis proporcionada de proteínas y ADN a escala diaria. Sin embargo, los experimentos con una mayor resolución temporal, realizados en primavera, indican que la síntesis de proteínas está ligeramente favorecida hacia el anochecer.

A escala estacional, no se producen grandes fluctuaciones en la producción bacteriana. No obstante, sí tiene lugar una cierta disminución en el periodo invernal, durante el que disminuye la abundancia fitoplanctónica a causa de una menor radiación incidente y especialmente de un mayor flujo de agua a través del lago, lo que se traduce en un marcado incremento de la transparencia del agua. Posteriormente, en primavera, se observa un aumento de la producción bacteriana asociado al máximo de clorofila-*a*, que se hace patente por el consiguiente incremento en la turbidez del agua. Por el contrario, el ratio LIR:TIR sí muestra variaciones

---

estacionales. En concreto, la síntesis de proteínas (*i.e.* los valores más elevados) está aparentemente favorecida por las mayores concentraciones de DOC, observadas en verano. Los valores de producción bacteriana obtenidos en condiciones de luz y oscuridad son semejantes. Sin embargo, nuestros resultados indican que la producción bacteriana parece estar ligeramente potenciada por la luz y que existe una posible interacción entre la disponibilidad de luz y nutrientes. Por una parte, la correlación positiva entre el ratio luz:oscuridad de LIR y amonio sugiere que las concentraciones de este nutriente modulan, al menos en parte, la incorporación de aminoácidos por parte de las bacterias heterótrofas. Asimismo, la correlación negativa entre el ratio luz:oscuridad de TIR y el DOC indica que la luz puede favorecer la incorporación de leucina y timidina cuando la disponibilidad de DOC es baja, posiblemente mediante la estimulación de la producción de carbono orgánico disuelto por parte del fitoplancton. En el marco de la literatura disponible para lagos hipertróficos, los valores de producción bacteriana obtenidos en la Albufera de Valencia, de aproximadamente 186 - 390 mg C m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, son considerablemente elevados pero no exceden el máximo descrito.

En los lagos someros en estado turbio, la gran **biomasa fitoplanctónica** restringe la disponibilidad de luz a una estrecha franja bajo la superficie. Como resultado, el crecimiento de epífitos, macrófitos sumergidos y fitobentos se ve limitado, y la **producción fitoplanctónica** constituye la principal aportación a la producción primaria total del lago. En consecuencia, cabe esperar que las variaciones diarias y estacionales de producción fitoplanctónica modulen de manera relevante las interacciones y transferencia de carbono a otros niveles tróficos como las bacterias heterótrofas o el zooplancton. El estudio de la producción fitoplanctónica y su relación con la producción bacteriana es de gran relevancia para mejorar el conocimiento sobre el ciclo del carbono y el funcionamiento ecológico de los lagos hipertróficos. En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivos: i) evaluar las variaciones a escala diaria de producción primaria; ii) evaluar las fluctuaciones

estacionales de producción primaria, especialmente en relación a cambios en la tasa de renovación de agua del lago; y iii) explorar si la producción primaria y bacteriana responden de manera similar a tales cambios. Con el fin de investigar estas cuestiones, se realizaron dos series de experimentos de manera simultánea a los experimentos de producción bacteriana ya descritos. La producción primaria por parte del fitoplancton fue estimada a partir de la incorporación de bicarbonato sódico marcado con carbono-14. Las diferentes especies de fitoplancton fueron enumeradas en muestras preservadas con lugol utilizando un microscopio invertido y a continuación el volumen celular fue calculado asimilando los organismos a formas geométricas.

La producción primaria muestra notables variaciones diarias definidas por las fluctuaciones en la disponibilidad de luz a lo largo del día. El máximo observado a mediodía contrasta con la disminución superficial con respecto a capas más profundas descrita por otros estudios a esta hora. Este hecho se explica por la ausencia de fotoinhibición cerca de la superficie derivada del efecto de sombra producido por la elevada biomasa fitoplanctónica presente en la columna de agua.

A escala estacional también se producen marcadas fluctuaciones de producción primaria. Los valores más bajos se dan en invierno coincidiendo con las tasas más altas de renovación de agua del lago, que conllevan una disminución de la biomasa de fitoplancton y a su vez un incremento en la transparencia del agua. Los valores máximos tienen lugar a finales de primavera, asociados a bajas tasas de renovación de agua del lago, así como a una gran biomasa fitoplanctónica y una elevada turbidez del agua. En verano, los valores de producción primaria son moderados como consecuencia de la limitación por nitrógeno del fitoplancton, ilustrada por la aparición de *Cylindrospermopsis raciborskii*. El máximo de producción primaria observado en primavera la Albufera de Valencia contrasta con el máximo en verano descrito en numerosos lagos hipertróficos. Esta diferencia posiblemente se explica por las temperaturas moderadamente elevadas que se dan en el lago en primavera ( $\approx 20^\circ\text{C}$ ),

---

pero también a la importante limitación por nitrógeno que tiene lugar durante el verano.

Los evidentes cambios estacionales observados en la producción primaria contrastan con las modestas variaciones experimentadas por la producción bacteriana en el lago. Sin embargo, se observa una disminución conjunta en invierno seguida de un aumento también conjunto en primavera. Las fluctuaciones en los valores del ratio de producción bacteriana diaria:producción primaria diaria (PBD:PPD) responden fundamentalmente a cambios en la producción primaria. Este ratio es mínimo en primavera, bajo en verano y máximo en invierno. El hecho de que este ratio PBD:PPD sea superior a 1, indica que el fitoplancton representa el mayor aporte de carbono particulado disponible para los niveles tróficos superiores en la Albufera de Valencia a lo largo del ciclo anual. Nuestro estudio sugiere que no existe un acoplamiento entre las producciones primaria y bacteriana a escala estacional. La elevada disponibilidad de DOC en la columna de agua podría explicar estos resultados. Apoyando esta hipótesis, las concentraciones de carbono orgánico disuelto liberado de manera contemporánea por el fitoplancton como subproducto de la fotosíntesis sobrepasan la cantidad de carbono requerida por parte de la producción de bacterias heterótrofas en las fechas estudiadas. Estos resultados respaldan la idea de que la alta disponibilidad de DOC favorece el desacoplamiento entre las producciones primaria y secundaria y sugieren que en la Albufera de Valencia, la producción bacteriana no depende de la materia orgánica de origen alóctono, si bien ésta no puede ser totalmente descartada como una fuente adicional de carbono. Por último, es interesante señalar que los valores de producción primaria observados en el lago ( $0,9 -12,2 \text{ mg C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) son extremadamente altos y superan la mayoría de los valores descritos en lagos hipertróficos hasta la fecha.

El **metazooplancton** representa el eslabón principal entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores dentro de la red trófica clásica, y a su vez, constituye el nexo de unión entre esta red y el bucle microbiano. Los lagos someros eutróficos



suelen estar dominados por cianobacterias coloniales y filamentosas, poco comestibles para cladóceros de gran tamaño como *Daphnia magna*. No obstante, numerosos estudios han confirmado que los grandes cladóceros, y en un contexto más amplio el metazooplancton, se alimentan no sólo de fitoplancton, sino también de bacterias heterótrofas. Este hecho plantea diversas cuestiones de interés para profundizar en el conocimiento existente sobre el ciclo del carbono en lagos hipertróficos, tales como: i) evaluar las características filtradoras de la comunidad natural de zooplancton a finales de invierno/principios de primavera y mediados de primavera, periodos caracterizados respectivamente por la dominancia vs no dominancia de cianobacterias; ii) evaluar la contribución relativa del fitoplancton y las bacterias heterótrofas a la transferencia de carbono al zooplancton en lagos hipertróficos; y iii) si esta contribución exhibe variaciones temporales asociadas a cambios de tipo estacional en factores biológicos o ambientales como la composición de la comunidad fitoplanctónica o la tasa de renovación del agua del lago. Este estudio consistió en dos series de experimentos. El objetivo de la primera serie de experimentos fue estimar las **tasas de filtración y asimilación** de *Daphnia magna* (la especie dominante a finales de invierno/principios de primavera de 2011) para la población de fitoplancton y bacterias del lago. Estas tasas se estimaron en condiciones similares a las naturales, utilizando microcosmos que contenían las poblaciones de fitoplancton y bacterias presentes en el agua del lago (y en igual densidad) cuando se recogieron los individuos de *D. magna*, y que habían incorporado previamente bicarbonato sódico marcado con carbono-14 y timidina tritiada, respectivamente. La segunda serie de experimentos tuvo como objetivo estimar las tasas de filtración y asimilación de la comunidad zooplanctónica de mediados de primavera, en concreto, de *Bosmina longirostris* (la especie dominante en este periodo) y de la fracción de zooplancton de 50-100 µm. Además, se estimó la tasa de filtración por unidad de biomasa para el total de la comunidad zooplanctónica para distintas fracciones de tamaño de la población natural de fitoplancton y bacterias. Para ello, se emplearon varias series de microcosmos a los que se aplicaron distintos tratamientos. Los tratamientos consistieron en la adición de las siguientes

---

suspensiones, que contenían algas y/o bacterias de distintas fracciones de tamaño que habían incorporado previamente carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ) y/o timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ) : a)  $15\text{-}3\ \mu\text{m } ^{14}\text{C} + <3\ ^{14}\text{C}$ , b)  $15\text{-}3\ \mu\text{m } ^{14}\text{C} + 3\text{-}1\ ^3\text{H}$ , c)  $15\text{-}3\ \mu\text{m } ^{14}\text{C} + <1\ ^3\text{H}$ , d)  $<3\ ^{14}\text{C} + 3\text{-}1\ ^3\text{H}$ , e)  $<3\ ^{14}\text{C} + <1\ ^3\text{H}$  y f)  $3\text{-}1\ ^3\text{H} <1\ ^3\text{H}$ . Las suspensiones se prepararon de manera que el total de organismos de cada fracción (marcados y no marcados) guardara las mismas proporciones que en el agua del lago.

Este trabajo indica que las condiciones ambientales en el lago son marcadamente diferentes durante finales de invierno/principios de primavera y mediados de primavera. De la misma manera, la comunidad fitoplanctónica pasa de estar dominada por diatomeas y clorofíceas a finales de invierno/principios de primavera a estar dominada por cianobacterias a mediados de primavera. La sucesión fitoplanctónica implica un cambio en la especie dominante de zooplancton, en concreto, del cladóceros de gran tamaño *D. magna* al de menor tamaño *B. longirostris*, corroborando la idea general de que los cladóceros de pequeño tamaño suelen desplazar a los más grandes en situaciones de dominancia de cianobacterias filamentosas. Nuestros resultados apoyan por tanto el uso de *B. longirostris* como indicador de eutrofia.

*D. magna* muestra tasas de filtración bajas tanto para el fitoplancton como para las bacterias heterótrofas, probablemente como consecuencia del efecto inhibitor causado por la elevada abundancia de cianobacterias filamentosas en las suspensiones alimenticias derivadas del agua del lago. Las tasas de filtración de *D. magna* para el fitoplancton y las bacterias heterótrofas son muy similares, lo que corrobora los hábitos de alimentación no selectivos de esta especie en base a datos obtenidos en condiciones semejantes a las naturales. Las bacterias heterótrofas proporcionan aproximadamente el 40% del carbono planctónico ingerido por *D. magna* y este carbono se asimila con una eficiencia similar al proporcionado por el fitoplancton. Estos resultados indican un acoplamiento entre el bucle microbiano y la red trófica clásica a principios de primavera en el lago y apoyan la hipótesis de que las bacterias

pueden suponer una fuente alternativa de alimentación en periodos en los que la biomasa fitoplanctónica es más reducida.

Las tasas de filtración de *B. longirostris* son bajas, probablemente como resultado de que la concentración de partículas alimenticias en el lago superan el nivel de limitación incipiente. *B. longirostris* muestra una preferencia clara por células de mayor tamaño y en concreto por algas de 1-15  $\mu\text{m}$  frente a bacterias  $< 1 \mu\text{m}$ , corroborando los hábitos de alimentación selectivos de esta especie. Las algas de 3-15  $\mu\text{m}$  proporcionan la mayor parte del carbono ingerido por *B. longirostris* y de manera similar, el fitoplancton proporciona el 75% del carbono planctónico ingerido por el total de la comunidad zooplanctónica, lo que sugiere que en los periodos de dominancia de *B. longirostris* la transferencia de energía hacia niveles tróficos superiores ocurre en gran parte a través de la red trófica tradicional. La fracción de zooplancton correspondiente a un tamaño de 50-100  $\mu\text{m}$ , integrada principalmente por *Keratella cochlearis*, es capaz de alimentarse de bacterias pero muestra una preferencia evidente por algas de 3-15  $\mu\text{m}$ . Las tasas específicas de carbono por unidad de biomasa para el total de la comunidad de zooplancton fueron mayores para el fitoplancton que para las bacterias (2  $\mu\text{g C}$  de algas frente a 0,5  $\mu\text{g C}$  de bacterias ingeridas por  $\mu\text{g C}$  zooplancton).

Tanto a principios como a mediados de primavera, el metazooplancton consume únicamente una pequeña porción de la biomasa fitoplanctónica presente en la Albufera de Valencia, ilustrando la limitada capacidad del zooplancton para controlar el crecimiento fitoplanctónico y apoyando la hipótesis de un control *top-down* (de los niveles tróficos superiores a los inferiores) reducido en los lagos altamente eutróficos de zonas templadas cálidas.

En vistas a mejorar la comprensión sobre el funcionamiento ecológico de los lagos hipertróficos, los **modelos biogeoquímicos** hacen posible sintetizar, integrar y analizar información referente a numerosos procesos e interacciones que tienen lugar

---

en el ecosistema. En consecuencia, estos modelos pueden ser empleados como una herramienta exploratoria, pero también predictiva, ilustrando la respuesta potencial del ecosistema a factores externos y proporcionando una base para la toma de decisiones de gestión ambiental. La presente tesis tiene como objetivo desarrollar un modelo ecológico que reproduzca las interacciones que definen la dinámica del plancton y pueda ser utilizado en un futuro como instrumento de gestión para la mejora del estado trófico de la Albufera de Valencia.

En primer lugar, se elaboró el modelo conceptual del lago. Dada la escasa profundidad del mismo y la ausencia de estratificación vertical, se consideró un único compartimento espacial. El modelo representa i) dos ciclos de nutrientes: nitrógeno y fósforo; ii) dos grupos de fitoplancton: cianobacterias y no-cianobacterias; y iii) bacterias heterótrofas. Las funciones externas de forzamiento (“forcing functions” en su acepción inglesa) consideradas por el modelo son las siguientes: zooplancton, temperatura del agua, radiación solar, oxígeno disuelto, coeficiente de extinción, duración del día, precipitación, evaporación, viento, deposición atmosférica, entradas y salidas de agua al lago y su carga asociada de nutrientes. Estas cargas se calcularon multiplicando las concentraciones de nutrientes en los cauces de entrada por el flujo de los mismos, de manera que los ciclos de nitrógeno y fósforo en el lago están estrechamente relacionados con los aportes hídricos del mismo. Los datos incluidos en el modelo se recogieron con una periodicidad entre semanal y mensual durante el periodo 2010-2011. Estos datos corresponden a 4 estaciones de muestreo situadas dentro del lago y 20 estaciones situadas en acequias o cauces naturales cuyo flujo aporta el 85% del flujo total de entrada al lago. El modelo fue calibrado mediante el ajuste manual de los parámetros dentro de los rangos recogidos en la literatura para coincidir con los patrones observados en el lago durante 2010. A continuación, el modelo fue validado con los datos correspondientes a 2011 con el fin de valorar su capacidad predictiva en respuesta a condiciones externas diferentes de las del año de calibración. Posteriormente, se evaluó la capacidad del modelo para reproducir los

patrones estacionales de una serie de parámetros relevantes para la calidad de agua de lago, teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a las funciones externas de forzamiento (carga hídrica y de nutrientes, depredación por parte del zooplancton, etc...). Además, se realizó un análisis de sensibilidad con el fin de identificar los parámetros más relevantes para la predicción de los valores de clorofila-*a* en el lago. Por último, el modelo calibrado fue utilizado para explorar los efectos de medidas potenciales de restauración del lago en los valores medios anuales de clorofila-*a*, así como los valores medios de clorofila-*a* durante al periodo de incremento de flujo a través del lago (febrero-marzo). Estas medidas potenciales comprendieron la modificación simultánea de las cargas externas de nitrógeno y fósforo, así como de las tasas de renovación de agua del lago. En concreto, se testaron un total de 72 escenarios, que implicaban una variación del 50-130% para las cargas de nitrógeno y fósforo y del 75-135% para las tasas de renovación del agua del lago.

En general, el modelo desarrollado es capaz de simular de manera realista los patrones estacionales de clorofila-*a* total, nitrato, amonio, así como de nitrógeno y fósforo total, teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a los factores externos. En lo referente a los componentes biológicos, el modelo es capaz de reproducir de manera razonable los valores de biomasa total de fitoplancton y no-cianobacterias observados en 2010, aunque no captura de forma rigurosa el evento de aguas claras acaecido a finales de invierno. En el caso de las cianobacterias, el modelo reproduce fielmente la dinámica estacional, incluyendo los valores máximos y mínimos observados. Durante el periodo de validación, 2011, no tuvo lugar un evento de aguas claras como el ocurrido en 2010. En términos generales, el modelo simula adecuadamente los patrones estacionales de clorofila-*a* observados durante 2011, pero no captura los máximos de biomasa total de fitoplancton de primavera y otoño. Estos resultados reflejan una subestimación de los valores simulados de cianobacterias, grupo que en términos de biomasa, domina durante la mayor parte del ciclo anual. Por el contrario, las predicciones del modelo sobrestiman en cierta medida los valores

---

observados de biomasa de no-cianobacterias prácticamente a lo largo de todo el ciclo anual. Tanto durante el periodo de calibración como durante el de validación, los valores de biomasa bacteriana simulados presentan un comportamiento relativamente estático con respecto a los observados. Sin embargo, el valor medio de biomasa bacteriana es simulado adecuadamente por el modelo.

El análisis de sensibilidad indica que los parámetros de mayor influencia tanto para el fitoplancton total como para las cianobacterias son esencialmente los relacionados con las estrategias de crecimiento y sedimentación de ambos grupos de fitoplancton. Otros factores relevantes son aquellos relacionados con la temperatura de referencia, la proporción de nitrógeno y fósforo inerte enterrado en el sedimento o las cuotas máximas de fósforo y nitrógeno en no-cianobacterias y cianobacterias, respectivamente.

Como se ha mencionado anteriormente, los ciclos de nutrientes están estrechamente ligados al régimen hídrico del lago. El modelo considera unos aportes hidrológicos de origen fluvial y por precipitación de  $231 \text{ hm}^3 \text{ año}^{-1}$ , que teniendo en cuenta las pérdidas debidas a la evaporación en la superficie del lago, dan lugar a una tasa de renovación de  $8,9 \text{ año}^{-1}$ . La cuantificación realizada a través del modelo de los procesos implicados en el ciclo del fósforo, indica que las cargas externas procedentes de las aguas influyentes suponen la mayor aportación de fosfato a la columna de agua (> 90%). Dado que el fósforo generado mediante mecanismos de reciclado (mineralización y metabolismo basal del plancton), es insuficiente para satisfacer las demandas del fitoplancton (que corresponden en un 70% al grupo de las cianobacterias), el crecimiento algal depende necesariamente de los aportes externos de fósforo. Por último, el modelo sugiere que los sedimentos constituyen un sumidero de fósforo a escala anual. Como en el caso del ciclo del fósforo, las cargas externas procedentes de las aguas influyentes suponen la mayor entrada de nitrógeno en la columna de agua, principalmente en forma de nitrato. Así mismo, los mecanismos de reciclado son incapaces de cubrir los requerimientos fitoplanctónicos de nitrógeno

(que corresponde en un 80% al grupo de las no-cianobacterias), de manera que las cargas externas son las responsables de cubrir esta demanda. El modelo ilustra el papel de las bacterias como mineralizadoras en el sistema, ya que originan aproximadamente la mitad del nitrógeno requerido para el crecimiento fitoplanctónico. Al contrario que en el caso del fósforo, el modelo sugiere la existencia de un flujo neto de este nutriente desde los sedimentos a la columna de agua a escala anual.

El análisis de escenarios ilustra una respuesta lineal por parte de la clorofila- *a* (total, cianobacterias y no-cianobacterias) al amplio rango de cargas de nutrientes y tasas de renovación exploradas en base a los valores medios anuales. Esta respuesta es más pronunciada para los nutrientes, lo que sugiere que las cargas de nitrógeno y fósforo son el factor que ejerce un mayor control sobre las concentraciones de clorofila-*a* en el lago y por tanto su reducción debería constituir la primera prioridad para la restauración del ecosistema. Así mismo, nuestros resultados ponen de manifiesto que la reducción de las cargas externas de nutrientes debería estar dirigida tanto al fósforo como al nitrógeno.

La reducción más drástica de la clorofila-*a* total a escala anual ( $91 \mu\text{g clorofila-}a \text{ L}^{-1}$ ) se obtuvo mediante una reducción del 50% de las cargas de NT y TP combinada con una reducción del 25% de la tasa de renovación del agua del lago, que resultó en un valor de  $91 \mu\text{g clorofila-}a \text{ L}^{-1}$ , aproximadamente la mitad del valor obtenido para las predicciones bajo las condiciones actuales ( $\approx 187 \mu\text{g clorofila-}a \text{ L}^{-1}$ ). Estos resultados indican una histéresis moderada en respuesta a los cambios en las entradas de N y P, lo que sugiere que la carga interna podría dificultar la respuesta del sistema a los escenarios explorados.

Así mismo, el análisis de escenarios muestra una relación positiva entre la biomasa del fitoplancton y las tasas de renovación del lago en base a la media anual. Esto es debido a que el incremento de las tasas de renovación conlleva un incremento

---

proporcional en la carga de nutrientes y en consecuencia, tasas de renovación más altas conllevan un incremento indirecto de la biomasa algal (a través de un mayor suministro de nutrientes) que no es compensado por el transporte de biomasa algal fuera del lago (derivado de la mayor tasa de renovación). Sin embargo, este análisis muestra un efecto de dilución de la biomasa de cianobacterias asociado a altas tasas de renovación para el periodo febrero-marzo, debido a que las pérdidas de biomasa derivadas de la exportación al mar no pueden ser compensadas por las lentas tasas de crecimiento asignadas a este grupo. Estos resultados pueden tener importantes implicaciones para la gestión del lago y apoyan propuestas realizadas anteriormente. Estas propuestas consisten en manipular el flujo hídrico de entrada al sistema, y más específicamente, proporcionar al lago agua en forma de intensos pulsos con el fin de reproducir condiciones hidráulicas similares a aquellas que desencadenan los eventos de aguas claras, lo que permitiría alcanzar condiciones de luz que permitieran el establecimiento de macrófitos.

Nuestro trabajo pone de manifiesto distintos aspectos del modelo que podrían ser mejorados y que sugieren futuras líneas de investigación. En primer lugar, próximas versiones del modelo debería considerar la posible introducción de macrófitos en el lago y su dinámica, ya que si bien en la actualidad la escasez de luz no permite su desarrollo, la reducción de cargas externas de nutrientes podría facilitar su aparición. De la misma manera, dada la intensa interacción entre los sedimentos y la columna de agua característica de los lagos someros eutróficos, y los resultados obtenidos, que sugieren cierto nivel de histéresis en respuesta a la reducción de las cargas externas de nutrientes, una caracterización más detallada sobre la distribución de nutrientes en el sedimento parece esencial para perfeccionar la representación del ecosistema. La introducción del zooplancton como variable de estado es otro de los pasos críticos a tener en cuenta para mejorar la representación de los mecanismos de control del fitoplancton por depredación y en definitiva la mejora del modelo. Por último, la marcada reducción de la biomasa de cianobacterias durante el periodo de febrero-



marzo simulada por el modelo en respuesta al aumento de la tasa de renovación del agua del lago, pone de manifiesto la relevancia del régimen hídrico para la dinámica del fitoplancton en la Albufera de Valencia e invita a realizar un estudio más detallado a escala estacional de la influencia del régimen hídrico en los niveles de clorofila-*a* del lago y sus implicaciones como una medida potencialmente efectiva de restauración del mismo.



# **Introducción**



## Los lagos someros eutróficos

Los lagos someros constituyen el tipo de lago más abundante a escala global (Wetzel, 1990). Este tipo de lagos ha sido definido de maneras muy diversas; Scheffer (2004), en su trabajo “Ecology of Shallow Lakes”, los define como “lagos que pueden ser colonizados en gran medida por macrófitos y que no presentan una estratificación térmica durante largos periodos en verano”. Por otra parte, Wetzel (2001), en su libro “Limnology: Lake and River Ecosystems”, define a los lagos someros como “masas de agua permanentes lo suficientemente someras como para ser potencialmente capaces de permitir la entrada de luz hasta su fondo y por tanto el crecimiento de plantas acuáticas superiores en todo el lago o gran parte de él”. De estas definiciones se derivan las características diagnósticas de los lagos someros, siendo la principal, como su propio nombre indica, la poca profundidad. Aunque estos lagos presentan un área muy variable (<1 - > 100 km<sup>2</sup>), su profundidad media no suele rebasar los 3 m. La escasa profundidad favorece la mezcla completa de la columna de agua, lo que explica la carencia de estratificación térmica durante largos periodos y el hecho de que a menudo sean denominados lagos polimícticos (Scheffer *et al.*, 1993). Además, el elevado ratio superficie: volumen favorece una intensa interacción entre los sedimentos y la columna de agua (Scheffer *et al.*, 1993). Estos rasgos implican que el funcionamiento de los lagos someros difiera del de los lagos profundos. Por ejemplo, el estrecho contacto entre los sedimentos y la columna de agua conlleva un mayor reciclaje de nutrientes y por tanto una mayor disponibilidad de éstos para los productores primarios, por lo que los lagos someros suelen ser más productivos que los profundos. De la misma manera, los lagos someros a menudo presentan una mayor zona litoral, lo que facilita un intercambio más intenso de materia y organismos entre los medios terrestre y acuático (Meerhoff & Jeppesen, 2009).

Como ecosistemas, los lagos someros prestan un amplio rango de servicios, que pueden ser entendidos como “las condiciones y procesos mediante los cuales los sistemas naturales, y las especies que forman parte de ellos, sustentan y satisfacen las

---

necesidades de la vida humana” (Daily, 1997). Muchos lagos someros son esenciales para el desarrollo de actividades económicas y recreativas como la agricultura, la pesca, la observación de aves, el baño, la navegación o el turismo, y además, reportan beneficios de tipo estético (Postel & Carpenter, 1997; Dodds *et al.*, 2008; McNeary *et al.*, 2013). A pesar de ello, a lo largo de las últimas décadas los lagos someros se han visto sometidos a distintos procesos de degradación, tales como fluctuaciones en el nivel del agua, contaminación por metales pesados o plaguicidas y eutrofización cultural (Planta & Carrasco, 1985; Nõges & Nõges, 1999; Coops *et al.*, 2003; Zan *et al.*, 2011). Entre estos procesos, cabe destacar la eutrofización cultural por representar un problema que compromete gravemente la protección de los recursos hídricos a escala global (Smith, 2003; Yang *et al.*, 2008). Además, el hecho de que los lagos someros a menudo estén situados en zonas llanas y fértiles los hace especialmente sensibles a las actividades humanas que se desarrollan en sus cuencas hidrográficas (Meerhoff & Jeppesen, 2009).

La eutrofización cultural implica un incremento substancial de nutrientes en ecosistemas acuáticos por causa de factores antrópicos (Hasler, 1947). Sus consecuencias comprenden multitud de efectos perjudiciales para el funcionamiento de la red trófica y los procesos biogeoquímicos acuáticos, pero probablemente, los cambios más obvios son i) la reducción de la transparencia del agua; ii) el cambio en la composición de la comunidad de fitoplancton, generalmente caracterizado por un aumento en la proporción de especies de cianobacterias que suelen estar implicadas en el desarrollo de blooms (floraciones de una o pocas especies de cianobacterias) que además pueden resultar tóxicas o no comestibles para el zooplancton; iii) el agotamiento del oxígeno en la columna de agua; iv) el aumento en la incidencia de mortandad de peces y v) una disminución del valor estético del ecosistema (Carpenter *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2006). Asimismo, la eutrofización potencialmente implica pérdidas económicas de gran magnitud (Dodds *et al.*, 2008; McNeary *et al.*, 2013).

El conjunto de cambios mencionados ilustra la transición del ecosistema hacia un estado que, de acuerdo a la teoría de los estados alternativos, se califica como turbio (Scheffer *et al.*, 1993). Esta teoría postula que los lagos someros eutróficos pueden existir en dos estados estables de manera alternativa: un estado claro caracterizado por una alta transparencia del agua, baja biomasa fitoplanctónica y gran abundancia de macrófitos sumergidos, y un estado turbio caracterizado por una baja transparencia del agua, dominancia de fitoplancton y macrófitos sumergidos prácticamente ausentes. En este contexto, la interacción entre los macrófitos y la turbidez del agua es decisiva. Por una parte, la elevada turbidez del agua restringe la disponibilidad de luz que penetra la columna de agua impidiendo el crecimiento de macrófitos; por otra parte, los macrófitos potencian la claridad del agua a través de la reducción de la resuspensión de sedimento, el aumento de la sedimentación, la competencia con el fitoplancton o la provisión de refugio para el zooplancton ante la depredación por peces (Scheffer *et al.*, 1993; Ibelings *et al.*, 2007). La relevancia de esta interacción se pone de manifiesto por el hecho de que lagos con una extensa cubierta de macrófitos sumergidos suelen presentar mayor transparencia que aquellos con una escasa cubierta y en un estado trófico similar (Scheffer *et al.*, 1993). Es importante destacar que los estados claro y turbio pueden darse bajo condiciones ambientales similares, es decir, bajo un determinado rango de concentraciones moderadas de nutrientes (*i.e.* 0,025 - 0,15 mg L<sup>-1</sup> de fósforo total) y que muestran cierta estabilidad frente a perturbaciones externas *i.e.* aumento en la carga de nutrientes (Scheffer *et al.*, 1993; Meerhoff & Jeppesen, 2009). En consecuencia, los cambios de estado no suelen ser graduales sino abruptos, ya que gracias a mecanismos de retroalimentación, el sistema se muestra insensible durante un tiempo ante el aumento de cierto impacto (periodo de histéresis), hasta que se alcanza un valor crítico o punto de inflexión, produciéndose entonces una transición catastrófica al estado alternativo; para revertir este estado, es necesario que el impacto se reduzca muy por debajo del valor crítico mencionado (Scheffer *et al.*, 1993). No obstante, recientemente, en la conferencia de clausura del “8° Congreso Internacional sobre

---

Lagos Someros” (Antalya, Turquía), Brian Moss llamó la atención sobre el hecho de que nuestro concepto de lo que debería ser un lago somero en condiciones prístinas puede estar distorsionado por estar definido en base a la experiencia adquirida en Norteamérica y Europa. En concreto, puso como ejemplo los lagos no sometidos a impacto antrópico situados en llanuras de inundación en Tanzania, en los que la vegetación sumergida estaba ausente por el pastoreo ejercido por los grandes herbívoros, que a su vez aportaban nutrientes en grandes cantidades, favoreciendo la aparición de floraciones de cianobacterias en las orillas.

La mayoría de medidas dirigidas a la restauración o mejora del estado trófico de los lagos eutróficos (oligotrofización), se han focalizado en la reducción de las cargas de nutrientes de origen alóctono, especialmente de fósforo (Gulati & van Donk, 2002; Søndergaard *et al.*, 2002). Aunque esta medida se ha traducido en una mejora rápida y notable del estado trófico de algunos lagos, en otros muchos se ha observado un retraso o ausencia de respuesta, lo que se explica principalmente por i) la carga interna de nutrientes, acumulada en los sedimentos a lo largo del periodo de eutrofización y ii) por una resistencia asociada a la comunidad piscícola (Jeppesen *et al.*, 2007b). Por ejemplo, la búsqueda de alimento por parte de los peces bentívoros y planctívoros, muy abundantes en los lagos someros eutróficos, conlleva la resuspensión del sedimento (bioturbación), lo que dificulta la penetración de luz en la columna de agua, esencial para el desarrollo de macrófitos (Jayaweera & Asaeda, 1995). Dado que a menudo la reducción de las cargas externas es insuficiente para mitigar la eutrofización, se han ensayado diferentes medidas de restauración complementarias, como la construcción de filtros verdes, la inmovilización del fósforo acumulado en los sedimentos mediante el uso de carbonato cálcico o de arcillas adsorbentes (bentonita), el dragado de sedimentos o la biomanipulación (Jeppesen *et al.*, 2007a; Cooke *et al.*, 2005). Esta última implica una manipulación de la red trófica mediante la reducción de la población de peces planctívoros y bentívoros y la introducción de peces piscívoros,



de modo que se reduce el control *top-down* (de los niveles tróficos superiores a los inferiores) ejercido por los peces sobre el zooplancton. Otra medida de restauración potencialmente útil es la manipulación hidrológica, que supone un aporte de agua pobre en nutrientes y preferiblemente rica en Ca y HCO<sub>3</sub> al lago (Gulati & van Donk, 2002; Ibelings *et al.*, 2007). Dada la naturaleza de la Albufera de Valencia, estrechamente vinculada al entorno agrícola y con un régimen hídrico altamente controlado por el hombre, la reducción de las cargas de nutrientes de origen alóctono, unida a la manipulación del flujo de agua que la atraviesa, podría facilitar en gran medida su recuperación. De hecho, se ha propuesto la utilización de pulsos de flujo hídrico a finales del invierno, época en la que se produce la máxima inundación del lago y de los campos circundantes en condiciones naturales; estas condiciones de inundación habían sido mantenidas por los agricultores tradicionales desde 1850 (Miracle *et al.*, 2012).

### **Caso de estudio: la Albufera de Valencia**

La Albufera de Valencia constituye un caso representativo de lago somero situado en una cuenca hidrográfica con intensa actividad agrícola que cambió de manera abrupta al estado turbio como consecuencia de un evidente proceso de eutrofización cultural. Durante la primera mitad del siglo XX, el lago era oligotrófico y su fondo estaba cubierto por extensas praderas de caráceas como por ejemplo *Chara hispida*, *Chara intermedia*, *Chara ceratophylla*, *Nitella hialina* o *Tolypella glomerata* (Pardo, 1942). El rápido proceso de industrialización junto al incremento poblacional de la zona durante los años 1960 resultó en el aumento de entrada de nutrientes al lago y su eutrofización. Este proceso, unido al cambio en las prácticas agrícolas (en concreto, la siembra directa de arroz en los campos) y el consiguiente aumento en los niveles de pesticidas, favoreció la desaparición de los macrófitos sumergidos, lo cual consolidó la transición al estado turbio del lago a principios de los años 1970 (Blanco, 1972; Benet, 1984; Vicente & Miracle, 1992). Durante esta década, el fitoplancton se

---

estableció como productor primario dominante en el lago en detrimento de los macrófitos (Blanco, 1974; Dafaue, 1975). Seguidamente, la densidad de fitoplancton y especialmente de cianobacterias filamentosas aumentó de manera considerable y durante los años 1980, se llegaron a registrar concentraciones de clorofila-*a* superiores a 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  en el lago (Miracle *et al.*, 1984; Vicente & Miracle, 1992; Romo & Miracle, 1994). En este periodo, el zooplancton estuvo dominado por copépodos y rotíferos, y el ratio de biomasa de zooplancton:fitoplancton se mantuvo extremadamente bajo, como es característico de los lagos hipertróficos (Oltra & Miracle, 1984; Vicente & Miracle, 1992).

A principios de los años 1990, se implementó un plan de depuración de las aguas residuales vertidas al lago con el objetivo de mejorar la calidad del agua del mismo y en la misma línea de actuación, se han construido recientemente tres filtros verdes (Tancat de la Pipa, Tancat de Mília y Estanya de la Plana) en las inmediaciones del lago. A pesar de las medidas mencionadas, en la actualidad el lago permanece en estado turbio y se considera hipertrófico (Usaquén *et al.* 2012; Martín *et al.*, 2013). Sin embargo, en ocasiones, a finales de invierno, tienen lugar en el lago “eventos de aguas claras”. Diversos estudios han permitido describir estos eventos como periodos caracterizados por una elevada transparencia del agua asociada a la disminución de la biomasa fitoplanctónica, así como por una notable reducción en la proporción relativa de cianobacterias y el crecimiento de *Daphnia magna* en el lago (Miracle & Sahuquillo, 2002; Villena & Romo, 2003; Romo *et al.*, 2005; Romo *et al.*, 2008).

Estos eventos no son comparables a una transición al estado claro por parte del lago, dada su corta duración y que no conllevan una recolonización por parte de los macrófitos. Asimismo, las causas y momento en el que tienen lugar estos “eventos de aguas claras” difieren de los de las fases claras, consideradas como un estadio sucesional del ciclo anual del fitoplancton en los lagos tanto meso- como eutróficos. Las fases claras pueden definirse como un periodo durante el que aumenta marcadamente la transparencia del agua como consecuencia del rápido descenso de la

biomasa fitoplanctónica tras el bloom primaveral; tienen lugar a finales de primavera o principios de verano y están principalmente desencadenadas por la presión depredatoria ejercida por el zooplancton herbívoro sobre el fitoplancton (Lampert *et al.*, 1986; Sommer *et al.*, 1986; Tønno *et al.*, 2003; Dröscher *et al.*, 2008). En la Albufera de Valencia, los “eventos de aguas claras” tiene lugar en invierno y están principalmente causados por i) el “lavado” que experimenta el lago cuando el agua contenida en los arrozales inundados circundantes se vierte al mar a través del lago, ocasionando una marcada reducción de la biomasa fitoplanctónica especialmente evidente en el caso de las cianobacterias filamentosas ; ii) las suaves temperaturas que favorecen el crecimiento neto de *Daphnia magna*; y iii) la disminución de la depredación de los peces sobre el zooplancton como consecuencia del máximo anual de capturas por pesca local en dicho periodo (Romo *et al.*, 2005). Estos factores, unidos a la baja disponibilidad de luz, las temperaturas por debajo del óptimo para el crecimiento de fitoplancton y el incremento de la proporción de especies más comestibles para el zooplancton, magnifican el control *top-down* de la biomasa fitoplanctónica por parte del zooplancton herbívoro.

Si bien se conocen los mencionados aspectos en relación a los “eventos de aguas claras”, la influencia del “lavado” en distintos procesos ecológicos tales como la producción primaria fitoplanctónica (producción primaria, PP) o la producción por parte de las bacterias heterótrofas (producción bacteriana, PB) no habían sido estudiados. De la misma manera, no existía información sobre el acoplamiento entre la producción primaria y bacteriana o la transferencia de carbono entre estos niveles tróficos y al zooplancton en relación a tales eventos. Por ello, la primera parte de la presente tesis tiene como objeto el estudio de estas cuestiones, de gran relevancia para mejorar el conocimiento sobre el ciclo del carbono en lagos eutróficos y en última instancia el funcionamiento ecológico de los mismos.

---

La comprensión del funcionamiento ecológico de los lagos eutróficos requiere la síntesis de una gran cantidad de información y de herramientas cuantitativas que permitan integrar esta información y analizar simultáneamente múltiples interacciones ecológicas. En este contexto, los modelos ecológicos constituyen una herramienta de utilidad para identificar los procesos físicos y biogeoquímicos subyacentes a los problemas de eutrofización y para diseñar planes de gestión efectivos que satisfagan los intereses locales de tipo tanto ambiental como socioeconómico (Usaquén *et al.*, 2012). La segunda parte de la presente tesis tiene como objetivo desarrollar un modelo biogeoquímico que reproduzca las interacciones que definen la dinámica del plancton y pueda ser utilizado en un futuro como instrumento de gestión para la mejora del estado trófico de la Albufera de Valencia.

Los estudios que componen la presente tesis se han desarrollado en el marco del proyecto de investigación titulado “Modelización de la influencia de los pulsos de flujo hídrico en la oligotrofización de los lagos someros. La Albufera de Valencia, un caso de estudio” (CGL2009-12229), perteneciente al Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011. Este proyecto se centró en el estudio de la ecología del lago, y en concreto en la influencia de los “eventos de aguas claras” sobre las comunidades planctónicas y la red trófica del lago, con el fin de obtener información útil para los gestores de los recursos hídricos de cara a una mejora en la calidad del agua y el estado ecológico de la Albufera de Valencia. Asimismo, esta información se aplicó al desarrollo de un modelo funcional sobre el lago, dirigido a mejorar el conocimiento de los lagos someros hipertróficos situados en países mediterráneos, que previsiblemente se verán afectados por el cambio climático.

## **Producción por parte del bacterioplancton heterótrofo en condiciones hipertróficas**

La introducción del concepto del *bucle microbiano* puso de manifiesto el relevante papel de las bacterias heterótrofas en las redes tróficas acuáticas como eslabón entre la materia orgánica disuelta (MOD) y el zooplancton. En concreto, este concepto ilustraba como la MOD liberada en la producción fotosintética fitoplanctónica, así como la procedente de la actividad y metabolismo de todos los organismos planctónicos (alimentación, secreciones, excreciones), de la descomposición de éstos (lisis celular, mortalidad) y de los materiales alóctonos, era consumida por las bacterias y se transfería en forma de carbono orgánico particulado, bien directamente, o bien a través de diferentes grupos de protistas, al zooplancton. De esta manera se establecía una vía de circulación de carbono que se acoplaba a la red trófica clásica fitoplancton-zooplancton-peces, trasladando una parte adicional de carbono a los niveles tróficos superiores (Pomeroy, 1974; Williams, 1981; Azam *et al.*, 1983; Sherr & Sherr, 1988; Cole *et al.*, 1988).

Desde la aparición del concepto del bucle microbiano, se han estudiado distintos procesos ecológicos relacionados con las bacterias heterótrofas que han ampliado el conocimiento sobre su contribución a la transferencia de carbono y energía en ecosistemas acuáticos, y que han llevado a la formulación de nuevas preguntas e hipótesis en este contexto (Gasol *et al.*, 2008). Por ejemplo, distintos estudios han señalado que a pesar de que la producción bacteriana ha sido ampliamente estudiada en ecosistemas acuáticos, la información disponible para lagos hipertróficos es escasa. En concreto, se tiene un conocimiento limitado sobre la existencia de patrones de variación diarios o estacionales de producción bacteriana y la contribución de esta última al ciclo del carbono en estos ecosistemas (Sommaruga & Robarts, 1997; Auer *et al.*, 2004; Tammert *et al.*, 2005).

---

Por otra parte, la gran diversidad de efectos de la luz solar sobre el bacterioplancton ha planteado cuestiones de tipo metodológico como la elección de condiciones de luz u oscuridad para la estima de la producción bacteriana (Gasol *et al.*, 2008; Ruiz-González *et al.*, 2013).

### **Producción primaria fitoplanctónica en condiciones hipertróficas**

El fitoplancton desempeña un papel fundamental en las redes tróficas acuáticas debido a que constituye una fuente de alimento para niveles tróficos superiores y a su vez proporciona carbono orgánico disuelto a las bacterias heterótrofas (Cole *et al.*, 1982; Baines & Pace, 1991). Los lagos someros en estado turbio se caracterizan por albergar una elevada biomasa fitoplanctónica (normalmente integrada mayoritariamente por cianobacterias coloniales y filamentosas), por lo que la disponibilidad de luz se limita a una estrecha capa cercana a la superficie, restringiendo el crecimiento de los macrófitos sumergidos, sus epífitos o del fitobentos. Esto convierte a la producción fitoplanctónica en la aportación mayoritaria al total de la producción primaria del ecosistema (Liboriussen & Jeppesen, 2003; Blindow *et al.*, 2006). En consecuencia, cabe esperar que las variaciones temporales a escala diaria y estacional de la producción primaria afecten de manera relevante las interacciones y transferencia de energía entre el fitoplancton y las bacterias heterótrofas o el zooplancton (Kisand & Nõges, 1998; Kisand *et al.*, 1998; Winter *et al.*, 2004). Por ejemplo, la correlación entre la producción primaria y la producción bacteriana que típicamente se observa en los ecosistemas pelágicos, suele atribuirse a la utilización por parte de las bacterias del carbono orgánico disuelto liberado por el fitoplancton, que se consideró la parte más importante del DOM en las primeras descripciones del bucle microbiano (Azam *et al.*, 1983; Bird & Kalff, 1984; Cole *et al.*, 1988). No obstante, esta relación parece variar con el estado trófico del ecosistema, siendo estrecha en sistemas oligotróficos en los que la disponibilidad de carbono orgánico disuelto (DOC) es limitada y débil en

sistemas eutróficos con alta disponibilidad de DOC (Pugnetti *et al.*, 2010). A este respecto, es importante matizar que existen pocos datos referentes a la relación entre la producción primaria y la producción bacteriana en lagos hipertróficos o al efecto potencial de factores con una componente estacional (*e.g.* cambios en la tasa de renovación de agua del lago) en esta interacción.

### **Características filtradoras de la comunidad zooplanctónica en condiciones hipertróficas**

Dentro de la cadena trófica acuática, el metazooplancton representa el eslabón principal entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores (a través de la depredación por parte de los peces zooplanctívoros), y a su vez entre el bucle microbiano y la cadena trófica clásica (Azam *et al.*, 1983). Además, en el contexto del bucle microbiano, el metazooplancton desempeña un papel esencial proporcionando materia orgánica disuelta a través de los desechos de alimentación o “sloppy feeding”, excreción y partículas fecales, potenciando así la envergadura de esta vía (Møller *et al.*, 2005). Los lagos someros eutróficos, y en especial los lagos cálidos (tropicales, subtropicales y templados cálidos) suelen presentar un ratio de biomasa de zooplancton: fitoplancton bajo y normalmente están dominados por cladóceros de pequeño tamaño, copépodos y rotíferos (Oltra & Miracle 1984; Jeppesen *et al.*, 1997; Havens *et al.*, 2007; Meerhoff & Jeppesen, 2009). Esto se debe en parte a la habitual ausencia de macrófitos, que implica que el metazooplancton carezca de refugio frente a la depredación por peces pero también a que, como se ha mencionado anteriormente, los lagos ricos en nutrientes están dominados por cianobacterias coloniales y filamentosas. Estas especies son difícilmente ingeridas por grandes cladóceros como *Daphnia magna* debido a interferencias de tipo mecánicas en su modo de filtración (DeMott *et al.*, 2001; Sahuquillo *et al.*, 2007; Pannoso & Lürling, 2010), lo cual restringe su crecimiento a periodos en los que la proporción relativa de este grupo se reduce.

---

Además, las cianobacterias pueden resultar tóxicas para los cladóceros. Se ha comprobado que diferentes extractos obtenidos a partir de *Pseudanabaena tenuis*, resultan altamente nocivos para *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*, reduciendo su supervivencia, descendencia total, neonatos por puesta y número de puestas (Olvera-Ramírez *et al.*, 2010). De hecho, en la actualidad, se está investigando el potencial tóxico de las cianobacterias para los cladóceros en la Albufera de Valencia, y más concretamente, el efecto de cianotoxinas extraídas durante una floración de *Microcystis aeruginosa* en *Moina cf. Micrura* y *Diaphanosoma lacustris* (Nandini *et al.*, en revisión).

Sin embargo, el fitoplancton no constituye la única fuente de alimentación para los grandes cladóceros y en términos generales para el metazooplancton; numerosos estudios han señalado que las bacterias heterótrofas también son consumidas por diversas especies de este grupo (Tóth & Kota, 1997; Work & Havens, 2003; Miracle *et al.*, 2014). Este hecho comporta el planteamiento de cuestiones tales como cuál es la contribución relativa del fitoplancton y las bacterias heterótrofas a la transferencia de carbono al zooplancton en lagos hipertróficos (que en definitiva representa el carbono disponible para niveles tróficos superiores) o si esta contribución exhibe variaciones temporales asociadas a cambios de tipo estacional en factores biológicos o ambientales como la composición de la comunidad fitoplanctónica o en la transparencia del agua (asociada esta última a cambios en la tasa de renovación del agua del lago).

## **Los modelos ecológicos como herramienta de conocimiento y gestión de los ecosistemas acuáticos: el caso de la Albufera de Valencia**

Los modelos ecológicos, y en concreto los modelos biogeoquímicos mecanicistas, ocupan una posición central en la investigación de los ecosistemas acuáticos por constituir una herramienta clave para la comprensión y descripción cuantitativa de los



mismos (Arhonditsis *et al.*, 2006; Jørgensen & Bendoricchio, 2001). No sólo eso, recientemente se ha destacado la relevancia que el conocimiento adquirido con modelos de este tipo tiene para otras ciencias cognitivas (Arhonditsis *et al.*, 2014). Los modelos biogeoquímicos mecanicistas permiten esclarecer aspectos ecológicos que de otra manera serían tecnológica o económicamente inabordables y al mismo tiempo constituyen un enlace predictivo entre las medidas de gestión y la respuesta de los ecosistemas, proporcionando por tanto una base científica para las decisiones de gestión medioambiental (Arhonditsis *et al.*, 2006; Stow *et al.*, 2009). En el marco de los lagos someros eutróficos, los modelos ecológicos ofrecen por tanto un instrumento para profundizar en el conocimiento de los procesos implicados en la eutrofización y en última instancia facilitar su gestión. Este hecho se refleja en el extendido uso que se ha hecho de estos modelos durante las últimas décadas, comprendiendo una gran diversidad de aplicaciones. Por ejemplo, se han desarrollado y aplicado diversos modelos matemáticos con el objetivo de representar la estructura ecológica de los lagos someros eutróficos y explorar tanto los procesos subyacentes a los problemas de eutrofización como a aquellos procesos implicados en la respuesta del ecosistema a medidas dirigidas a la mejora del estado ecológico del lago (oligotrofización). Jayaweera & Asaeda (1995) desarrollaron un modelo matemático con el fin de evaluar el impacto de distintos escenarios (*i.e.* limitación del fitoplancton por luz o nutrientes) en las concentraciones de clorofila-*a* en la parte control y la parte biomanipulada del lago somero eutrófico Bleiswijkse Zoom (Países Bajos), mejorando así el conocimiento referente a los procesos de eutrofización y biomanipulación en el ecosistema. Asimismo, se desarrolló un modelo tridimensional para el lago somero eutrófico Taihu (China) que puso de manifiesto la importancia de los factores meteorológicos para la dinámica estacional del fitoplancton, y en general, proporcionó nueva información sobre los procesos de eutrofización del lago (Mao *et al.*, 2008). De la misma manera, Liu *et al.* (2014), diseñaron un modelo dirigido a evaluar la respuesta del lago Dianchi (China) a variaciones en las cargas externas de nutrientes,

---

aportes de agua y nivel de agua del lago, proporcionando así resultados de utilidad para la gestión efectiva de los problemas de eutrofización del mismo.

El caso concreto de estudio de la presente tesis, el lago somero hipertrófico de la Albufera de Valencia, constituye un ejemplo de lago en “mal estado ecológico” de acuerdo al esquema Ecoframe propuesto por Moss *et al.* (2003) en el contexto de la Directiva Europea Marco del Agua (2000/60/CE). Esta situación invita al desarrollo de un modelo biogeoquímico que permita profundizar en el conocimiento ecológico del lago, y .ue en definitiva, constitutya una herramienta de gestión fiable para la restauración del mismo.

## Objetivos

1. Comprobar la existencia de un patrón diario de producción bacteriana en condiciones hipertróficas.
2. Evaluar la variabilidad estacional de producción bacteriana en condiciones hipertróficas, especialmente en relación a cambios en la tasa de renovación de agua del lago.
3. Explorar la dinámica diaria de producción primaria fitoplanctónica en condiciones hipertróficas.
4. Evaluar la variabilidad estacional de producción primaria en condiciones hipertróficas, especialmente en relación a cambios en la tasa de renovación de agua del lago.
6. Evaluar las variaciones estacionales en la contribución relativa por parte del fitoplancton y las bacterias heterótrofas a la producción de biomasa en el lago y comprobar si las producciones primaria y bacteriana están acopladas a escala estacional.
5. Evaluar las tasas de consumo de fitoplancton y bacterioplancton por la comunidadzooplanctónica del lago en condiciones análogas a las naturales, durante periodos de dominancia *versus* no dominancia de cianobacterias.
6. Desarrollar un modelo biogeoquímico capaz de reproducir la interacción entre los procesos ecológicos que definen la dinámica estacional del fitoplancton la Albufera de Valencia.
7. Utilizar el modelo para analizar la respuesta del fitoplancton a medidas potenciales de restauración del lago, en concreto, a la modificación combinada de cargas externas de nutrientes y tasas de renovación de agua en el lago.

---

## **Estructura de la tesis y descripción de los capítulos que la componen**

Esta tesis consta de seis capítulos que se articulan en tres partes principales. La primera parte se centra en distintos procesos ecológicos relevantes para el conocimiento del ciclo del carbono en la Albufera de Valencia y comprende los capítulos I, II y III. La segunda parte, que se recoge en el capítulo IV, tiene como objetivo el desarrollo y aplicación de un modelo biogeoquímico del lago que integra los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo, así como la dinámica estacional de ciertos componentes bióticos del ecosistema (bacterias heterótrofas y dos grupos de fitoplancton: cianobacterias y no-cianobacterias). Por último, la tercera parte incluye una sinopsis global, recogida en el capítulo V, y finalmente, una discusión general de los resultados, expuesta en el capítulo VI.

El núcleo de la tesis, integrado por las partes primera y segunda, se presenta como un compendio de artículos publicados o en revisión, de manera que cada capítulo está representado por uno de los artículos que se enumeran a continuación:

**Capítulo I.** Onandia, G., Miracle, M.R., Blasco, C., Vicente, E. 2014. Diel and seasonal variations in bacterial production in a hypertrophic shallow lagoon. *Aquatic Microbial Ecology*, 72 (3): 255-267.

**Capítulo II.** Onandia, G., Miracle, M.R., Vicente, E. 2014. Primary production under hypertrophic conditions and its relationship with bacterial production. *Aquatic Ecology*, 48 (4): 447-463.

**Capítulo III.** Onandia, G., Dias, J.D, Miracle, M.R. Zooplankton grazing on natural algae and bacteria under hypertrophic conditions. *Limnetica*, en revisión.

**Capítulo IV.** Onandia, G., Gudimov, A., Miracle, M.R., Ahronditsis, G. 2015. Towards the development of a biogeochemical model for addressing the eutrophication problems in the shallow hypertrophic lagoon of Albufera de Valencia, Spain. *Ecological Informatics*, 26 (3): 70-89.

### **Capítulo I. Variaciones diarias y estacionales de producción bacteriana en una lago somero hipertrófico**

El capítulo I consiste en un estudio sobre las variaciones diarias y estacionales de producción bacteriana en la Albufera de Valencia. Además, explora el efecto de la realización de medidas de producción bacteriana en condiciones de exposición a radiación fotosintéticamente activa (PAR) frente a la práctica más extendida de medidas realizadas en condiciones de oscuridad. El estudio engloba una serie de experimentos realizados *in situ* que comprenden medidas de producción bacteriana heterótrofa realizadas en distintos momentos del día en invierno, primavera y verano. Este trabajo constituye la primera estimación de producción bacteriana del lago y representa una importante aportación al escaso conocimiento disponible sobre la dinámica diaria y estacional de las bacterias heterótrofas y su contribución al ciclo del carbono en lagos hipertróficos. Asimismo, nuestros resultados aportan nueva información de tipo metodológico de interés para el diseño de futuros estudios de producción bacteriana en ecosistemas acuáticos.

---

## **Capítulo II. Producción primaria en condiciones hipertróficas y su relación con la producción bacteriana**

El capítulo II consiste en un estudio sobre las variaciones diarias y estacionales de producción primaria en el lago. Además, en esta sección se evalúa el acoplamiento a escala estacional entre la producción primaria y secundaria bacteriana (estudiada en el capítulo I). El estudio se basa en experimentos realizados *in situ* que comprenden medidas de producción primaria realizadas en distintos momentos del día en invierno, primavera y verano (de manera simultánea a los descritos en el capítulo I). Nuestro trabajo evalúa por primera vez el efecto las fluctuaciones en el flujo de agua circulante a través del lago en la producción primaria en la Albufera de Valencia. De la misma manera, nuestros datos constituyen la primera información disponible sobre el acoplamiento entre la producción primaria y bacteriana en el lago, y contribuyen a mejorar la comprensión sobre las interacciones entre estos niveles tróficos y su contribución relativa al ciclo del carbono en lagos hipertróficos.

### **Capítulo III. Consumo de poblaciones naturales de algas y bacterias por el zooplancton en condiciones hipertróficas**

El capítulo III recoge un trabajo experimental sobre las características de alimentación de la comunidad natural de zooplancton durante periodos caracterizados por la dominancia *versus* no dominancia de cianobacterias, en los que dominaron respectivamente, *Daphnia magna* y *Bosmina longirostris*. El estudio incluye dos experimentos. En el primer experimento se evalúan las características de alimentación de *D. magna*. En el segundo, se evalúan las características de alimentación tanto de *B. longirostris*, como de la fracción de zooplancton integrada por organismos de 50 – 100  $\mu\text{m}$  y del total de la comunidad. En ambos casos, para la estima de las tasas de filtración se utilizaron suspensiones que contenían algas y/o bacterias heterótrofas de distinto tamaño obtenidas a partir del agua del lago y marcadas radioactivamente. Este trabajo supone una aportación a las escasas caracterizaciones de alimentación de *D. magna* y *B. longirostris* basadas en comunidades naturales de fitoplancton y bacterioplancton y por tanto mejora el conocimiento ecológico de estas especies. Asimismo, nuestro estudio pone de manifiesto la relevancia del bucle microbiano y la red trófica clásica en la transferencia de carbono en la Albufera de Valencia durante periodos con distinta tasa de renovación, complementando los resultados referentes al ciclo del carbono en lagos hipertróficos obtenidos en los capítulos I y II.

---

## **Capítulo IV. Hacia el desarrollo de un modelo biogeoquímico para abordar los problemas de eutrofización en el lago somero hipertrófico de la Albufera de Valencia, España.**

El capítulo IV aborda el desarrollo de un modelo biogeoquímico del lago y su utilización como posible herramienta de gestión para la mejora del estado trófico del mismo. En primer lugar, hemos desarrollado un modelo que simula los ciclos del fósforo y el nitrógeno, así como la dinámica de dos grupos de fitoplancton (cianobacterias y no-cianobacterias) y el bacterioplancton heterótrofo. En segundo lugar, hemos calibrado el modelo y examinado su capacidad para reproducir los patrones planctónicos observados en el lago teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a las funciones externas de forzamiento (cargas de nutrientes de origen terrestre, tasa de renovación del lago, biomasa de zooplancton, etc...). En tercer lugar, se ha realizado un análisis de sensibilidad para identificar los parámetros más influyentes para la adecuada simulación del fitoplancton. Finalmente, el modelo calibrado se ha utilizado para evaluar la respuesta del fitoplancton a medidas potenciales de restauración; en concreto, la combinación de cargas externas de nutrientes y tasas de renovación del lago modificadas. El modelo desarrollado permite explorar los procesos físicos y biogeoquímicos subyacentes a los problemas locales de eutrofización y constituye una aproximación al desarrollo de una herramienta de gestión efectiva para el diseño de medidas dirigidas a mejorar el estado trófico de la Albufera de Valencia.



# **Parte I**

## **Ciclo del carbono en la Albufera de Valencia**



## **Capítulo I**

### **Variaciones diarias y estacionales de producción bacteriana en un lago somero hipertrófico**



# Diel and seasonal variations in bacterioplankton production in a hypertrophic shallow lagoon

Gabriela Onandia\*, Maria Rosa Miracle, Cristina Blasco, Eduardo Vicente

Department of Microbiology and Ecology, ICBiBE, University of Valencia, Calle Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

**ABSTRACT:** Diel and seasonal variations in bacterial secondary production (BP) were investigated in the hypertrophic Albufera de Valencia (Spain) by measuring  $^3\text{H}$ -leucine and  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation rates (LIR and TIR). LIR and TIR were positively correlated. Seasonal variations in the LIR:TIR ratio seemed to be related to dissolved organic carbon (DOC) availability, with higher concentrations favoring protein synthesis. The light:dark ratio of the incorporation rates of both radiotracers was close to 1. However, this ratio tended to be  $>1$  when DOC was lower, namely in winter. A clear diel pattern in bacterial activity was found, with an increasing trend during the night hours. The opposite diel pattern was observed for DOC. BP remained similar across seasons but showed a decrease in late winter during a period of high water discharge through the lagoon and concurrent minimum chlorophyll *a* concentrations. A comparison between hypertrophic systems aiming to explore the upper BP limit indicated that our BP estimates were considerably high but did not surpass previous values in hypertrophic lakes.

**KEY WORDS:** Bacterioplankton production · Carbon flux · Shallow hypertrophic lake

*Resale or republication not permitted without written consent of the publisher*

## INTRODUCTION

Heterotrophic bacterioplankton play a major role in the carbon flux and nutrient cycling of aquatic food webs (Azam et al. 1983). They are the main decomposers of organic matter and provide a link among particulate detritus, dissolved organic matter, and higher trophic levels (Cole et al. 1988). Bacterial secondary production (BP) has been widely studied across aquatic systems, but there is limited information about whether the existence of diel cycles depends on the ecosystem trophic state. The dissolved organic carbon (DOC) released by primary producers constitutes an important energy source for heterotrophic bacteria (Baines & Pace 1991). Given the light-driven diel variations in phytoplankton production, the amount of photosynthetic release available for heterotrophic bacteria likely fluctuates during the day, thereby causing diel variations in BP. Various

studies have described the occurrence of diel cycles in oligotrophic waters (e.g. Kuipers et al. 2000, Winter et al. 2004), where the linkage between autochthonous DOC and bacterioplankton is clear. However, no diurnal variations were found in mesotrophic shallow lakes in a study by Petrucio & Barbosa (2004), and similarly, no evident diel pattern appears to exist in eutrophic waters (Riemann & Sondergaard 1984). The significant subsidies of allochthonous material may be one plausible explanation for our inability to distinguish the impact of autochthonous DOC on the occurrence of diel cycles in productive waters (Gasol et al. 1998). Even more profound gaps in our knowledge exist in regard to the daily variations, the seasonal patterns, and the general contribution of BP production in shallow hypertrophic 'hypereutrophic' lakes (Sommaruga & Roberts 1997, Auer et al. 2004, Tammert et al. 2005), which typically represent the final stage of eutrophication.

\*Corresponding author: gabriela.onandia@uv.es

From a methodological standpoint, an additional controversial issue related to the causal association between light availability for bacteria and BP is the appropriateness of measurements obtained under dark conditions. The importance of measuring BP in the light has been emphasized in numerous studies (e.g. Aas et al. 1996, Morán et al. 2001). More recently, the use of parallel incubations under light and dark conditions when measuring BP was strongly recommended (Gasol et al. 2008). Further, the high diversity of sunlight effects on leucine and thymidine bacterial incorporation rates reported in the literature questions the earlier assumed detrimental influence of light (Ruiz-González et al. 2013), and yet studies involving light incubations are scarce, especially in freshwater ecosystems.

The hypertrophic Albufera de Valencia lagoon (Spain) was selected to study the aforementioned issues. This shallow lagoon located on the Mediterranean coast shifted from a clear to a turbid state as a consequence of intense eutrophication processes that started in the 1960s, and resulted in the loss of the macrophyte cover (Vicente & Miracle 1992, Romo et al. 2005). In its present state, the lagoon is hypertrophic, with a phytoplankton community dominated by cyanobacteria. However, short 'clear-water' events occasionally occur in the winter, as a result of the 'flushing' experienced by the lagoon during the draining of the surrounding flooded paddies. These events are characterized by a dramatic decrease in water turbidity and total phytoplankton biomass, a reduction in the relative contribution of cyanobacteria to the composition of the algal assemblages, and the growth of large cladocerans (Miracle & Sahuquillo 2002, Romo et al. 2005). However, the response of heterotrophic bacteria to these events remains unstudied to this point.

The objectives of this work were mainly (1) to assess the seasonal BP variability and, more specifically, to examine how closely BP follows the variations in water turbidity, and (2) to test whether there is a clear diel pattern of bacterioplankton production in hypertrophic lakes. The effects of light/dark incubations on incorporation rates of  $^3\text{H}$ -leucine and  $^3\text{H}$ -thymidine by heterotrophic bacteria were also investigated. Additionally, our study aimed to shed light on the upper limit of BP in hypertrophic systems. In doing so, we address a major knowledge gap by providing insights into the dynamics and contribution of bacterioplankton to the carbon cycle in hypertrophic lakes.

## MATERIALS AND METHODS

### Study site and experimental design

Albufera de Valencia is a shallow, oligohaline (salinity = 1‰) lagoon located on the Mediterranean coast, 15 km south of the town of Valencia (Spain). It covers an area of approximately 24 km<sup>2</sup> and has a mean depth of about 1 m. At present, Albufera de Valencia is a turbid lake dominated by phytoplankton, predominantly cyanobacteria (Vicente & Miracle 1992, Romo et al. 2008). The lake is surrounded by an extensive area of 223 km<sup>2</sup> used for rice cultivation, which was formerly part of the lake. Numerous irrigation ditches run through the area and end up in the lagoon, which is separated from the sea by a sand bar 500 to 1000 m wide. Three outlet channels with sluices connect the lake with the sea and allow the regulation of the water level according to the requirements for rice culturing. This determines the hydrological cycle of the lagoon, with a period of high water level during late autumn, when the paddies are flooded but contain no culture, a period of considerably high water flow during winter, driven by the draining of the flooded area, a period of low water renewal from May to September throughout the rice growing season, and a secondary period of moderately high water flow after harvest (end of September to October).

The study consisted of 2 sets of *in situ* experiments. The first set comprised 4 experiments that aimed to compare BP in winter versus summer conditions. Experiments were carried out on 23 to 25 February 2011, 24 and 25 January 2012, 22 February 2012, and 2 and 3 August 2011 at 2 different times, namely around noon and in the afternoon. BP was estimated at 3 depths: 0.2, 0.8, and 1.1 m, applying both light and dark incubations. The experiments took place at a central location of the lagoon. The second set of experiments aimed to study diel variations in BP and comprised 2 diel cycles. BP was measured on the east shore of the lagoon on 24 and 25 April and 7 and 8 May 2012 approximately every 4 h at a depth of 0.6 m. Water samples for all measured variables and BP experiments were collected with a Ruttner hydrographic bottle, except for those at 0.2 m, which were collected with a jar, and kept in the dark and cold until they were processed.

### Limnological variables and bacterial enumeration

Water conductivity, pH, salinity, oxygen saturation (O<sub>2</sub>%), and temperature were measured *in situ* with a

WTW Multi 350i set. Secchi disk depth was also recorded. Vertical profiles of photosynthetic active radiation (PAR,  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) were obtained during the experiments with a flat-faced quantum sensor (LiCor Li-1000). For the determination of dissolved inorganic nutrients and DOC, water subsamples were filtered on glass-fiber filters (GF/F, Whatman) upon arrival in the lab. Following the methodology described in APHA (1992), soluble reactive phosphorus (SRP-P) was determined by the Murphy and Riley method. Ammonia ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) was analyzed by the indophenol blue method, and the cadmium reduction method was used for the determination of both nitrate and nitrite ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ). Total nitrogen and total phosphorus were measured using the aforementioned methods for the respective dissolved fractions (SRP-P and  $\text{NO}_2\text{-N}/\text{NO}_3\text{-N}$ ), after unfiltered samples underwent an acidic or alkaline digestion, respectively. Alkalinity (Alk) was determined by the Wattenber method. Total suspended solids (TSS) and loss on ignition (LOI) were also determined as specified in APHA (1992). The inorganic fraction of suspended solids was calculated by subtracting LOI from TSS. Soluble DOC and total organic carbon (TOC) were measured by high temperature combustion with a Total Organic Carbon Analyzer (Shimadzu TOC-VCSH) as described in ISO (1997). A standard solution of potassium hydrogen phthalate diluted in Milli-Q water was used for calibration. Chlorophyll *a* (chl *a*) concentrations were determined from samples collected onto glass-fiber filters (GF/F, Whatman). Filters were immediately placed inside a glass vessel and stored at  $-80^\circ\text{C}$  in the dark until they were processed. Chl *a* was extracted in a 1:1 (v/v) mixture of dimethyl sulfoxide (DMSO) and 90% acetone as described by Shoaf & Lium (1976) and analyzed spectrophotometrically.

Samples for enumeration of bacteria were preserved in a mixture of paraformaldehyde and glutaraldehyde (100  $\text{g l}^{-1}$  wv and 0.5% final concentration, respectively) and stored at  $4^\circ\text{C}$  until they were processed. Subsamples were filtered on black polycarbonate filters (0.2  $\mu\text{m}$ , Millipore) and stained with DAPI (final concentration 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) following a modification of the protocol described by Porter & Feig (1980). Micrographs were taken on an epifluorescence microscope (Zeiss III RS), and then bacterial morphotypes were separately counted on them. Cell volume was estimated based on measurements of dimensions in these micrographs using the general formula as in Sommaruga (1995). Cell carbon content was then derived by applying a conversion factor of 0.2  $\text{pg C } \mu\text{m}^{-3}$  (Simon & Azam 1989).

### Bacterial $^3\text{H}$ -leucine and $^3\text{H}$ -thymidine incorporation experiments

Leucine and thymidine incorporation rates (LIR and TIR) were measured by the  $^3\text{H}$ -leucine (Kirchman et al. 1985) and the  $^3\text{H}$ -thymidine (Fuhrman & Azam 1982) methods, respectively, following the modification of the protocol described by Smith & Azam (1992). Prior to water collection, L-[3,4,5- $^3\text{H}$  (N)]-Leucine (Perkin Elmer; specific activity 3.7 to 5.56  $\text{TBq mmol}^{-1}$ ) was added to Eppendorf vials to obtain a final concentration of 10 nM. Thymidine, [Methyl- $^3\text{H}$ ] (Perkin Elmer; specific activity 2.59 to 3.33  $\text{TBq mmol}^{-1}$ ) at a final sample concentration of 5 nM was added to another set of vials. The vials were kept in the cold and dark until the beginning of the incubations. All experiments started immediately after water collection. For each depth and radio-tracer, the collected water was distributed into 2 sets of 5 Eppendorf vials (sample volume 1.2 ml), each comprising 4 replicates plus a formalin-killed control. Each set of vials was then placed in a PAR-transparent or in an opaque Winkler bottle filled with water from the corresponding depth and hung from a buoy with a rope at the sampling depth. For the diel cycle experiments, only the PAR-transparent incubations were performed using 6 replicates plus 1 control. Incubations lasted 1 h in winter and spring or 45 min in summer and were stopped with 120  $\mu\text{l}$  of ice-cold 50% (5% final concentration) trichloroacetic acid (TCA) and stored in ice until processed. In the lab, both samples and controls were centrifuged and aspirated, and the remaining pellets were rinsed with 1 ml of 5% ice-cold TCA. The samples were centrifuged and aspirated again, and 1 ml of scintillation cocktail (Sigma-Fluor (TM) High Performance LSC Cocktail, for aqueous samples, S4023) was added to the vials. Radioactivity of samples and radiolabeled solutions was measured with a Perkin-Elmer LSA Tri-Carb 2810TR liquid scintillation counter, and LIR and TIR were subsequently calculated. Incubation times were determined by time courses, which showed that LIR and TIR increases were linear for at least 1 h.  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -leucine saturation courses were also performed. The obtained LIR and TIR were fitted to the hyperbolic function of Michaelis-Menten kinetics by iterative least-squares nonlinear regression analysis. Based on this regression, we verified that 5 and 10 nM corresponded approximately to the half-saturation concentration for  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -leucine, respectively. The results therefore show that our experiments were performed at half-saturation con-

centrations (i.e. data on LIR and TIR presented throughout the paper were obtained at half-saturation concentrations). For this reason and exclusively for the estimation of BP, the obtained TIR values were multiplied by a factor of 2 to approximate them to those obtained at saturating levels. BP was calculated afterwards by applying a theoretical conversion factor of  $2 \times 10^{18}$  cell mol<sup>-1</sup> of incorporated <sup>3</sup>H-thymidine (Ducklow & Carlson 1992) and then multiplying by a mean cell carbon content value derived from the biovolume empirically obtained for each sample. Hourly areal bacterial production (HBP) was estimated by the trapezoidal method. Daily areal bacterial production (DBP) was calculated from the weighted average of HBP values at different day times.

### Statistical analyses

Normality of data and homogeneity of variance were checked with Kolmogorov-Smirnov and Levene's tests, respectively, before data analysis. One-way ANOVA, Kruskal-Wallis, or Mann-Whitney tests were used to analyze significant differences ( $p < 0.05$ ) in the measured variables with depth, light treatments, samplings times, or dates. Significant differences were further explored using post hoc analyses (Tukey *b*-test). Correlation between variables was estimated with Pearson's correlation coefficient (*r*). All statistical analyses were performed using SPSS Statistics 20.0 software.

## RESULTS

### Environmental variables, bacterioplankton abundance, and biomass

Water conductivity varied across experimental dates, being highest in February 2012. Water transparency was higher in winter and lower in spring as reflected by Secchi depth and chl *a* (Table 1). Chl *a* was in the range of hypertrophic lakes and displayed important seasonal variations, with spring values being up to 5 times higher than the minimum observed in February 2012. The water column was well mixed with pH, temperature, and conductivity values that did not vary by more than 3% with depth. Inorganic nitrogen showed great seasonal variability, with high winter concentrations that decreased in spring and became distinctly lower in summer. TP-P and SRP-P concentrations also varied, showing

higher values during spring and lower values in summer. DOC and TOC were higher in summer than on the other sampling dates (Table 1).

Bacterial abundance and biomass are shown in Table 1. Bacteria are grouped as (1) filamentous bacteria, with volumes up to  $5.57 \mu\text{m}^3$  and in some cases longer than  $50 \mu\text{m}$ , (2) small cocci (cell diameter  $< 0.6 \mu\text{m}$  and cell volume  $< 0.1 \mu\text{m}^3$ ), and (3) 'other bacteria,' which included cocci (diameter  $0.6$ – $1.5 \mu\text{m}$ ), bacilli (length  $1$ – $2.6 \mu\text{m}$ ), and curved bacteria (length  $0.7$ – $4 \mu\text{m}$ ). Since bacterial aggregates only appeared sporadically (i.e. more than 99% of bacteria present were free-living organisms), particle-attached bacteria were not taken into account. Hence, in this study, the term bacterial abundance refers to free-living bacterial abundance. Although filamentous bacteria represented only 3 to 13% of bacterial abundance, they amounted to as much as 78% of total bacterial biomass in both January and April 2012, averaging 60% in the other samplings. In contrast, small cocci were the most abundant group in all experiments, representing 44 to 64% of total abundance, but only a small portion of total biomass.

Bacterial abundance was fairly homogeneous across all experiments, ( $p > 0.05$ , ANOVA), whereas bacterial biomass displayed important variations. In both January and April 2012, bacterial biomass was significantly higher than in the other samplings ( $p < 0.05$ , ANOVA). On the other hand, bacterial biomass was significantly lower in May 2012 than on the other sampling dates ( $p < 0.05$ , ANOVA). Further ANOVA comparisons performed for individual bacterial morphotypes showed that the biomass of filamentous bacteria was significantly higher both in January and April 2012 ( $p < 0.05$ , ANOVA) and significantly lower in May 2012 ( $p < 0.05$ , ANOVA). In contrast to bacterial biomass, bacterial abundance reached its minimum in January 2012.

During the diel cycle experiments, bacterial biomass was higher towards the end of the night. In May, variations were greater than in April (coefficients of variation of 21 and 11%, respectively), with values after midnight twice as high as those observed in early morning. In May, bacterial abundance followed a diel pattern similar to that observed for incorporation rates, evidenced by its significant correlation with LIR ( $r = 0.98$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ) or TIR ( $r = 0.88$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). During both cycles, bacterial biomass was positively correlated to  $\text{NO}_3\text{-N}$  ( $r = 0.8$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 11$ ),  $\text{NO}_2\text{-N}$  ( $r = 0.7$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) and negatively correlated to DOC ( $r = -0.82$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ ),  $\text{NH}_4\text{-N}$  ( $r = -0.75$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ ), and SRP ( $r = -0.76$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 11$ ).



Table 1. Mean  $\pm$  SD of physicochemical and biological parameters during the experiments, showing significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ANOVA/Kruskal-Wallis test) between experimental dates. Max: maximum value recorded during a sampling month. %: percentage contribution of each morphotype to bacterial biomass. TN: total nitrogen; SRP: soluble reactive phosphorus; TP: total phosphorus; LOI: loss on ignition; TSS: total suspended solids; TSS-LOI: inorganic fraction of suspended solids

	2011		2012				p
	February	August	January	February	April	May	
Temperature (°C)	14.7 $\pm$ 0.22	28.3 $\pm$ 0.73	11.5 $\pm$ 0.44	10.8 $\pm$ 0.86	19.26 $\pm$ 0.97	21.2 $\pm$ 1	***
Secchi depth (m)	0.50 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.03	0.25	-
Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	1643 $\pm$ 1.6	1894 $\pm$ 14.2	1632 $\pm$ 4.4	2015 $\pm$ 5.4	1774 $\pm$ 60	1656 $\pm$ 10	***
O <sub>2</sub> % <sub>max</sub>	145	141	152	137	197	181	*
pH <sub>max</sub>	8.65	8.98	8.8	8.78	9.48	10.05	***
Alkalinity (mg l <sup>-1</sup> )	36.7 $\pm$ 3.1	16.1 $\pm$ 0.7	34.7 $\pm$ 0.6	44.0 $\pm$ 0.7	14.8 $\pm$ 1.4	12.6 $\pm$ 1.1	***
NO <sub>3</sub> -N ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	1957 $\pm$ 81.8	1.62 <sup>a</sup>	940 $\pm$ 7.8	3066 <sup>a</sup>	1029.6 $\pm$ 195	378.6 $\pm$ 157	**
NO <sub>2</sub> -N ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	114.3 $\pm$ 2.3	1.1 <sup>a</sup>	35.7 $\pm$ 2.6	125 <sup>a</sup>	56.6 $\pm$ 4.1	30.4 $\pm$ 16	**
NH <sub>4</sub> -N ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	41.1 $\pm$ 15	5.89 <sup>a</sup>	40.3 $\pm$ 5	41.6 <sup>a</sup>	39.5 $\pm$ 17	140.8 $\pm$ 53	*
TN-N ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	4049 $\pm$ 353	3213 <sup>a</sup>	3364 $\pm$ 2	5476 <sup>a</sup>	5275 $\pm$ 211	4869 $\pm$ 329	**
SRP ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	0.83 $\pm$ 0.8	3.87 <sup>a</sup>	2.85 $\pm$ 1.7	2.16 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 1	16.5 $\pm$ 7.7	*
TP-P ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	136 $\pm$ 21	106 <sup>a</sup>	122 $\pm$ 4	130 <sup>a</sup>	348 $\pm$ 29	272 $\pm$ 15	**
LOI (mg l <sup>-1</sup> )	25.1 $\pm$ 3	55.9 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 0.8	20.7 $\pm$ 0.8	61 $\pm$ 3	62 $\pm$ 3	***
TSS-LOI (mg l <sup>-1</sup> )	16.3 $\pm$ 5	13.2 <sup>a</sup>	13.3 $\pm$ 3	5.6 $\pm$ 2	38 $\pm$ 14	38 $\pm$ 5	***
Dissolved organic carbon (mg l <sup>-1</sup> )	7.7 $\pm$ 0.2	12.1 $\pm$ 0.6	7.7 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.1	7 $\pm$ 0.1	8 $\pm$ 0.3	***
Total organic carbon (mg l <sup>-1</sup> )	13.5 $\pm$ 1.2	17.9 $\pm$ 1.3	12.8 $\pm$ 0.7	13.0 $\pm$ 0.8	14.4 $\pm$ 0.9	14.7 $\pm$ 0.7	***
Chlorophyll <i>a</i> ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	102 $\pm$ 9	113 $\pm$ 10	121 $\pm$ 4	64 $\pm$ 1	315 $\pm$ 17	301 $\pm$ 5	***
Unicellular bacterial abundance (10 <sup>6</sup> cells ml <sup>-1</sup> )	30.1 $\pm$ 5.3	24.5 $\pm$ 2.1	20.9 $\pm$ 7.9	22.4 $\pm$ 2.4	26.5 $\pm$ 1	25.4 $\pm$ 2.7	NS
Filament abundance (10 <sup>6</sup> filaments ml <sup>-1</sup> )	1.8 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.4	1890 $\pm$ 606	***
Bacterial biomass (mg C l <sup>-1</sup> )	2.30 $\pm$ 0.25	2.46 $\pm$ 0.37	3.04 $\pm$ 0.36	2.31 $\pm$ 0.24	3.03 $\pm$ 0.32	1.63 $\pm$ 0.3	*
% Small cocci ( $\varnothing < 0.6 \mu\text{m}$ )	16 $\pm$ 4	10 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	22 $\pm$ 11	***
% Cocci	7 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	*
% Bacilli	9 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	16 $\pm$ 3	8 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	*
% Curved bacteria	5 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0.7	4 $\pm$ 0.7	2 $\pm$ 0.4	4 $\pm$ 1	*
% Filamentous bacteria	63 $\pm$ 6	60 $\pm$ 2	76 $\pm$ 2	62 $\pm$ 11	74 $\pm$ 3	50 $\pm$ 10	*

<sup>a</sup>Unique measurements performed on 5 August 2011 and 23 February 2012, respectively

### Incorporation rates

LIR and TIR showed only moderate changes across experimental dates. Variations did not reflect a seasonal pattern, although in February 2012, a decrease was observed during a period of high water discharge through the lagoon and minimum chl *a* concentrations. LIR ranged from 49 to 391 pmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (mean  $\pm$  SE = 201  $\pm$  4.4, n = 208), whereas TIR ranged from 13 to 62 pmol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, (31  $\pm$  0.6, n = 217). The overall correlation between LIR and TIR when considering all experiments was significant (r = 0.62, p < 0.001, n = 60).

No clear pattern of LIR or TIR arose with depth. Nevertheless, LIR and TIR at 0.2 m were repeatedly higher than at 0.8 and/or 1.1 m (p < 0.05, Kruskal-Wallis test) (Fig. 1). Only differences between light

and dark incubations at 0.2 m are shown in Fig. 2, given the low light intensity recorded at the other depths. Although both LIR and TIR were generally higher in the light than in the dark, significant differences were only obtained in some light to dark comparisons, and these differences were small. Characteristically, no significant differences were found in summer.

The average light to dark ratio at 0.2 m for LIR was 1.09  $\pm$  0.08 and showed no correlation with any of the measured parameters. Interestingly, when considering data from all depths, the overall light to dark ratio for LIR (average = 1.09  $\pm$  0.2) was positively correlated to NH<sub>4</sub>-N (r = 0.54, p < 0.05, n = 14). At 0.2 m, the average light to dark ratio for TIR was 1.07  $\pm$  0.08. This ratio was negatively correlated with PAR (r = -0.75, p < 0.05, n = 8) and with T (r = -0.74, p < 0.05,

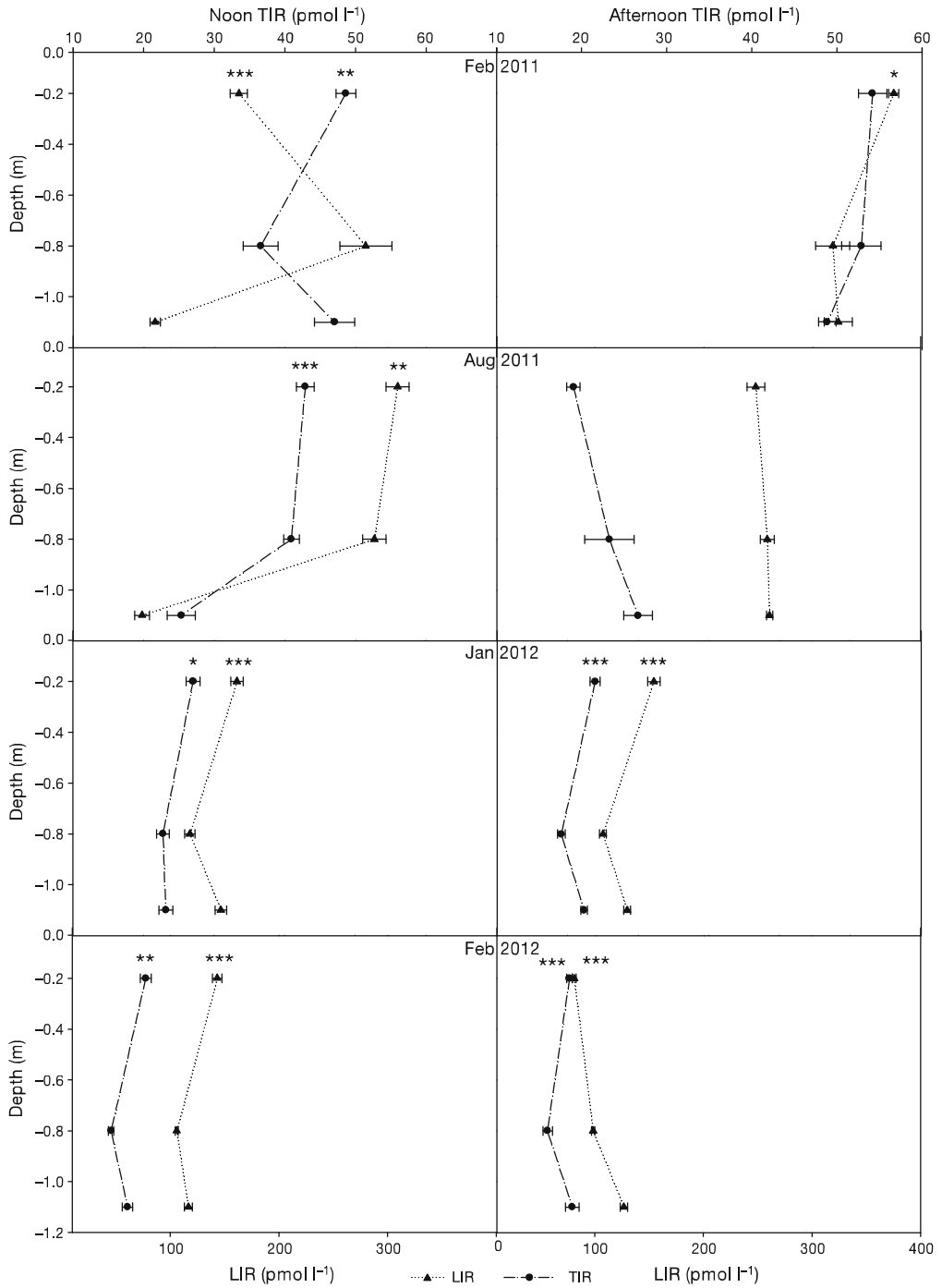


Fig. 1. Incorporation rates of  $^3\text{H}$ -leucine (LIR) and  $^3\text{H}$ -thymidine (TIR) at 3 depths. Plotted data are mean values from all incubations (light and dark) at each depth. Error bars represent standard error. Significant differences between depths ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test) are indicated by asterisks: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

$n = 8$ ). When considering data from all depths, the overall light to dark ratio for TIR was negatively correlated to DOC ( $r = -0.45$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 24$ ).

**Diel cycle experiments**

Bacterial incorporation rates showed a diel pattern during both cycles characterized by an increase

throughout the night followed by a marked decrease at sunrise (Fig. 3). This pattern was far more apparent in April, as reflected by the higher LIR and TIR coefficients of variation (Fig. 3). It is noteworthy that DOC displayed an obvious diel pattern during both cycles that opposes those found for LIR and TIR (Fig. 3). Significant differences between sampling times were found for both LIR and TIR and in both cycles (Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$ ). In April, further post hoc analyses showed that LIR and TIR during night experiments were significantly higher than at 18:00 and 08:30 h. Moreover, they were higher at 14:00 h than at the other times. In May, additional post hoc analyses showed that both LIR and TIR were higher at 05:00 h than at the other times, and LIR was significantly higher during hours of darkness than during daylight. Diel

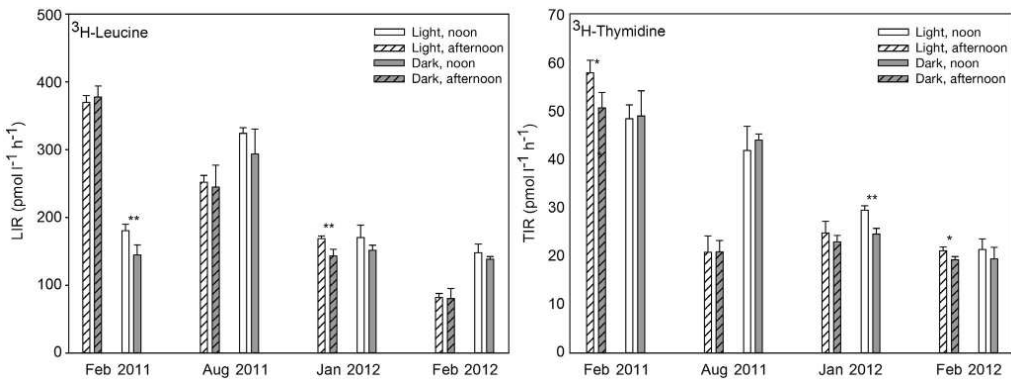


Fig. 2. Incorporation rates of  $^3\text{H}$ -leucine (LIR) and  $^3\text{H}$ -thymidine (TIR) at 0.2 m. Error bars represent standard deviations. Significant differences between light and dark incubations ( $p < 0.05$ , ANOVA test) are indicated by asterisks: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

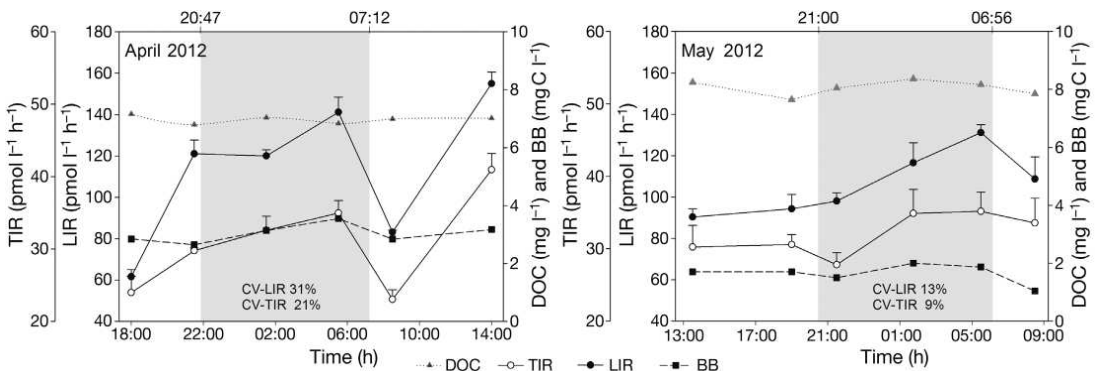


Fig. 3. Diel changes in dissolved organic carbon (DOC), bacterial biomass (BB), and incorporation rates of  $^3\text{H}$ -leucine (LIR) and  $^3\text{H}$ -thymidine (TIR) during 2 diel cycles. Coefficients of variation for LIR (CV-LIR) and TIR (CV-TIR) are also given. Error bars represent standard deviations. Local times for sunrise and sunset are also indicated on the top axis

variations in LIR and TIR practically paralleled each other in both cycles (Fig. 3), as shown by the strong correlation between LIR and TIR ( $r = 0.89$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 12$ ), although changes in TIR were appreciably less distinct than in LIR, which varied over a wider range.

**Relationship between LIR and TIR**

During the winter and summer experiments, the average LIR:TIR ratio was 6.39, and most values were close to this number, although in the experiments performed in summer and in the morning in February 2011, the ratio displayed wider variability (Fig. 4a). No significant differences in the LIR:TIR ratio were found between depths or light treatments ( $p > 0.05$ , ANOVA), but when the experimental dates were compared, the ratio in the summer afternoon experiment was significantly higher ( $p > 0.001$ , ANOVA). The LIR:TIR ratio in light-incubated samples was positively correlated with T ( $r = 0.56$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 24$ ), pH ( $r = 0.68$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 24$ ), and DOC ( $r = 0.61$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 24$ ).

During the spring experiments, the LIR:TIR ratio averaged 3.6 (SD 0.55) and 3.2 (SD 0.28) in April and in the May cycles, respectively, and did not differ significantly between both months. The LIR:TIR ratio showed only small variations throughout the diel cycle, with coefficients of variation of 15 and 8% in April and in May, respectively. Interestingly, the LIR:TIR ratio showed the same diel pattern in both cycles (Fig. 4b), with an increase after sunset and

higher values during the night hours. When winter, spring, and summer data were pooled, a positive correlation was found between the LIR:TIR ratio and DOC ( $r = 0.68$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 36$ ).

**Bacterial production**

BP varied from 5 to 20.6 mg C m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>. Because mean depth at Albufera is approximately 1 m, HBP was rather similar to BP. HBP did not display important seasonal variations (Fig. 5). Maximum values were observed in April 2012, whereas minimum

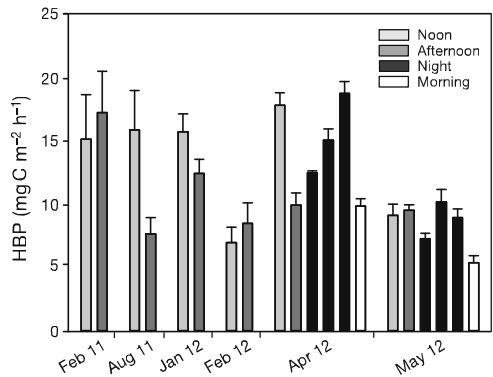


Fig. 5. Hourly areal bacterial production (HBP). The chronological order of April sampling times has been modified in order to obtain a comparable sequence between months

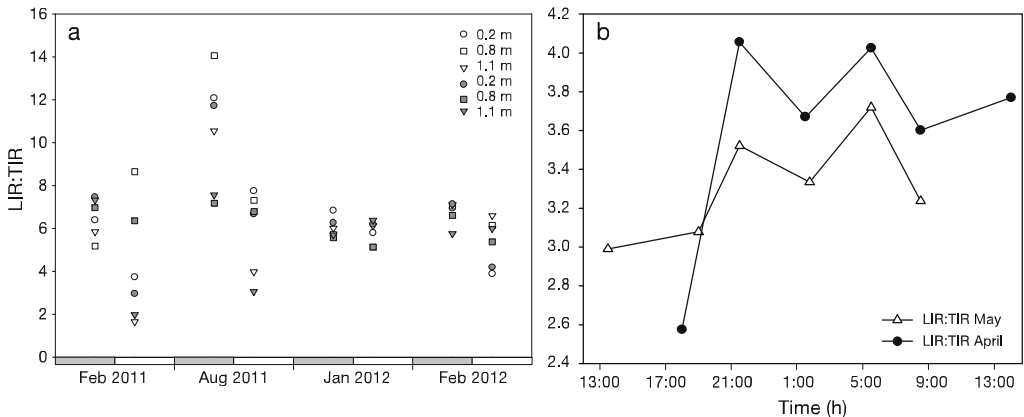


Fig. 4. (a) Ratio of <sup>3</sup>H-leucine to <sup>3</sup>H-thymidine incorporation rates (LIR:TIR) at 3 depths. White and dark symbols represent light and dark incubations, respectively. White and gray bars represent noon and afternoon, respectively. (b) LIR:TIR ratio during diel cycle experiments

values concurred with the lowest values of chl *a* and the highest water transparency in February 2012. During the winter-summer experiments, BP was positively correlated to chl *a* ( $r = 0.47$ ,  $p < 0.005$ ,  $n = 24$ ). During the diel cycle experiments, BP was negatively correlated to DOC ( $r = -0.68$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ) and  $\text{NH}_4\text{-N}$  ( $r = -0.61$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ). BP was significantly higher in April than in May ( $p < 0.01$ ,  $n = 12$ , Mann-Whitney).

## DISCUSSION

### Bacterioplankton abundance and biomass

Bacterial abundance was very high but within the range typically registered in the literature for hypertrophic lakes. In accordance with our results of approximately  $22\text{--}32 (\times 10^6)$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , values of  $1\text{--}30 (\times 10^6)$  cells  $\text{ml}^{-1}$  were found in a study including 55 highly enriched lakes (Auer et al. 2004). Sommaruga (1995) reported values which were higher in summer (up to  $20 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ), but in contrast to his findings, in our work bacterial abundance remained practically unchanged across seasons. We attribute the considerable bacterial abundance to the high turbulence characteristic of this large shallow lagoon, which favors sediment resuspension and thereby the return of nutrients to the water column, resulting in a high nutrient availability for bacteria. This is indicated by high LOI and TTS – LOI values, but also by the high nutrient concentrations and the low Secchi values observed (Table 1). Similar conclusions were suggested for the Neusiedlersee (Austria) by Dokulil (1984).

The attached:free-living bacteria ratio was low when compared to other hypertrophic lakes (Pedrós-Alió & Brock 1982, Torréton et al. 1994). This might be explained by the fact that in Albufera, algae are the major contributors to seston (G. Onandia et al. unpubl. data) and, thus, the amount of particulate detritus to which bacteria can be attached is small. In this respect, Albufera contrasts with other productive systems, where particulate detritus in the form of dead organic matter has been found to surpass particulate organic matter present as living material (Wetzel et al. 1972).

Bacterial biomass ( $1\text{--}3.6 \text{ mg C l}^{-1}$ ) was greater than the values of 74 and 563  $\mu\text{g C l}^{-1}$  reported by Auer et al. (2004) and Chrost et al. (2000), respectively, and exceeded the range of 80–443  $\mu\text{g C l}^{-1}$  described by Sommaruga (1995) because of large cell volumes. In our study, bacterial community mean cell volumes

ranged from 0.18 to 0.76  $\mu\text{m}^3$  due to the permanent presence of filamentous bacteria. Seasonal variations in bacterial biomass were caused mainly by differences in the proportions of this group. The high bacterial cell volumes observed in winter agreed with findings from Lake Rodó in Uruguay (Sommaruga & Psenner 1995), where cell volumes were inversely correlated to water temperature and there was a similar proportion of filamentous bacteria (4.5–16%) to our study (3–13%).

### Incorporation rates of radiotracers

Variations in LIR were greater than those in TIR, in accordance with observations in meso-eutrophic Lake Constance (Germany) and in the north-western Mediterranean Sea (Simon 1994, Gasol et al. 1998). Because LIR and TIR were estimated at half-saturation concentrations, the given values roughly correspond to half of those to be attained at saturating levels. Jørgensen (1992) stressed that natural leucine concentrations may influence the measured incorporation rates in eutrophic lakes due to extracellular isotope dilution. Using saturation leucine concentrations of 100 nM, that author obtained incorporation rates of 200 to 1450  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in Lake Bagsvaerd and 70 to 225  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in Frederiksborg Castle Lake, located in Denmark. Simultaneous measurements performed with 10 nM leucine concentrations yielded LIR of 20 to 125  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in the latter lake. Our LIR values (49–391  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) were generally lower than reported values for highly enriched lakes such as the shallow eutrophic Lake Layrac in France, with 1203  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Petit et al. 1999) or Lake Oglethorpe in the USA, with 600 to 6000  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (McDonough et al. 1986).

TIR ( $13\text{--}62 \text{ pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) agreed with values previously reported for eutrophic lakes such as Frederiksborg Castle and Bagsvaerd (Jørgensen 1992), where values were up to approximately 60  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Likewise, Petit et al. (1999) observed 25.6  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in Lake Laryac, and McDonough et al. (1986) found 1 to 40  $\text{pmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in Lake Oglethorpe. However, the thymidine concentrations used in our work were lower than those (10–20 nM) used in the aforementioned studies (with the exception of lake Laryac, 5 nM) and in other hypertrophic systems such as Lake Verevi in Estonia and Lake Szymon in Poland (Chrost et al. 2000, Tammert et al. 2005).

Contradictory results of both light stimulation and inhibition on the incorporation rates of radiotracers have been documented (Gasol et al. 2008, Ruiz-González et al. 2013), indicating a complex relation-

ship between PAR and BP. Research of the effects of natural solar radiation in hypertrophic lakes is very limited, but numerous studies have been performed in the ocean and in less enriched freshwater systems. Studies performed in the southwest lagoon of New Caledonia showed that both PAR and PAR plus different fractions of ultraviolet radiation inhibited TIR (Conan et al. 2008, Rochelle-Newall et al. 2008). Lindell et al. (1996) described inhibition or no effect of sunlight on LIR in 5 oligotrophic lakes in southern Sweden, and inhibitory effects of full solar radiation on LIR and TIR were described in a mesotrophic estuary in Florida (Aas et al. 1996), which in part might have been due to ultraviolet radiation. However, higher TIR under light than under dark conditions were observed in a hypertrophic lake (Sommaruga & Robarts 1997). Similarly, enhanced LIR and TIR under artificial light were found in littoral sea waters (Ruiz-González et al. 2012). In the present study, in which only PAR was taken into account, both LIR and TIR in the light were generally slightly higher than in the dark, in accordance with the findings of Sommaruga & Robarts (1997) and Ruiz-González et al. (2012). Nonetheless, our results indicate a possible interaction between light and other parameters. Nutrient availability has been highlighted by previous studies in the ocean (Morán et al. 2001) and seems to play an important role in amino acid uptake in Albufera de Valencia given the positive correlation found between the light:dark ratio of LIR and  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Moreover, a negative correlation was found between the TIR light:dark ratio and variables with higher values in summer such as DOC. No significant differences between light treatments were found for any of the radiotracers in summer, whereas some significant differences were observed during winter experiments. The results suggest that light influence on incorporation rates is not detected when DOC concentrations are very high but it may interfere when DOC is lower. A possible underlying mechanism cited in a recent review (Ruiz-González et al. 2013) is the indirect enhancement of bacterial activity in light-incubated over dark-incubated samples through higher phytoplankton extracellular organic release availability.

#### Diel cycle experiments

Our results indicate that in Albufera de Valencia, diel changes in BP are related to the availability of DOC. As BP increases, DOC is depleted from the water column, yielding a negative correlation between these variables. If we consider that given the

extremely high primary production in the lagoon in spring (G. Onandia et al. unpubl. data), autochthonous DOC very likely overshadowed the contribution of allochthonous DOC to the DOC total pool; this relationship suggests that BP is dependent upon the extracellular organic release from phytoplankton. Significant correlations between BP and  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ , or SRP-P were also observed, but it is difficult to exclusively attribute this relationship to bacterial activity, given the tight interplay between these nutrients and other biological food web components such as primary producers and zooplankton.

Diel cycles in BP have been observed in other eutrophic lakes. Diurnal variations were reported for the hypertrophic Lake Verevi, with highest values in the afternoon (Tammert et al. 2005), although no night measurements were performed in this study. In agreement with our results, higher BP towards and during the night has been found in several eutrophic shallow lakes (e.g. Bagsvaerd, Vörtsjärvi, and Bietri, Jørgensen 1992, Torrétón et al. 1994, Kisand et al. 1998) and in the deep meso-eutrophic Lake Constance during the spring bloom (Simon 1994). In the latter study, a peak in leucine-estimated BP at noon was observed in accordance with our observations during the April diel cycle. However, the same author found inconsistent diel cycles of bacterial activity after the decline of the spring diatom bloom, coinciding with previous observations in eutrophic waters (Riemann & Søndergaard 1984).

#### Relationship between LIR and TIR

BP has been extensively measured with  $^3\text{H}$ -thymidine and to a lesser degree with  $^3\text{H}$ -leucine, whose incorporation reflect DNA and protein synthesis, respectively. The combined use of both radiotracers constitutes an assessment tool for the reliability of BP estimates, providing independent BP values (Kirchman et al. 1985, Chin-Leo & Kirchman 1990, Franco-Vidal & Moran 2011). Therefore, the significant correlation found between LIR and TIR verifies the reliability of the measurements performed in this work. The incorporation ratio of LIR to TIR reflects the growth state of the bacterial community (Chin-Leo & Kirchman 1988, Hoppe et al. 2006). In balanced growth conditions, the LIR:TIR ratio is expected to be constant (Gasol et al. 1998). The correlation found between LIR and TIR, and the relative constancy of the LIR:TIR ratio within seasons, suggests that synthesis of DNA and proteins were coupled. Nonetheless, the wider variability observed during

some samplings possibly indicates changes in bacterial growth state. We found a positive correlation of the LIR:TIR ratio with temperature, which has been found to modulate this quotient in different aquatic systems, although not always in the same way. Whereas an inverse relation was described during a seasonal study in mesotrophic Lake Paralepoup in France (Petit et al. 1999) and during temperature manipulation experiments (Shiah & Ducklow 1997), a positive relation was found in the ocean (Longnecker et al. 2006) and in a range of marine and freshwater systems (Tibbles 1996).

The high correlation found between LIR and TIR along diel cycles indicates balanced growth of the bacterial community during spring. Changes in the LIR:TIR ratio were small, meaning that at the short time scale at which experiments were done, no shift in bacterial growth rate took place. However, though small, the similar diel pattern changes in the LIR:TIR ratio observed along both diel cycles suggest that during sunset, protein synthesis is slightly favored over DNA synthesis. Few studies involving the simultaneous use of both radiotracers during diel cycles are available in freshwater ecosystems, but it is noteworthy that a similar increase in the LIR:TIR ratio towards the evening was found in Lake Bagsvaerd (Jørgensen 1992) and in Laguna Madre, a hypersaline, shallow coastal lagoon located in Texas (Chin-Leo & Benner 1991).

Seasonal variations in the LIR:TIR ratio seemed to be related to DOC availability, with higher concentrations of DOC favoring protein synthesis. These results contrast with the hypothesis that bacteria tend to allocate more resources into biomass accumulation under adverse environmental conditions (Petit et al. 1999). Even though our LIR:TIR ratio values (1.7–14) should be interpreted as an approximation, given that LIR and TIR were measured below saturating concentrations, they are close to the average found when considering a large range of aquatic systems: 7.0–9.5 (Servais 1992) and to the value of 9.1 reported for a eutrophic Danish lake (Riemann & Bell 1990).

### Bacterial carbon production

BP values plotted in Fig. 5 should be considered as rough estimates due to the uncertainties in the conversion of our TIR data into BP (i.e. we did not work at thymidine saturating concentrations, and a theoretical conversion factor was applied for the estimation of produced cells from TIR). The conversion factor of  $2 \times 10^{18}$  cells mol<sup>-1</sup> of incorporated <sup>3</sup>H-thymidine (Ducklow & Carlson 1992) used in the present

study has been widely used in the literature and more specifically in other hypertrophic lakes, such as Lake Verevi (Tammert et al. 2005). This conversion factor is close to the range of 1.9 to 2.2 cells mol<sup>-1</sup> obtained for a Swedish eutrophic lake (Bell et al. 1983), the average value of  $2.15 \times 10^{18}$  cells mol<sup>-1</sup> observed for freshwater bacteria (Smits & Riemann 1988), and the value of  $2.2 \times 10^{18}$  cells mol<sup>-1</sup> obtained in the eutrophic Little Crooked Lake in Indiana (Lovell & Konopka 1985). However, it should be noted that empirically derived conversion factors have been seen to vary temporarily and in relation to environmental aspects, such as nutrient concentrations, highlighting the importance of specific experimental determinations (Calvo-Díaz & Morán 2009). Therefore, future studies involving the estimation of empirical conversion factors are needed in order to more accurately quantify bacterial carbon production in this particular ecosystem. Nonetheless, since cell carbon content was based on bacterial biovolume calculated from microscopic observations for each experimental date, bacterial shape and biovolume were specifically addressed in our BP calculations. In spite of the mentioned uncertainties, the obtained HBP values ( $5.4\text{--}18.8$  mg C m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) were close to the range of  $0.62$  to  $11$  mg C m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> reported by Kisand et al. (1998) and to the values found by Petrucio & Barbosa (2004) in shallow Lake Carioca in Brazil ( $5.7$  mg C m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>). DBP ( $186\text{--}390$  mg C m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) was also comparable to the values of  $19.8$  to  $422$  mg C m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> and  $354$  mg C m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> observed in the hypertrophic Lakes Humboldt (in Canada) and Verevi, respectively (Robarts et al. 1994, Tammert et al. 2005). Similarly, daily volumetric BP ( $154\text{--}706$  mg C m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>) was close to the range of  $217$  to  $796$  mg C m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> reported for Lake Szymon (Chrost et al. 2000) and similarly agreed with estimations in Lake Rodó ( $72\text{--}1071$  mg C m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, Sommaruga 1995).

In conclusion, no major seasonal variations in BP were observed, in contrast with the important changes typically experienced by the phytoplankton community along the annual succession. However, a distinct PB decrease was observed as flushing clarified the water in late winter (indicated by a chl a minimum in February 2012), which was followed by a marked rise in spring, when chlorophyll peaked. We found an evident BP diel pattern in hypertrophic conditions, and this pattern was coupled to variations in DOC, suggesting a possible dependence of bacterioplankton on primary production. In view of the values reported in the literature, we can conclude that BP was high, although it did not surpass previous measurements in hypertrophic systems.

**Acknowledgements.** This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the project CGL2009-12229. We thank the rangers of the Oficina Técnica Devesa-Albufera and X. Soria for their assistance in the field in 2011 and 2012, respectively. We likewise thank J. M. Soria and O. Kramer for their help in the laboratory. We are also grateful to J. M. Gasol for his methodological advice and to C. Rochera, A. Camacho and 3 anonymous reviewers for their valuable comments.

## LITERATURE CITED

- Aas P, Lyons MM, Pledger R, Mitchell DL, Jeffrey WH (1996) Inhibition of bacterial activities by solar radiation in near-shore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat Microb Ecol* 11:229–238
- APHA (American Public Health Association) (1992) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, DC
- Auer B, Elzer U, Arndt H (2004) Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resource and predation. *J Plankton Res* 26:697–709
- Azam F, Fenichel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257–263
- Baines SB, Pace ML (1991) The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. *Limnol Oceanogr* 36:1078–1090
- Bell RT, Ahlgren GM, Ahlgren I (1983) Estimating bacterioplankton production by measuring [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in a eutrophic Swedish lake. *Appl Environ Microbiol* 45:1709–1721
- Calvo-Díaz A, Morán XAG (2009) Empirical leucine-to-carbon conversion factors for estimating heterotrophic bacterial production: seasonality and predictability in a temperate coastal ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 75:3216–3221
- Chin-Leo G, Benner R (1991) Dynamics of bacterioplankton abundance and production in seagrass communities of a hypersaline lagoon. *Mar Ecol Prog Ser* 73:219–230
- Chin-Leo G, Kirchman DL (1988) Estimating bacterial production in marine waters from the simultaneous incorporation of thymidine and leucine. *Appl Environ Microbiol* 54:1934–1939
- Chin-Leo G, Kirchman DL (1990) Unbalanced growth in natural assemblages of marine bacterioplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 63:1–8
- Chrost R, Koton M, Siuda W (2000) Bacterial secondary production and bacterial biomass in four Mazurian lakes of differing trophic status. *Pol J Environ Stud* 9:255–266
- Cole JJ, Findlay S, Pace ML (1983) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar Ecol Prog Ser* 43:1–10
- Conan P, Joux F, Torretón JP, Pujó-Pay M, Douki T, Rochelle-Newall E, Mari X (2008) Effect of solar ultraviolet radiation on bacterio- and phytoplankton activity in a large coral reef lagoon (southwest New Caledonia). *Aquat Microb Ecol* 52:83–98
- Dokulil M (1984) Assessment of components controlling phytoplankton photosynthesis and bacterioplankton production in a shallow, alkaline, turbid lake (Neusiedlersee, Austria). *Int Rev Gesamten Hydrobiol* 69:679–727
- Ducklow HW, Carlson CA (1992) Oceanic bacterial production. *Adv Microb Ecol* 12:113–181
- Franco-Vidal L, Moran XAG (2011) Relationships between coastal bacterioplankton growth rates and biomass production: comparison of leucine and thymidine uptake with single-cell physiological characteristics. *Microb Ecol* 61:328–341
- Fuhrman JA, Azam F (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar Biol* 66:109–120
- Gasol JM, Doval MD, Pinhassi J, Calderón-Paz JI, Guixa-Boixareu N, Vaqué D, Pedrós-Alió C (1998) Diel variations in bacterial heterotrophic activity and growth in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 164:107–124
- Gasol JM, Pinhassi J, Alonso-Sáez L, Ducklow H and others (2008) Towards a better understanding of microbial carbon flux in the sea. *Aquat Microb Ecol* 53:21–38
- Hoppe HG, Gocke K, Koppe R, Kraus G (2006) Changing bacterioplankton growth characteristics on a large spatial scale: oligotrophic versus mesotrophic ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 323:21–33
- ISO (International Organization for Standardization) (1997) Water analysis - Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC). ISO EN 1484. ISO, Geneva
- Jørgensen NOG (1992) Incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine and [<sup>3</sup>H]valine into protein of fresh-water bacteria: field applications. *Appl Environ Microbiol* 58:3647–3653
- Kirchman D, Kneen E, Hodson R (1985) Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl Environ Microbiol* 49:599–607
- Kisand V, Nõges T, Zingel P (1998) Diel dynamics of bacterioplankton activity in eutrophic shallow Lake Võrtsjärv, Estonia. *Hydrobiologia* 380:93–102
- Kuipers B, van Noort GJ, Vosjan J, Herndl GJ (2000) Diel periodicity of bacterioplankton in the euphotic zone of the sub-tropical Atlantic Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 201:13–25
- Lindell MJ, Granéli HW, Tranvik LJ (1996) Effects of sunlight on bacterial growth in lakes of different humic content. *Aquat Microb Ecol* 11:135–141
- Longnecker K, Sherr BF, Sherr EB (2006) Variation in cell-specific rates of leucine and thymidine incorporation by marine bacteria with high and with low nucleic acid content off the Oregon coast. *Aquat Microb Ecol* 43:113–125
- Lovell CR, Konopka A (1985) Seasonal bacterial production in a dimictic lake as measured by increases in cell numbers and thymidine incorporation. *Appl Environ Microbiol* 49:492–500
- McDonough RJ, Sanders RW, Porter KG, Kirchman DL (1986) Depth distribution of bacterial production in a stratified lake with an anoxic hypolimnion. *Appl Environ Microbiol* 52:992–1000
- Miracle MR, Sahuquillo M (2002) Changes of life-history traits and size in *Daphnia magna* during a clear-water phase in a hypertrophic lagoon (Albufera of Valencia, Spain). *Verh Int Verein Limnol* 28:1203–1208
- Morán XA, Massana R, Gasol JM (2001) Light conditions affect the measurement of oceanic bacterial production via leucine uptake. *Appl Environ Microbiol* 67:3795–3801



- Pedrés-Alió C, Brock TD (1982) Assessing biomass and production of bacteria in eutrophic Lake Mendota, Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 44:203–218
- Petit M, Servais P, Lavandier P (1999) Bacterial production measured by leucine and thymidine incorporation rates in French lakes. *Freshw Biol* 42:513–524
- Petrucio M, Barbosa F (2004) Diel variations of phytoplankton and bacterioplankton production rates in four tropical lakes in the middle Rio Doce basin (southeastern Brazil). *Hydrobiologia* 513:71–76
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25:943–948
- Riemann B, Bell RT (1990) Advances in estimating bacterial biomass and growth in aquatic systems. *Arch Hydrobiol* 118:385–402
- Riemann B, Søndergaard M (1984) Measurements of diel rates of bacterial secondary production in aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 47:632–638
- Roberts RD, Arts MT, Evans MS, Waiser MJ (1994) The coupling of heterotrophic bacterial and phytoplankton production in a hypertrophic, shallow prairie lake. *Can J Fish Aquat Sci* 51:2219–2226
- Rochelle-Newall EJ, Torréton JP, Mari X, Pringault O (2008) Phytoplankton-bacterioplankton coupling in a subtropical South Pacific coral reef lagoon. *Aquat Microb Ecol* 50:221–229
- Romo S, Villena MJ, Sahuquillo M, Soria JM and others (2005) Response of a shallow Mediterranean lake to nutrient diversion: Does it follow similar patterns as in northern shallow lakes? *Freshw Biol* 50:1706–1717
- Romo S, García-Murcia A, Villena MJ, Ballester VSA (2008) Tendencias del fitoplancton en el lago de la Albufera de Valencia e implicaciones para su ecología, gestión y recuperación. *Limnetica* 27:11–28
- Ruiz-González C, Gali M, Lefort T, Cardelus C, Simo R, Gasol JM (2012) Annual variability in light modulation of bacterial heterotrophic activity in surface northwestern Mediterranean waters. *Limnol Oceanogr* 57:1376–1388
- Ruiz-González C, Simó R, Sommaruga R, Gasol JM (2013) Away from darkness: a review on the effects of solar radiation on heterotrophic bacterioplankton activity. *Front Microbiol* 4:131
- Servais P (1992) Bacterial production measured by  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -leucine incorporation in various aquatic ecosystems. *Arch Hydrobiol Beih Ergbe Limnol* 37:73–81
- Shiah FK, Ducklow HW (1997) Bacterioplankton growth responses to temperature and chlorophyll variations in estuaries measured by thymidine:leucine incorporation ratio. *Aquat Microb Ecol* 13:151–159
- Shoaf TW, Liem BW (1976) Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethylsulfoxide. *Limnol Oceanogr* 21:926–928
- Simon M (1994) Diel variability of bacterioplankton biomass production and cell multiplication in Lake Constance. *Arch Hydrobiol* 190:283–302
- Simon M, Azam F (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 51:201–213
- Smith DC, Azam F (1992) A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using  $^3\text{H}$ -leucine. *Mar Microb Food Webs* 6:107–114
- Smits JD, Riemann B (1988) Calculation of cell production from [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation with freshwater bacteria. *Appl Environ Microbiol* 54:2213–2219
- Sommaruga R (1995) Microbial and classical food webs: a visit to a hypertrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* 17:257–270
- Sommaruga R, Psenner R (1995) Permanent presence of grazing-resistant bacteria in a hypertrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 61:3457–3459
- Sommaruga R, Roberts RD (1997) The significance of autotrophic and heterotrophic picoplankton in hypertrophic ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 24:187–200
- Tammert H, Kisand V, Noges T (2005) Bacterioplankton abundance and activity in a small hypertrophic stratified lake. *Hydrobiologia* 547:83–90
- Tibbles BJ (1996) Effects of temperature on the incorporation of leucine and thymidine by bacterioplankton and bacterial isolates. *Aquat Microb Ecol* 11:239–250
- Torréton JP, Bouvy M, Arfi R (1994) Diel fluctuations of bacterial abundance and productivity in a shallow eutrophic tropical lagoon. *Arch Hydrobiol* 131:79–92
- Vicente E, Miracle M (1992) The coastal lagoon Albufera de Valencia: an ecosystem under stress. *Limnetica* 8:87–100
- Wetzel RG, Rich PH, Miller MC, Allen HL (1972) Metabolism of dissolved and particulate detrital carbon in a temperate hard-water lake. *Mem Ist Ital Idrobiol* 29(Suppl):185–243
- Winter C, Herndl G, Weinbauer MG (2004) Diel cycles in viral infection of bacterioplankton in the North Sea. *Aquat Microb Ecol* 35:207–216

*Editorial responsibility: Ruben Sommaruga, Innsbruck, Austria*

*Submitted: November 18, 2013; Accepted: April 21, 2014  
Proofs received from author(s): June 30, 2014*



## **Capítulo II**

### **Producción primaria en condiciones hipertróficas y su relación con la producción bacteriana**



**Capítulo II.** Onandia, G., Miracle, M.R., Vicente, E. 2014. Primary production under hypertrophic conditions and its relationship with bacterial production. *Aquatic Ecology*, 48 (4): 447-463. DOI 10.1007/s10452-014-9497-9.



## **Capítulo III**

### **Consumo de poblaciones naturales de algas y bacterias por el zooplancton en condiciones hipertróficas**





## **Zooplankton grazing on natural algae and bacteria under hypertrophic conditions**

Gabriela Onandia<sup>\*1</sup>, Juliana D. Dias<sup>2</sup>, Maria Rosa Miracle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Ecology, ICBiBE, University of Valencia, Calle Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Nupélia, Programa de Pós Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

\* Corresponding author. Tel: +34963544616. E-mail address: [gabriela.onandia@uv.es](mailto:gabriela.onandia@uv.es).

**RUNNING TITLE:** ZOOPLANKTON GRAZING UNDER HYPERTROPHIC CONDITIONS

**KEYWORDS:** *Daphnia magna*, *Bosmina longirostris*, clearance rates, shallow lake, carbon flux.

## Abstract

The grazing characteristics of the natural zooplankton community during the end of winter/onset of spring and mid spring, characterized by non-cyanobacteria vs cyanobacteria dominance, were studied in the shallow hypertrophic Albufera de Valencia (Spain). Clearance rates (CR's) of *Daphnia magna*, the dominant species in the end of winter/onset of spring, were low, very likely as a consequence of the high abundance of filamentous cyanobacteria in the lake. CR's were nearly equal for phytoplankton and bacteria, corroborating the unselective feeding of daphnids. Bacteria supplied 41% of the ingested planktonic carbon by *D. magna*, and this carbon was assimilated with the same efficiency as that provided by phytoplankton. This suggests a strong coupling between the microbial loop and the classical grazer trophic web during the end of winter/onset of spring in the lake. CR's of *Bosmina longirostris*, the dominant species in mid spring, were low, probably because food concentrations were well above the incipient limiting level. CR's were higher for algae 1-15  $\mu\text{m}$  than for bacteria  $< 1 \mu\text{m}$ , indicating positive selective feeding toward larger cells. Algae sized 3-15  $\mu\text{m}$  provided most of the ingested planktonic carbon by *B. longirostris*. Similarly, when regarding the total mid spring zooplankton community, phytoplankton contributed with 75% of the ingested planktonic carbon. This suggests that during periods of cyanobacteria dominance, there is a weak coupling between the microbial and classical trophic webs, and consequently the microbial loop contributes poorly to energy transfer to higher trophic levels (fish). Finally, grazing consumed a negligible proportion of the standing stock of bacteria and especially of phytoplankton biomass during the two studied periods, which highlights the reduced ability of zooplankton to control phytoplankton growth in hypertrophic systems.

## Resumen

La capacidad filtradora de la comunidad natural de zooplancton fue estudiada durante principios y mediados de primavera, periodos caracterizados por la dominancia de cianobacterias vs no-cianobacterias, en el lago somero e hipertrófico de La Albufera de Valencia (España). Las tasas de filtración (CR's) de *Daphnia magna*, la especie dominante a principios de primavera, fueron bajas, probablemente como consecuencia de la elevada abundancia de cianobacterias filamentosas en el lago. Las CR's fueron prácticamente iguales para fitoplancton y bacterias, corroborando la alimentación no selectiva de los dáfnidos. Las bacterias proporcionaron el 41% del carbono planctónico ingerido por *D. magna*, y este carbono fue asimilado con la misma eficiencia que el suministrado por el fitoplancton. Esto sugiere un estrecho acoplamiento entre el bucle microbiano y la red trófica clásica a principios de primavera en el lago. Las CR's de *Bosmina longirostris*, la especie dominante a mediados de primavera, fueron bajas, posiblemente debido a que las concentraciones de alimento estaban sobre el "nivel saturante de ingestión". Las CR's fueron más altas para algas de 1-15  $\mu\text{m}$  que para bacterias 1-15  $\mu\text{m}$ , indicando una selección positiva de las células de mayor tamaño. Las algas de 3-15  $\mu\text{m}$  proporcionaron la mayor parte del carbono planctónico ingerido por *B. longirostris*. Asimismo, si se considera toda la comunidad zooplanctónica de mediados de primavera, el fitoplancton aportó el 75% del carbono planctónico ingerido. Esto sugiere que durante periodos en los que dominan las cianobacterias, hay un acoplamiento débil entre el bucle microbiano y la red trófica clásica, y consecuentemente el bucle microbiano contribuye escasamente a la transferencia de energía a niveles tróficos superiores (peces). Finalmente, el zooplancton consumió una mínima proporción de la biomasa de bacterias y especialmente de fitoplancton existente en el lago durante los periodos estudiados, lo que evidencia la reducida capacidad del mismo para controlar el crecimiento de fitoplancton en sistemas hipertróficos.

## **Introduction**

Hypertrophic lakes are characterized by sustaining an exceptionally high phytoplankton biomass. However, the larger part of this biomass generally consists of filamentous and colonial cyanobacteria, inedible to most zooplankton and causing additional distress to large cladoceran's feeding mechanism. Consequently, hypertrophic lakes are often dominated by cyclopoids and rotifers and present a low zooplankton: phytoplankton biomass ratio (Havens et al., 2007; Fermani et al., 2013). In addition to phytoplankton, heterotrophic bacteria might provide an alternative food source for zooplankton. The bacterivory of zooplankton has been widely described in the literature (Tóth and Kota, 1997; Work and Havens 2003; Miracle et al., 2014), which poses a question on the importance of bacteria in channeling the energy to zooplankton through the microbial food web in hypertrophic lakes.

Numerous studies have investigated the food selectivity and grazing characteristics of zooplankton. However, the majority of them involved the use of culture food suspensions, often monospecific (Lair, 1991; Tóth and Kota, 1997; He and Wang, 2006). There are few data on grazing estimations based on natural plankton suspensions, especially containing both algae and bacteria as in the natural assemblage. Further, the available information in this regard is especially scarce for hypertrophic lakes.

The shallow hypertrophic lagoon of Albufera de Valencia provides a representative study case for this kind of systems. This lagoon shifted from a clear to a turbid state as a consequence of an eutrophication process that started in the 1960's (Vicente et al., 1992; Romo et al., 2005). Today the lagoon totally lacks macrophytes and it is in a turbid state dominated by phytoplankton, namely cyanobacteria (Onandia et al., 2014a). Nonetheless, the lagoon experiences short "clear-water" events in late winter (January-March). These events are the result of the management of the lagoon, which is "flushed" in winter when the water contained in the neighboring rice paddies flows

through the lagoon into the sea. During this period, there is a decrease in algal biomass mainly caused by the decline of cyanobacteria. After the flushing period, the water flow through the lagoon is strongly reduced and cyanobacteria dominance reestablished.

The main objectives of this work are to study the grazing characteristics of the natural zooplankton community in Albufera de Valencia during periods of contrasting cyanobacteria dominance *i.e.*, end of winter/onset of spring vs mid spring, characterized by non-cyanobacteria vs cyanobacteria dominance. More specifically, we aimed to assess the qualitative and quantitative importance of different algal and bacterioplankton size fractions to zooplankton feeding.

## **Materials and methods**

### **Study site and general methods**

Albufera de Valencia is a shallow, oligohaline (salinity  $\approx 1$  ‰) lake on the Mediterranean coast, 15 km south of the town of Valencia (Spain). With an extension of approximately 24 km<sup>2</sup> and a mean depth of about 1 m, Albufera is currently a hypertrophic, cyanobacteria dominated lake, with chlorophyll-*a* (Chl-*a*) concentrations over 100 µg/L most of the year (>300 µg/L in spring). More detailed information on the history and limnological lake characteristics can be found in Vicente & Miracle (1992) and Romo et al. (2008).

The study consisted of two sets of experiments, which aimed to assess grazing aspects in the end of winter/onset of spring and mid spring: 29/03/2011 and 16/05/2012. Additionally, a number of selected variables were measured in the experimental site on these dates as described in Onandia et al. (2014b). Water conductivity, pH, salinity and temperature were measured in situ with a WTW Multi 350i set. Secchi disk depth was recorded and vertical profiles of photosynthetic active radiation were obtained

with a flat-faced quantum sensor (LiCor Li-1000) to calculate attenuation coefficient  $K_d$ . Water samples were taken with a Ruttner bottle (50 cm length) by placing the top of the bottle at about 30 – 40 cm depth for chemical and biological analyses. Total nitrogen (TN), total phosphorus (TP) and alkalinity (Alk) were estimated following the methodology described in APHA (1992). Total organic carbon (DOC) was measured by high temperature combustion with a Total Organic Carbon Analyzer (TOC-VCSH) as described in ISO (1997). Chl-*a* concentrations were determined spectrophotometrically as described by Shoaf & Lium (1976). Samples from lake water and feeding suspensions were preserved in Lugol's solution until the enumeration of algal cells in 3mL sedimentation chambers with an inverted microscope at 1000X. Cell biovolume was calculated as described by Hillebrand et al. (1999) and transformed to biomass using a conversion factor of  $0.225 \text{ pgC}/\mu\text{m}^{-3}$  for mixed phytoplankton populations (Reynolds 2006).

Samples from lake water and feeding suspensions for enumeration of heterotrophic bacteria (hereinafter referred as bacteria) were preserved in a mixture of paraformaldehyde and glutaraldehyde (100 g l<sup>-1</sup> wv and 0.5% final concentration, respectively), filtered on black polycarbonate filters (0.2  $\mu\text{m}$ , Millipore) and stained with DAPI (Porter & Feig, 1980). Bacteria were then counted on epifluorescence microscope microphotographs (Zeiss III RS). Cell volume was estimated based on dimensions measured in these microphotographs using the general formula as in Sommaruga (1995) and transformed to carbon by applying a conversion factor of  $0.2 \text{ pg C } \mu\text{m}^{-3}$  (Simon & Azam 1989). Autotrophic picocyanobacteria was also evaluated in the same microscopic slides under green light excitation.

Zooplankton samples were taken from lake water by filtering two Ruttner bottles (2.7 L capacity each) through a 30  $\mu\text{m}$  nylon mesh and preserved with formalin 4%. Zooplankton from these samples and from the experimental vials was counted using an inverted microscope. Rotifer biomass was calculated using species carbon conversion factors (Latja and Salonen, 1978; Telesh et al., 1998). Microcrustaceans lengths, once measured, were converted to biomass according to Dumont et al. (1975)

and Bottrell et al. (1976) and to C assuming that C contents is 0.48 of dry weight (Andersen and Hessen, 1991).

### **End of winter/onset of spring and mid spring grazing experiments**

Our experimental design targeted the estimation of clearance and assimilation rates, as well as assimilation efficiency of *D. magna*, the dominant zooplankton species in the end of winter/onset of spring 2011, on natural algae and bacteria under natural-resembling conditions.

Twenty-four hours prior to the grazing experiments, a suspension of radiolabeled phytoplankton and bacteria was prepared. Freshly collected water from Albufera Lake was filtered through a 25  $\mu\text{m}$  nylon mesh and labeled with both [Methyl- $^3\text{H}$ ] – Thymidine (Perkin Elmer; specific activity 2.59 to 3.33 TBq  $\text{mmol}^{-1}$ ; final concentration = 5 nM) and  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (DHI; specific activity 39035 kBq  $\text{mL}^{-1}$ ; final concentration = 4  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ). The suspension was incubated 24 hours at 15  $^\circ\text{C}$  and 110  $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (16 h light: 8 h dark cycle). During the incubation period,  $^3\text{H}$ -thymidine was incorporated into bacterial DNA and labeled carbon into phytoplankton biomass. Thereafter, the suspension was centrifuged (12 m at 3500 r.p.m), aspirated, and the remaining pellets were rinsed with in lake water filtered through glass-fiber filters (GF/F, Whatman, hereinafter referred as pure lake water), centrifuged and aspirated again, and resuspended in pure lake water.

One day before the grazing experiments, 250 ml of freshly collected water from the lake and filtered through a 25  $\mu\text{m}$  sieve was distributed into 5 plastic vessels (containing 50 ml each). Five adult *Daphnia magna* individuals (collected from the lake at the same time) were added to each vessel and allowed to acclimate during 24 h under the same conditions as the radiolabeled suspension. In order to estimate clearance rates, 5 ml of water were extracted from each zooplankton vessel and replaced by 5 ml of radiolabeled solution. *Daphnia* were allowed to feed for 8 minutes, then anaesthetized with carbonized water and subsequently fixed with sucrose-formalin (40%).

For the assimilation rates determination, 5 ml of water was extracted from each zooplankton vessel and replaced by 5 ml of radiolabelled food solution. Daphnia were allowed to feed for 30 minutes, then filtered through a 50  $\mu\text{m}$  sieve and immediately transferred to a vessel containing 50 ml of unlabeled lake water filtered through a 25  $\mu\text{m}$  sieve. The animals were allowed to evacuate their guts for a period of 45 min, then anaesthetized with carbonized water and subsequently fixed with sucrose-formalin (40%). In all experiments, after animals were fixed they were collected on a 50  $\mu\text{m}$  sieve and fully rinsed with a 4% sucrose-water solution to eliminate radiolabeled cells potentially attached to them. The same procedure was followed for the blanks, although the animals were killed with a sucrose-formalin (40%) before the start of the clearance or assimilation rates experiments. The animals were then placed in a glass vessel containing a 4% sucrose-water solution and stored at 4 °C. Within 1 day, they were transferred with a minimum amount of liquid to a scintillation vial.

### **Mid spring grazing experiments**

Our experimental design targeted the estimation of clearance and assimilation rates of the dominant species, *Bosmina longirostris*, but also the estimation of clearance rates of < 100  $\mu\text{m}$  and the 50-100  $\mu\text{m}$  zooplankton size fractions, together with the mass specific clearance rates of the entire zooplankton community.

Twenty-four hours prior to the grazing experiments, two food suspensions were prepared. The preparation of the first suspension targeted to radiolabel the phytoplankton cells < 15  $\mu\text{m}$  present in the natural assemblage. To this end, freshly collected water from Albufera Lake was filtered through a 15  $\mu\text{m}$  nylon mesh and labeled with  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (same activity as in the end of winter/onset of spring experiment). The preparation of the second suspension aimed to radiolabel the heterotrophic bacteria < 3  $\mu\text{m}$  naturally present in the lake water. In order to do so, freshly collected water was filtered through a 3  $\mu\text{m}$  filter and labeled with both [Methyl- $^3\text{H}$ ] – Thymidine (Perkin Elmer; same activity as in the end of winter/onset of spring experiment) and L-[3,4,5- $^3\text{H}$  (N)]-Leucine (Perkin Elmer; specific activity



3.7 to 5.56 TBq mmol<sup>-1</sup>; final concentration = 5 nM ). Both suspensions were incubated 20 hours at 20 °C and 110 μEinsteins m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (16 h light: 8 h dark cycle). Thereafter, the suspension containing radiolabeled phytoplankton cells < 15 μm was filtered through a 3 μm filter (Whatman Nucleopore Track-Etch Membrane PC MB 47 mm) to obtain the 3-15 μm and < 3 μm algal size fractions. Likewise, the suspension containing radiolabeled heterotrophic bacteria < 3 μm was serially fractioned in order to obtain the 1-3 μm (Whatman Nucleopore Track-Etch Membrane Nuclpo 47 mm 1 μm) and 0.2-1 μm (Whatman Cyclopore Track-Etch membrane Cyclo PE 47mm 0.2 μm) bacterial size fractions. With the aim of maximizing the similarity between the food suspensions and the natural plankton community (<15 μm), the size fraction of labeled algae/bacteria were resuspended in unlabeled lake water containing the complementary plankton size fractions *i.e.*, the algal 3-15 μm fraction was resuspended in unlabeled < 3 μm filtrate.

The next step involved the preparation of seven sets of 4 microcosmos (3 replicates plus a control) containing concentrated zooplankton (2:1) in 40 ml of freshly collected unfiltered lake water with the natural zooplankton community. In order to estimate the clearance rates of the zooplankton community on food suspensions containing combinations of different natural plankton size fractions, every microcosm set was subjected to one of the following treatments, which involved the addition of the following suspensions:

- a) 5 ml 15-3 μm <sup>14</sup>C + 5ml <3 <sup>14</sup>C
- b) 5 ml 15-3 μm <sup>14</sup>C + 5ml 3-1 <sup>3</sup>H 5 ml 15-3 μm <sup>14</sup>C + 5 ml <1 <sup>3</sup>H
- c) 5 ml <3 <sup>14</sup>C + 5ml 3-1 <sup>3</sup>H
- d) 5 ml <3 <sup>14</sup>C + 5ml <1 <sup>3</sup>H
- e) 5 ml 3-1 <sup>3</sup>H 5 ml <1 <sup>3</sup>H

All treatments had the same total concentrations of phytoplankton and bacteria found in <15 natural water filtrate. After the radiolabeled suspensions were added, the

animals were allowed to feed for 15 minutes, then anaesthetized with carbonized water and filtered through a 50  $\mu\text{m}$  sieve fully rinsed with water ( $\text{pH} = 7.8$ ) to eliminate radiolabeled cells potentially attached to them.

For the assimilation experiments, two sets of 4 microcosms (3 replicates + 1 control) were prepared with 40 ml of unfiltered lake water. Each set of microcosms was subjected to treatment b and e, respectively. After the radiolabeled suspensions were added, zooplankton was allowed to feed for 50 minutes, then filtered through a 50  $\mu\text{m}$  sieve, rinsed carefully with water and immediately transferred to a vessel containing 50 ml of unlabeled lake water filtered through a 15  $\mu\text{m}$  sieve. The animals were allowed to evacuate their guts for a period of 45 min, then anaesthetized with carbonized water and filtered through a 50  $\mu\text{m}$  sieve and fully rinsed as above.

In all experiments, once the animals were filtered and rinsed, they were immediately transferred to a Petri dish containing a 4% sucrose-water solution, fixed with formalin (4%) and stored at 4 °C. The same procedure was followed for the blanks, although the animals were killed with sucrose-formalin (4%) before the start of the clearance or assimilation rates experiments. Within 1 day, the animals from each microcosm were separated as follows: firstly, 20 individuals of *B. longirostris* were removed from the sucrose-water solution; secondly, the rest of the animals were counted and then serially filtered, first through a 100  $\mu\text{m}$  and lastly through a 50  $\mu\text{m}$  Nyltal sieve. The nyltal sieves (15 mm diameter) with collected animals were transferred with a minimum amount of liquid to a scintillation vial.

### **Radioactivity measurements and calculations**

In both experiments, after the animals were transferred to a scintillation vial and the remaining liquid evaporated, 250 mL of Soluene-350 (Perkin Elmer) was added to them. After 24 hours, 10 mL of scintillation cocktail (Sigma-Fluor TM High Performance LSC Cocktail, for aqueous samples, S4023) was added. Radioactivity of grazing suspensions and radiolabeled suspensions was measured with a PerkinElmer LSA Tri-Carb 2810TR liquid scintillation counter.

Clearance rates were calculated as:  $CR = (dpm_{\text{individual}} - dpm_{\text{blank}}) / dpm_{\text{grazing suspension}} \times t$ , where  $CR = \text{ml individual}^{-1}\text{h}^{-1}$  and  $t = \text{time in hours}$ . Ingestion rates ( $IR, \mu\text{m}^3 \text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) were calculated by multiplying  $CR$  by the corresponding biovolume of algae or bacteria in the feeding suspension. For the calculation of  $IR$  of algae, only the biovolume corresponding to edible organisms present in the radiolabeled solution were taken into account; we considered as edible chlorophyta, bacillariophyta and a minor part of cyanophyceae excluding filaments of the genus *Planktonlyngbya* and *Pseudanabaena*, and the colonies of *Merismopedia*, *Aphanotece* and *Aphanocapsa*. In the case of  $IR$  of heterotrophic bacteria, all present morphotypes were considered edible. In order to estimate mass specific carbon ingestion rates, carbon contents of ingested biovolume per hour was calculated and divided by the individual carbon content in the corresponding grazing suspension. Assimilation rates ( $AR$ ) were calculated as described for  $CR$  and assimilation efficiency was subsequently as:  $AE = CR/AR \times 100$ . Mass specific clearance rates were estimated

## Results

The physicochemical conditions at the time of zooplankton grazing experiments in the lake are shown in Table 1. The hypertrophic state of the lagoon is illustrated by the high  $TN$ ,  $TP$  and  $Chl-a$  concentrations, together with water turbidity (Wetzel and Likens, 2001). Water temperature ( $T$ ) was  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  higher in the mid spring period. The elevated phytoplankton spring growth is indicated by the markedly high values of  $Chl-a$  in May, nearly duplicating those in March, as well as by the concomitant differences in  $P$ ,  $N$  and  $C$ . In correspondence, water turbidity was higher (reflected by  $K_{\text{ext}}$  and Secchi depth). Similarly variables associated to photosynthetic activity pointed out to its spring upsurge (high  $pH$ , low alkalinity)

**Table 1.** Main limnological characteristics on experimental dates (29-03-2011 and 17-06-2012).

	28/03/2011	16/05/2012
T (°C)	16.2	21.2
pH	8.9	9.6
Cond (µS)	1426	1656
Chl- <i>a</i> (µg/L)	177	301
Secchi (m)	0.4	0.35
K <sub>ext</sub>	4.7	7.1
TP (µg/L)	174	262
TN (mg/L)	4.7	5
TN-DIN (mg/L)	2.8	4.3
Alk (mg/L)	24.4	15.8

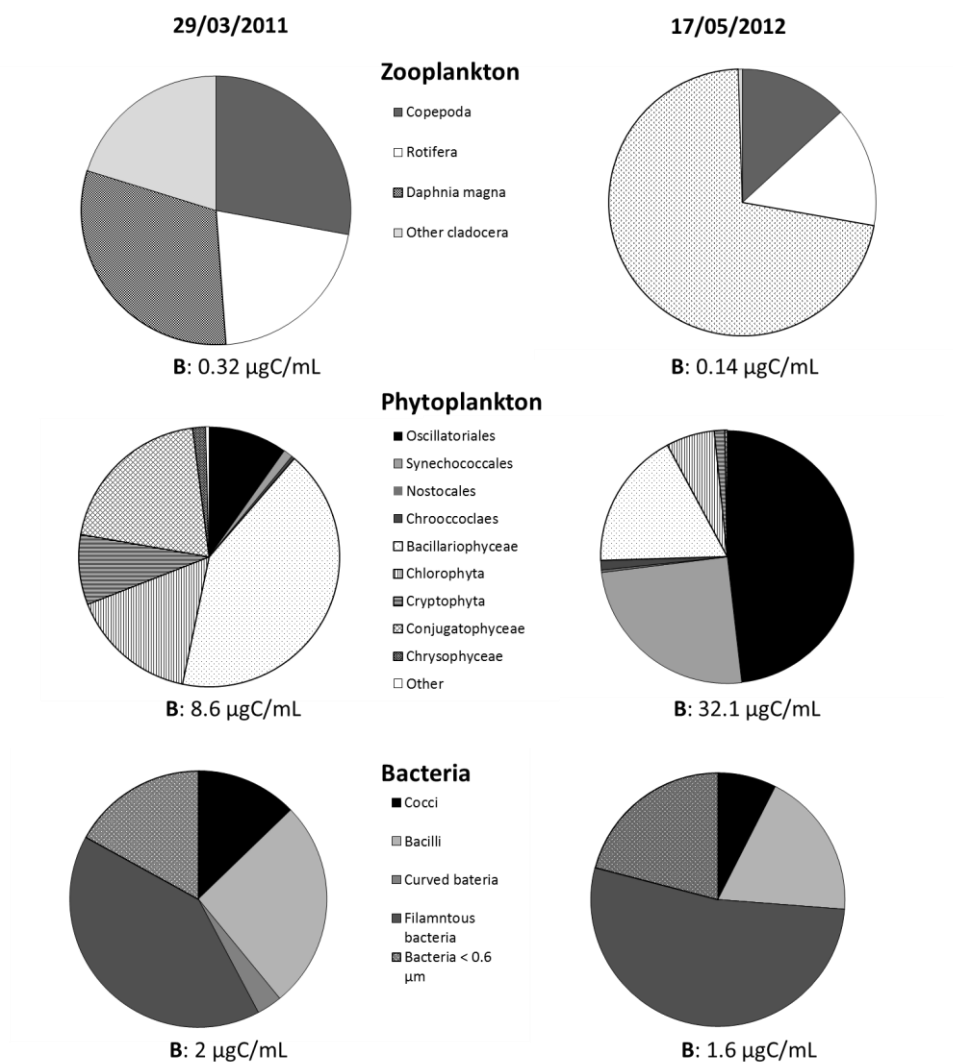
### End of winter/onset of spring grazing experiments

In 26 March 2011, cladocera represented more than 50% of the total zooplankton biomass (Fig. 1). *Daphnia magna* was the dominant species (31 %), although *Alona rectangula* (14%) and *Chydorus sphaericus* (6%) were also well represented. The cyclopoid copepod *Acanthocyclops americanus* and rotifera contributed roughly with a 25% of zooplankton biomass each. Most abundant rotifer species were *Brachionus variabilis* (*D. magna* epibiont) and *Keratella cochlearis*, with a moderate presence of *Polyarthra* sp., and a minor presence of *Synchaeta* sp. and *Keratella tropica*. However these proportions differed in terms of individuals (Table 2).

The phytoplankton community (biomass 38.3 mm<sup>3</sup>/L) was noticeably dominated by bacillariophyceae (mostly *Nitzschia* sp. and *Fragilaria* sp.), which made up for 42% of the total phytoplankton biomass (Fig. 1). The conjugatophyceae *Cosmarium abbreviatum* represented also a significant biomass fraction (20%), slightly higher than the fraction composed by pooled wide variety of species of chlorophyta (e.g. *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus* sp., *Monoraphidium* sp., *Tetraedron* sp.). Cyanophyceae amounted to 11% of the total pool, with the main contributors being oscillatoriiales such as *Pseudanabaena galeata*. Minor but still well represented

groups were Cryptophyta, namely *Cryptomonas* sp., and chrysophyta. In terms of relative abundance, the proportions changed: cyanobacteria filaments (mainly *Pseudoanabaena*) and colonies represent respectively 10% and 1%. With regard to the bacteria community, the most significant biomass contribution was made by filamentous bacteria (40%), (Fig. 1), although its relative abundance with respect to total bacteria individuals is small (Table 2).

In the suspension containing labeled organisms  $<25 \mu\text{m}$ , the proportion of the different phytoplankton groups was very similar to that observed in the natural assemblage. However, total phytoplankton biovolume was  $17.2 \text{ mm}^3/\text{L}$ , approximately half of that found in the unfiltered lake sample. *Fragilaria* sp. and *Nitzschia* spp. were the dominant species (42%), but *Cosmarium abbreviatum* accounted for an important biomass fraction (25%). Chlorophyta and cyanophyceae contributed with 17% and 12% to total biomass, whereas cryptophyta and chrysophyta were represented 2.6% and 0.7%, respectively. Relative abundances of phytoplankton individuals were. Similarly, bacteria in the labelled suspension were distributed as described in the water sample (Fig. 1, Table 2).



**Figure 1.** Relative contribution of the different groups of zooplankton, phytoplankton and bacterioplankton to natural plankton biomass in the lake on the experimental dates. B: biomass ( $\mu\text{gC}/\text{mL}$ ).

**Tabla 2.** Abundance (ind/L) of the main zooplankton, phytoplankton and bacteria groups.

	Abundance (ind/mL)	
	29/03/2011	17/05/2012
<b>Zooplankton</b>		
Cladocera	0.23	1.75
Copepoda	0.51	0.58
Rotifera	0.82	0.46
<b>Phytoplankton (x 10<sup>3</sup>)</b>		
Filamentous and colonial cyanobact (inedible)	69	764
Edible cyanobacteria	7	200
Diatoms	43	107
Chlorophytes	31	44
Other	51	6
<b>Heterotrophic bacteria (x 10<sup>6</sup>)</b>		
Bacteria < 0.6 µm	18.2	17
Bacteria 0.7-3 µm	12.8	8.4
Filamentous bacteria	1.3	1.9

*Daphnia magna* CR's were nearly equal for both groups of organisms; no significant differences were found between CR's on phytoplankton and heterotrophic bacteria. However, IR's were significantly higher for algae than bacteria (Figure 2). If it is assumed that the ingestion of different algal groups was proportional to their biovolume in the labeled solution and that *P. galeata* was not ingested, bacillariophyta amounted to most of the ingested algal biomass (50%, Fig.2). The rest of *D.magna*'s diet was proportionated by *C. abbreviatum* and chlorophyta, whereas edible cyanobacteria and other alga made only a minor contribution (<0.003%). It should be noted, though, that despite *C. abbbreviatun* is ingested, it may not be assimilated because of its mucilage cover (Coesel 1997).

Mean mass specific carbon ingestion rates of *D. magna* for algae and bacteria are shown in Table 3. Bacteria contributed with 41% to the total (algae + bacteria)

ingested carbon. Assimilation efficiencies for phytoplankton, as well as for bacteria, were around 50% and did not differ significantly ( $p > 0.05$ ,  $n = 8$ , ANOVA test). In Albufera de Valencia, *D. magna* grazing removed 0.006% and 0.002% of the standing stock of total bacteria and phytoplankton in the end of winter/onset of spring.

**Table 3.** Mass specific carbon ingestion rates ( $\text{pgC pgC}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) and assimilation efficiency (%) of *D. magna* and *B. longirostris* for different labeled organisms.

	Labeled size in food suspensions ( $\mu\text{m}$ )				
	Algae			Bacteria	
	< 25			< 3	
<b>D. magna</b>					
Mass specific carbon IR* ( $\text{pgC pgC}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0.054 $\pm$ 0.005			0.036 $\pm$ 0.004	
Assimilation efficiency (%)	56 $\pm$ 2			51 $\pm$ 9	
<b>B. longirostris</b>	<b>1 - 15</b>	<b>3 - 15</b>	<b>1 - 3</b>	<b>1 - 3</b>	<b>&lt; 1</b>
Mass specific carbon IR* ( $\text{pgC pgC}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	32.5	21.4 $\pm$ 5.9	3 $\pm$ 0.3	4.6 $\pm$ 1.4	0.7 $\pm$ 0.2
Assimilation efficiency (%)		44 $\pm$ 20	52 $\pm$ 8	53 $\pm$ 20	73 $\pm$ 11

\* IR: ingestion rate

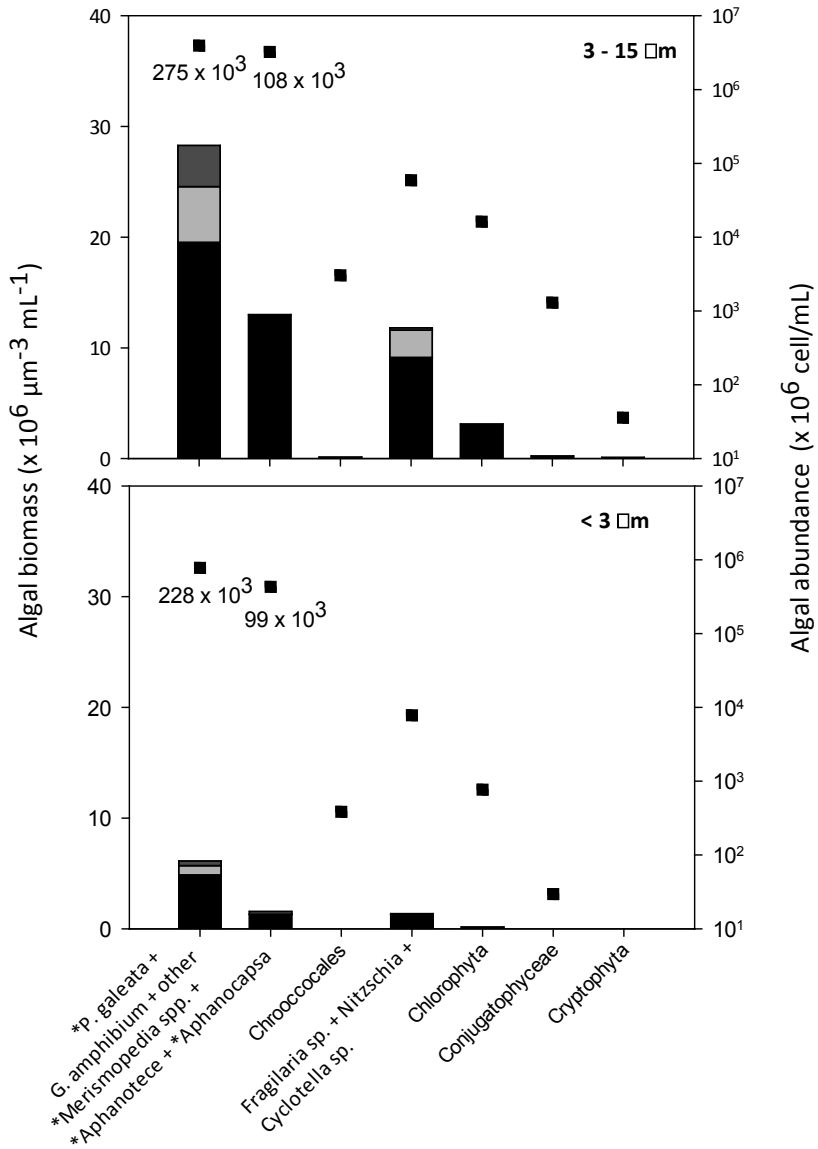
## Mid spring grazing experiments

In mid spring 2012, the zooplankton community was clearly dominated by the cladocera *Bosmina longirostris*, which amount to 72% of the zooplankton biomass (Fig. 1). Other cladocera species such as *Chydorus sphaericus*, *Alona rectangula* and *Ceriodaphnia laticaudata* were found, but they represented a negligible biomass fraction. The rest of the zooplankton biomass was made up by *Acanthocyclops americanus* and rotifers in similar share. Main rotifer species were *Brachionus calyciflorus* and *Keratella cochlearis*, though *Keratella tropica*, *Lecane bulla*, *Polyarthra* sp and *Hexarthra fennica* were also present in low numbers (Fig. 1). Proportions varied in terms of abundances (Table 2). Cyanobacteria were the main algal group, adding to 75% of total phytoplankton biomass. We have assumed that only a small proportion of cyanobacteria biomass (24%) was ingested by zooplankton,



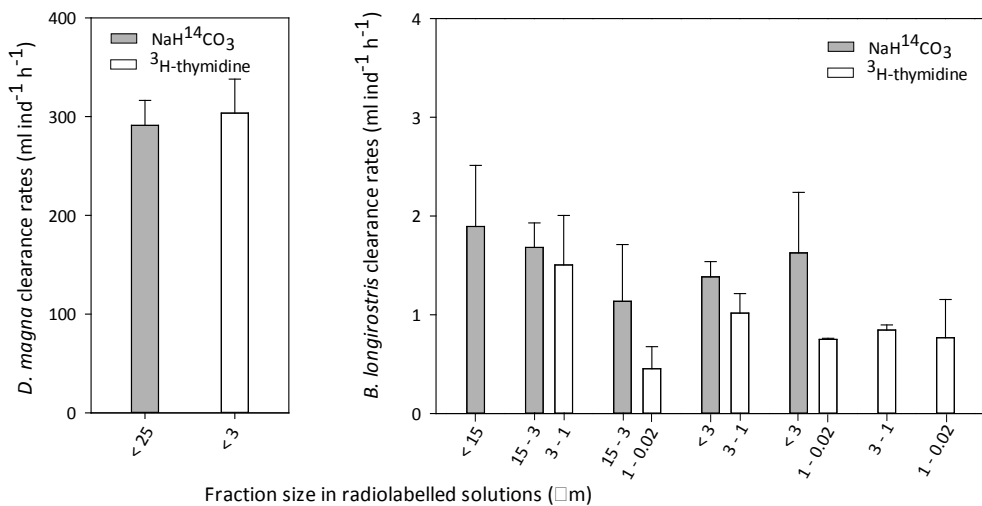
because the species that contributed more importantly to biomass were considered inedible, such as the filamentous *Pseudanabaena galeata*, (37 % numbers, 37% biomass) and colonial *Merismopedia* sp (38% numbers, 25% biomass). Next in importance were bacillariophyta (18%), mainly represented by species of the genus *Fragilaria* sp., *Nitzschia* sp. but also *Cyclotella* sp., along with chlorophyta (6%), with species such as *Oocystis* sp., *Scenedesmus* sp., *Tetraedron* sp., or *Lagerheimia* sp (Fig. 1). Filamentous bacteria dominated also the heterotrophic bacteria community in terms of biomass (50%), but their relative abundance was low (7%). Bacteria of the smallest size ( $< 0.6 \mu\text{m}$ ) were always the more numerous (62% of relative abundance) but the other bacteria (mostly  $1-3 \mu\text{m}$ ) are also abundant (Fig. 1).

The composition of the phytoplankton community present in the two radiolabeled phytoplankton suspensions was very similar and resembled that of the natural phytoplankton assemblage (Figs. 1 - 2). *P.galeata* and *Merismopedia* sp., dominated in terms of biomass but *Fragilaria* sp. also contributed importantly. However relative abundance of filaments or colonies was low with respect to total phytoplankton entities. In the  $3-15 \mu\text{m}$  fraction, phytoplankton abundance and biomass were markedly higher than in the  $< 3 \mu\text{m}$  fraction. Whereas in the former phytoplankton biomass amounted to  $56.6 \times 10^6 \mu\text{m}^{-3} \text{mL}^{-1}$ , in the latter was  $9.2 \times 10^6 \mu\text{m}^{-3} \text{mL}^{-1}$ . Likewise, phytoplankton abundance decreased from  $7.3 \times 10^6 \text{cell/mL}$  in the  $3-15 \mu\text{m}$  fraction, to  $1.2 \times 10^6 \text{cell/mL}$  in the  $< 3 \mu\text{m}$  fraction (Fig. 2).



**Figure 2.** Phytoplankton biomass (bars) and abundance (squares) in the radiolabeled food suspensions containing (a) 3-15  $\mu\text{m}$  and (b) < 3  $\mu\text{m}$  algae used in mid spring experiments (May 2012). Bar fractions are ordered corresponding to taxon names in x-axis. Numbers under squares indicate abundance (ind/mL).

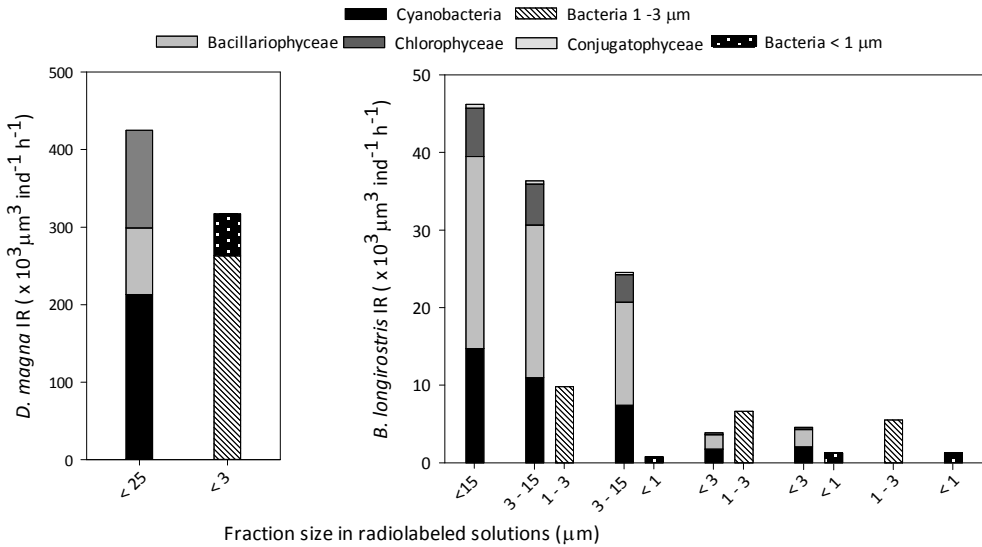
*B. longirostris* was found to clear all radiolabeled suspensions (Fig. 3). However, CR differed significantly across suspensions containing organisms with different size ranges. CR on algae in the size range 1-15  $\mu\text{m}$  were significantly higher than CR on bacteria < 1  $\mu\text{m}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 31$ , ANOVA test; Tukey-b test). No significant differences were found between CR on the two algae size fractions. Similarly, no significant differences were found between CR on the two bacteria size fractions, but the minimum CR was found for bacteria of the 0.2-1  $\mu\text{m}$  size class (Fig. 3).



**Figure 3.** Mean clearance rates ( $\mu\text{L ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) *D. magna* and *B. longirostris* in March 2011 and May 2012 for the different labeled organisms. Error bars indicate standard deviation.

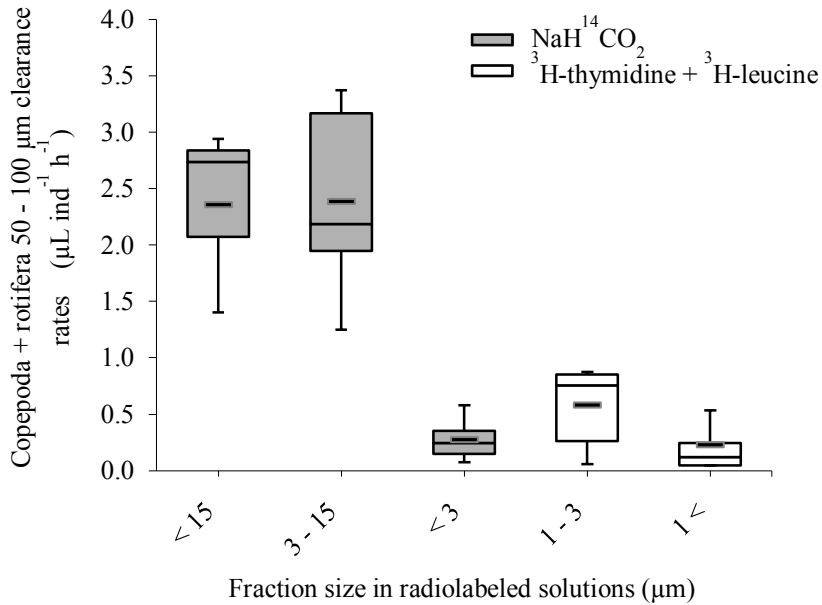
Assuming that IR was proportional to the corresponding biovolume of edible algae in the radiolabeled suspension (Fig. 4), more than half of the carbon ingested by *B. longirostris* was proportionated by *Fragilaria* sp.. Cyanobacteria such as *Geitlerinema* sp., *Jaaginema* or *Chroococcus* sp. contributed with approximately 30%, while chlorophytes consisting mainly of *Scenedesmus* sp. and *Monoraphidium* sp. provided around 15% of the total ingested biovolume (Fig. 4).

Mean mass specific carbon ingestion rate for *B. longirostris* decreased with cell size in the tested food suspensions (Table 3). *B. longirostris* assimilated around 50% of the ingested carbon, with the exception of higher values for bacteria < 1 μm (Table 3).



**Figure 4.** Mean ingestion rates ( $\mu\text{m}^3 \text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) of *D. magna* and *B. longirostris* in March 2011 and May 2012 for the different labeled organisms.

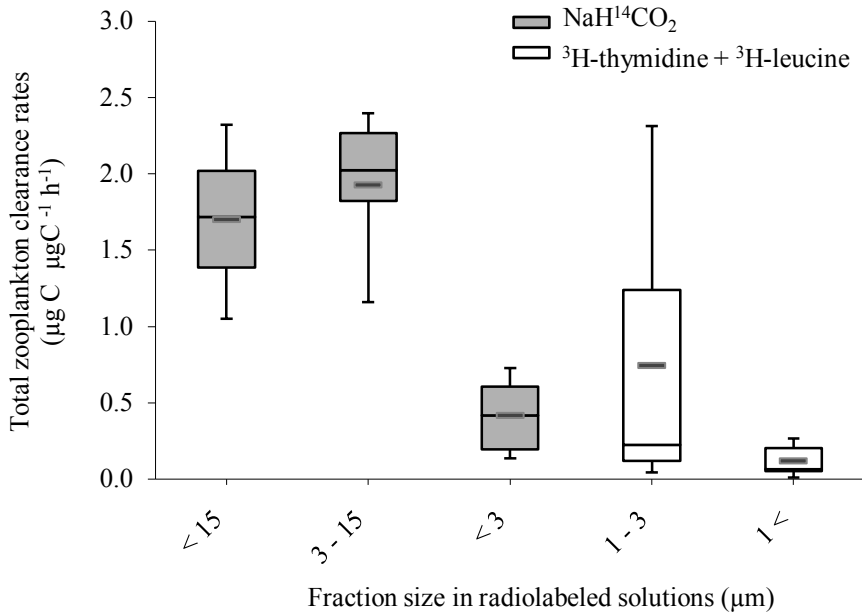
CR's of the zooplankton 50 – 100 μm size fraction, consisting of *Keratella cochlearis* and a small proportion of *A. americanus* naplii (Fig. 5a) differed significantly across different food suspensions. Filtering rates on algae in the size range 3-15 μm were significantly higher than those on algae in the size range 1-3 μm and on bacteria ( $p < 0.05$ ,  $n = 28$ , Kruskal-Wallis test; pairwise comparison).



**Figure 5.** Clearance rates of 50-100 µm zooplankton ( $\mu\text{L}^{-1} \text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) for the different labeled organisms in May 2012. Zooplankton consisted mainly of *Keratella cochlearis* and some *Acanthocyclops americanus* nauplii. Line within the box represents the median, black rectangles indicate mean, whiskers indicate 95% confidence intervals.

The total zooplankton community IR was 980 and 370  $\mu\text{m}^3/\text{h}$  for algae and bacteria, respectively (0.22 and 0.07  $\mu\text{g C}/\text{h}$  when translated into carbon IR). Therefore, bacteria contributed with 25% to the total carbon ingested (algae + bacteria). The total zooplankton community mean mass specific carbon ingestion rates are shown in Figure 6. The CR computed globally, pooling together cladocerans cyclopoids and rotifers resulted relatively higher for algae than for bacteria. There were significant differences across the tested food suspensions. Namely, CR's were significantly higher in the treatment with algae in the size range 1-15 µm than on all other treatments. Likewise, CR's on algae in the size range 3-15 µm were significantly higher than CR's for 1-3 µm algae and for the two bacterial size ranges ( $p < 0.05$ ,  $n =$

31, Kruskal-Wallis test; pairwise comparisons). The total zooplankton community consumed 0.9% and 7.2% of the total algal and bacterial standing stock in Albufera de Valencia in mid spring.



**Figure 6.** Total zooplankton community mass specific clearance rates ( $\mu\text{C}^{-1} \mu\text{gC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) in May 2012. Line within the box represents the median, black rectangles indicate mean, whiskers indicate 95% confidence intervals.

## Discussion

### End of winter/onset of spring grazing experiments

*D. magna* is markedly seasonal in Albufera Lake occurring only during winter months (Miracle et al. 2002) and peaking at the time of winter flushing, at the end of this season, thus aiding in water clearing. *Daphnia* is known to be an efficient filter feeder. However CR's of *D. magna* that we measured were quite low ( $0.3 \text{ mL ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Our rates laid at the bottom of the  $0.05 - 2.1 \text{ ml ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$  range found at  $15^\circ\text{C}$  in Dutch lakes and well below the CR of  $\approx 2 \text{ ml ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$  on *Scenedesmus* sp. reported for 1.8 mm length individuals of 4 *Daphnia* species (Gulati, 1978; DeMott et al., 2001).

These low rates were very likely caused by the high abundance of filamentous cyanobacteria ( $30.6 \times 10^3$  filaments/mL). Previous experiments in this lake with seston dilutions showed a marked decrease in *D. magna* clearance rates with increasing filament concentrations (Sahuquillo et al., 2007). By using a different methodology (beads), these authors reported a CR  $\approx 0.3 \text{ mL ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for a filament concentration very close to that tested in our experiments, thus coinciding completely with our results. Similarly, a study comprising different food suspensions with different proportions of *Cylindrospermopsis raciborskii* that resembled eutrophic conditions, indicated that the presence of *C. raciborskii* relative to suitable food resulted in reduced *D. magna* clearance rates (Pannoso and Lürling 2010). The extremely low CR of  $\approx 0.02 \text{ ml ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$  on filtered seston of the hypertrophic lake Breukeleveen ( $\approx 2 \times 10^5$  filaments/mL) obtained for individuals 1.8 mm length further supports our hypothesis (DeMott et al., 2001). With regard to daphnids grazing on bacteria, CR's of *D. pulex* (1.8 mm length) estimated in the laboratory with natural bacterioplankton from Toolik Lake in Alaska were around  $0.75 \text{ mL ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Peterson et al., 1978), a value that approximately doubled our estimations. However, CR's on bacteria were practically equal to those reported for *D. magna* feeding on the yeast *Rhodoturula glutinis* at  $15^\circ\text{C}$  (Bums, 1980). Given that CR's on algae and bacteria

where simultaneously estimated from a common food suspension, the mechanical interference caused by the high abundance of filamentous cyanobacteria very likely indirectly reduced the ability of *D. magna* to ingest bacteria.

*D. magna* CR were nearly identical for phytoplankton and bacteria, corroborating the unselective feeding of daphnids (Lampert, 1987). Few data are available on *D. magna* feeding under resembling-natural conditions, but in accordance with our results, *D. galeata* individual filtering rates estimated from the natural planktonic community of the eutrophic Bautzen reservoir were practically equal for phytoplankton and bacteria (Kamjunke et al., 1999). Likewise, on a study involving cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* (5-7  $\mu\text{m}$ ) and *Aerobacter aerogenes* (0.85  $\mu\text{m}$ ) as food suspensions, *D. magna* CR's were found to be similar for both food types (DeMott 1982).

*D. magna* IR were higher on phytoplankton than on bacteria as a consequence of the higher contribution of phytoplankton to the total biomass of the plankton community on the experimental date. In our study the biggest fraction of the ingested carbon (mass specific clearance rate) was proportionated by phytoplankton, but the share of bacteria in the total ingested pool was important (41%). A high bacterial contribution (42%) to the total ingested carbon by *D. galeata* was reported during the clear water phase in Bautzen reservoir associated to low algal biomass (Kamjunke et al., 1999). In Albufera de Valencia, algal biomass typically decreases at the end of winter (Onandia et al., 2014a; Romo et al. 2005), which might explain the important contribution of bacteria to *D. magna* carbon ingestion during this period. Additionally, we would like to highlight that detritus probably provided a part of the ingested carbon, but were not considered in the experiment.

*D. magna* assimilated around 50% of the ingested carbon when feeding on an algal concentration of 3.3 mgC/L. Our values are in good agreement with those found for *D. magna* in Dutch lakes with a seston concentration of 3.5 mgC/L and were close to the range 34 – 49% estimated for *D. magna* feeding on algal suspensions (containing



*Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*) with 3 mgC/L (Gulati, 1978; He and Wang 2006). There are few studies combining assimilation data on algae and bacteria, but it has been reported that zooplankton assimilates more efficiently algae (15 - 90%) than bacteria (3 - 50%) (Wetzel, 2001). Despite our values lay within the mentioned range, the fact that mass specific clearance rates and AE's were comparable for algae and bacteria highlights the role of bacteria as an important food source for zooplankton in the end of winter/onset of spring in the lagoon. Moreover, some algae such as *C. abbreviatum* (abundant at this time), may result difficult to assimilate because of the extracellular mucilaginous cover (Coesel 1997). These results might have broader implications for the annual succession of zooplankton, since it has been suggested that bacteria could provide an alternative food source during periods of low algal biomass (Kamjunke *et al.*, 1999).

### Mid spring grazing experiments

We found that *B. longirostris*, the dominant zooplankton species in this period, fed preferably on algae (size ranges 1-3, 3-15 and 1-15  $\mu\text{m}$ ) than on bacteria  $< 1 \mu\text{m}$ , indicating positive selective feeding toward larger cells. These rates were low because food concentrations were very high, *i.e.* well above the incipient limiting level. Nonetheless they lay within the compiled CR's range from numerous grazing studies on algae and bacteria reviewed in Tóth and Kato (1997). There are few studies in which CR's were estimated on natural plankton. In accordance with our results, *B. longirostris* CR's estimated in situ in three oligotrophic Ontario lakes indicated that *B. longirostris* filtered *Cosmarium impressulum* ( $\approx 28 \times 17 \times 12 \mu\text{m}$ ) more efficiently than *Chlorella vulgaris* (3 - 7  $\mu\text{m}$ ). Similarly, CR's estimated on nearly natural bacterioplankton were higher for bacteria 0.9-8.4  $\mu\text{m}$  than for bacteria  $\leq 0.45 \mu\text{m}$  (Tóth and Kato, 1997). Moreover, higher *Eubosmina* CR on natural bacterioplankton were obtained for attached bacteria ( $< 3 \mu\text{m}$ ) than for free living bacteria (0.2-1  $\mu\text{m}$ )

(Schoenberg 1989). Regarding to results obtained under laboratory conditions, higher *B. longirostris* CR's were found for *Chlamydomonas reinhardtii* (5-7  $\mu\text{m}$ ) than for *Aerobacter aerogenes* (0.85  $\mu\text{m}$ ), on separate or combined cultures of both species (DeMott 1982).

The fact that we did not find significant differences between CR's on bacteria 1-3  $\mu\text{m}$  and <1  $\mu\text{m}$  size, but CR's on algae 1-3  $\mu\text{m}$  were higher than those on bacteria < 1  $\mu\text{m}$  is possibly due to the higher mean size of algae when compared to bacteria (1.5 vs 1.2  $\mu\text{m}$ ) but also suggests that *B. longirostris* does not discriminate between particles below certain threshold size (*i.e.*, < 1.2  $\mu\text{m}$ ).

Unfortunately, we cannot infer mechanistic information on the selective feeding pattern observed from our data. Tóth and Kato (1997) attributed the selective feeding to passive selection through the filter mesh size on the fine gnathobasic filter plates rather than to active particle discrimination. However, based on mechanistic observations, DeMott and Kerfoot (1982) ascribed the differential feeding to a bimodal food collection: the first two pairs of thoracic limbs can be spread out to capture particles and the 3<sup>rd</sup> to 5<sup>th</sup> limbs can be used to filter fine particles. In view of our results, we cannot conclude that *B. longirostris* is a highly effective bacterial grazer. The outcome of previous studies is controversial. Toth and Kato (1997) concluded from a literature revision that very often the feeding efficiency of *B. longirostris* on both natural and cultured bacteria is low. However, these authors found that *B. longirostris* fed efficiently on natural bacterioplankton and suggested that this cladoceran could importantly shape the structure and size of the bacterial community.

The IR of *B. longirostris* were markedly higher on phytoplankton than on bacteria as a consequence of the higher contribution of phytoplankton to the total biomass of the plankton community in May 2012.

Mean mass specific carbon ingestion rate for *B. longirostris* was proportional to the cell size in the tested solutions, with algae 3 – 15  $\mu\text{m}$  representing the main ingested

carbon source for this species. These results suggest that during periods of cyanobacteria dominance in which *B. longirostris* dominate, the energy transfer from algae and bacteria occurs through the traditional food web rather than through the microbial one.

Our AE for algae 3-15  $\mu\text{m}$  were around 50%, substantially lower than 74–92 % estimated for *B. longirostris* feeding on an algal mixture (with mostly *Scenedesmus* and *Chlorella*) with concentrations ranging 0.05–2.50 mg C/L (Urabe, 1991). The high food concentration of our 3-15  $\mu\text{m}$  feeding suspension (5.4 mgC/L) might explain the discrepancy, since in agreement with the “superfluous feeding” theory, a negative relationship has been found between the AE of cladocerans and food concentrations (He and Wang, 2006). AE for algae 1-3  $\mu\text{m}$  or bacteria, but our values lay within the ranges usually reported for zooplankton (see above). The higher AE for bacteria < 1  $\mu\text{m}$  suggest higher digestibility of this bacterial group, however, given their small mean mass and low CR’s on this group, these results have to be considered with caution; for the same reasons, contribution of the smallest bacteria to the *B. longirostris* total ingested carbon can be considered of low relevance.

The 50-100  $\mu\text{m}$  zooplankton size fraction consisting mainly on *Keratella cochlearis* and a small proportion of nauplii, showed the highest CR’s on algae 3-15  $\mu\text{m}$ . *Keratella cochlearis* is able feed on particles of different sizes (*Aerobacter*, *Rhodotorula* and *Chlamydomonas*) including detritus and killed algal cells (Bodgan et al., 1980; Weisse and Frahm 2002; Starkweather and Bodgan 1980). However, IR’s of bacteria-sized particles is low (Ooms-Wilms et al. 1995). Moreover, it rarely ingests “flavored beads” and seems to have significant selection capabilities (DeMott, 1986). Furthermore, when cultured in filtered lake water, it did not reproduced and showed poor survival in <3 or <1  $\mu\text{m}$  filtrates, but it survived and reproduced well in the <15  $\mu\text{m}$  filtrates (Ooms-Wilms, 1997). Our results confirm *K. cochlearis* bacterivory, but also show their preference for phytoplankton.

When regarding the zooplankton community as a whole, ingestion rates (980 and 370  $\mu\text{m}^3/\text{h}$  for algae and bacteria) were equivalent to mass specific C ingestion rates per h of over 2  $\mu\text{gC}$  algae per  $\mu\text{gC}$  zooplankton and around 0.5  $\mu\text{gC}$  bacteria per  $\mu\text{gC}$  zooplankton. Bacteria contributed with 25% of the total ingested carbon by zooplankton as a consequence of its lower contribution to phytoplankton+bacteria biomass. Furthermore, the bacteria with very high relative abundances are very small ( $<0.6 \mu\text{m}$ , Table 2) and represent only 20 % of total bacteria biomass (Fig. 1), thus their contribution to ingested C was only 5%. These results probably reflect the feeding preferences of the dominant *Bosmina longirostris*. Nevertheless, consumed bacteria represents a much greater percentage than phytoplankton with respect to their respective biomass concentration in the water, because of the dense algal concentrations.

### **End of winter/onset of spring *versus* mid spring grazing experiments**

Physicochemical and biological parameters differed substantially between the studied periods. The composition of the phytoplankton community varied markedly. The variations in the phytoplankton assemblage are closely related to the hydrological management of the lagoon. The “flushing” experienced by the lagoon during winter favors the decrease of cyanobacteria biomass and the appearance of diatoms and chlorophytes, edible to daphnids. Thereafter, in mid spring, the strongly reduction of the flow through the lagoon promotes the increase of phytoplankton biomass and the reestablishment of cyanobacterial dominance (Onandia et al., 2014a). This was accompanied by a shift from a zooplankton community dominated by the large cladocera *D. magna* in the end of winter/onset of spring to a community dominated by the small *B. longirostris* later in mid spring.

Early works on the annual zooplankton succession in Albufera lake described the occurrence of *D. magna* in winter-spring, followed by the sporadic appearance of *D.*

*pulex* and a brief peak of *B. longirostris* (Blanco 1974). More recent studies in this lake have linked the appearance of *D. magna* to the mentioned decrease of cyanobacteria in the end of winter/onset of spring during “flushing” periods (Oltra and Miracle, 1992; Miracle and Sahuquillo, 2002). However, when filamentous cyanobacteria bloomed again in mid spring, *D. magna* failed to grow, in accordance with what has been observed in the hypertrophic Loosdrecht Lakes (DeMott et al., 2001). Filamentous cyanobacteria have been found to inhibit the feeding of daphnids (Sahuquillo et al., 2007; Pannoso and Lüring 2010) and often represent an inadequate food source for several reasons. Cyanobacteria might result toxic, nutritionally poor or difficult to ingest because of mechanical interference (Lampert 1987; Brett and Müller-Navarra 1997; DeMott et al., 2001).

In contrast, the spring bloom of filamentous and colonial cyanobacteria favored the appearance of *B. longirostris*. Small cladocerans often outcompete large ones under conditions of cyanobacteria dominance (Lampert, 1982; Abrantes et al., 2009), being *Bosmina* sp. is less sensitive than daphnids to cyanobacteria filaments (Gliwicz & Lampert, 1990). *B. longirostris* is typically considered an indicator of eutrophy (Alonso, 1996; Haberman and Haldna 2014). Therefore, the observed changes in the zooplankton community may reflect changes in the amount and quality of phytoplankton. Our observations support the idea that cladocerans provide a useful indicator of the trophic status in shallow lakes (Haberman 2007).

Our results revealed different feeding strategies of the dominant cladocerans in the two studied periods. *D. magna* showed no differential clearance rates for phytoplankton and bacteria. On the contrary, *B. longirostris* grazed preferentially on algae (size range 1-15  $\mu\text{m}$ ) than on bacteria (mainly  $< 1 \mu\text{m}$ ). These findings agree with the results from *in vitro* grazing experiments on natural radiolabeled plankton in the shallow hypertrophic Lake Søbygaard (Denmark), which indicated that whereas *B. longirostris* fed mainly on phytoplankton, daphnids cleared equally bacteria and algae (Jeppesen et al., 1996).

The fact that mass-specific CR's were higher for *B. longirostris* than for the larger *D. magna* might be attributed to the higher food concentrations (phytoplankton biomass) observed in May versus March but also to the higher temperatures observed in this month. Differences in swimming mode between both organisms *i.e.*, hop and sink in *Daphnia* vs constant swimming in *Bosmina* might additionally enable higher filtering rates. In addition, the constant swimming behavior might increase the chances of coming across food particles and the second pair of limbs can serve to clutch large cells and place them into the food groove (DeMott 1982), contributing to increase food selectivity.

Our results indicate that only a minor proportion of the standing stock of bacteria and especially of phytoplankton was removed by zooplankton grazing, which is in good agreement with results from other shallow eutrophic lakes (Agasild & Nõges 2005). The low phytoplankton and bacteria biomass losses driven by grazing illustrate the limited ability of the zooplankton to control lower trophic levels in the lagoon and support the idea of reduced *top-down* control in warm-temperate lakes (Jeppesen et al., 2007).

We found that a substantial part of the carbon ingested by *D. magna* (41%) was supplied by bacteria during the end of winter/onset of spring. However, in mid spring, bacteria only provided a minor fraction of the ingested carbon (25%) by the zooplankton community. Our results suggest that during periods in which algal biomass is reduced and *Daphnia* dominates, the trophic coupling between the microbial loop and the classical grazer food web might play an important role in energy transfer (via heterotrophic bacteria grazing) in hypertrophic lakes.

## Acknowledgements

We are grateful to E. Vicente and C. Blanco for their help in the experimental activities and to J.M. Soria, O. Kramer and M.L.Sendra for various data. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the project CGL2009-12229 and grant BES-2010- 481 032212.

## References

- ABRANTES, N., A. NOGUEIRA & F. GONCALVES. 2009. Short-term dynamics of cladocerans in a eutrophic shallow lake during a shift in the phytoplankton dominance. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology*, 45: 237-245.
- AGASILD, H. & T. NÖGES. 2005. Cladoceran and rotifer grazing on bacteria and phytoplankton in two shallow eutrophic lakes: in situ measurement with fluorescent microspheres. *Journal of Plankton Research*, 27 (11): 1155-1174.
- ALONSO, M., 1996. *Fauna Ibérica. Vol. 7. Crustacea. Branquiopoda*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. Spain.
- ANDERSEN, T. & D.O. HESSEN. 1991. Carbon, nitrogen, and phosphorus content of freshwater zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 36 (4): 807-814.
- BLANCO, C. 1974. *Estudio de la contaminación de la Albufera de Valencia y de los efectos de dicha contaminación sobre la fauna y flora del lago*. Ph.D. Thesis. University of Valencia, Spain.
- BOGDAN, K. G., J. J. GILBERT & P. L. STARKWEATHER. 1980. In situ clearance rates of planktonic rotifers. *Rotatoria. Developments in Hydrobiology*, 1: 73-77.
- BOTTRELL, H. C. 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norwegian Journal of Zoology*, 24: 419-456.

- BRETT, M. & D. MÜLLER-NAVARRA. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology* 38 (3): 483-499.
- DEMOTT, W. R. 1982. Feeding selectivities and relative ingestion rates of *Daphnia* and *Bosmina*. *Limnology and Oceanography*, 27 (3): 518-527.
- DEMOTT, W. R. 1986. The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. *Oecologia*, 69(3): 334-340.
- DEMOTT, W. R., R. D. GULATI & E. VAN DONK. 2001. *Daphnia* food limitation in three hypereutrophic Dutch lakes: evidence for exclusion of large-bodied species by interfering filaments of cyanobacteria. *Limnology and Oceanography*, 46 (8): 2054-2060.
- DEMOTT, W. R. & W. C. KERFOOT. 1982. Competition among cladocerans: nature of the interaction between *Bosmina* and *Daphnia*. *Ecology*, 63 (6): 1949-1966.
- DUMONT, H. J., I. VAN DE VELDE & S. DUMONT. 1975. The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia*, 19 (1): 75-97.
- FERMANI, P., N. DIOVISALVI, A. TORREMORELL, L. LAGOMARSINO, H. E. ZAGARESE & F. UNREIN. 2013. The microbial food web structure of a hypertrophic warm-temperate shallow lake, as affected by contrasting zooplankton assemblages. *Hydrobiologia*, 714 (1): 115-130.
- GLIWICZ, Z. M. & W. LAMPERT. 1990. Food thresholds in *Daphnia* species in the absence and presence of blue-green filaments. *Ecology*, 71 (2): 691-702.
- GULATI, R. 1978. Vertical changes in the filtering, feeding and assimilation rates of dominant zooplankters in a stratified lake. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 20: 950-956.
- HABERMAN, J. & M. HALDNA. 2014. Indices of zooplankton community as valuable tools in assessing the trophic state and water quality of eutrophic lakes: long term study of Lake Vörtsjärv. *Journal of Limnology*, 73 (2): 263-273.



- HABERMAN, J., R. LAUGASTE & T. NÖGES. 2007. The role of cladocerans reflecting the trophic status of two large and shallow Estonian lakes. *Hydrobiologia*, 584: 157-166.
- HAVENS, K. E., J. R. BEAVER & T. L. EAST. 2007. Plankton biomass partitioning in a eutrophic subtropical lake: comparison with results from temperate lake ecosystems. *Journal of Plankton Research*, 29 (12): 1087-1097.
- HE, X. & W. X. WANG. 2006. Releases of ingested phytoplankton carbon by *Daphnia magna*. *Freshwater Biology*, 51 (4): 649-665.
- HILLEBRAND, H., C. D. DURSELEN, D. KIRSCHTEL, U. POLLINGHER & T. ZOHARY. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35 (2): 403-424.
- JEPPESEN, E., M. SØNDERGAARD, J. P. JENSEN, E. MORTENSEN & O. SORTKJÆR. 1996. Fish-induced changes in zooplankton grazing on phytoplankton and bacterioplankton: a long-term study in shallow hypertrophic Lake Søbygaard. *Journal of Plankton Research*, 18 (9): 1605-1625.
- JEPPESEN, E., M. MEERHOFF, B. JACOBSEN, R. HANSEN, M. SØNDERGAARD, J. JENSEN, T. LAURIDSEN, N. MAZZEO & C. BRANC. 2007. Restoration of shallow lakes by nutrient control and biomanipulation – the successful strategy varies with lake size and climate. *Hydrobiologia* 581, 269-285.
- KAMJUNKE, N., A. BENNDORF, C. WILBERT, M. OPITZ, J. KRANICH, M. BOLLENBACH & J. BENNDORF. 1999. Bacteria ingestion by *Daphnia galeata* in a biomanipulated reservoir: a mechanism stabilizing biomanipulation? *Hydrobiologia*, 403: 109-121.
- LAIR, N. 1991. Grazing and assimilation rates of natural populations of planktonic cladocerans in a eutrophic lake. *Hydrobiologia*, 215: 51-61.

- LAMPERT, W. 1982. Further studies on the inhibitory effect of the toxic blue-green *Microcystis aeruginosa* on the filtering rate of zooplankton. *Archiv für Hydrobiologie*, 95: 207-220.
- LAMPERT, W. 1987. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21 (3): 483-490.
- LATJA, R., AND K. SALONEN. 1978. Carbon analysis for the determination of individual biomasses of planktonic animals. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 20: 2556-2560.
- MIRACLE, M. R. & M. SAHUQUILLO. 2002. Changes of life-history traits and size in *Daphnia magna* during a clear-water phase in a hypertrophic lagoon (Albufera of Valencia, Spain). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 28: 1203-1208.
- MIRACLE, M. R., E. VICENTE, S. SARMA & S. NANDINI. 2014. Planktonic rotifer feeding in hypertrophic conditions. *International Review of Hydrobiology*, 99: 141-150.
- OLTRA, R. & M. MIRACLE. 1992. Seasonal succession of zooplankton populations in the hypertrophic lagoon Albufera of Valencia (Spain). *Archiv Fur Hydrobiologie*, 124 (2): 187-204.
- ONANDIA, G., M. R. MIRACLE & E. VICENTE. 2014a. Primary production under hypertrophic conditions and its relationship with bacterial production. *Aquatic Ecology*, 48: 447-463.
- ONANDIA, G., M. ROSA MIRACLE, C. BLASCO & E. VICENTE. 2014b. Diel and seasonal variations in bacterioplankton production in a hypertrophic shallow lagoon. *Aquatic Microbial Ecology*, 72: 255-267.
- OOMS-WILMS, A., G. POSTEMA & R. GULATI. 1995. Evaluation of bacterivory of Rotifera based on measurements of in situ ingestion of fluorescent particles, including some comparisons with Cladocera. *Journal of Plankton Research*, 17 (5): 1057-1077.

- OOMS-WILMS, A. L. 1997. Are bacteria an important food source for rotifers in eutrophic lakes? *Journal of Plankton Research*, 19 (8): 1125-1141.
- PANOSSO, R. & M. LÜRLING. 2010. *Daphnia magna* feeding on *Cylindrospermopsis raciborskii*: the role of food composition, filament length and body size. *Journal of Plankton Research*, 32 (10): 1393-1404.
- PETERSON, B. J., J. E. HOBBIE & J. F. HANEY. 1978. *Daphnia* grazing on natural bacteria. *Limnology and Oceanography*, 23 (5): 1039-1044.
- PORTER, K. G. & Y. S. FEIG. 1980. The use of Dapi for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25 (5): 943-948.
- REYNOLDS, C. S. 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press Cambridge. NY. USA.
- ROMO, S., A. GARCÍA-MURCIA, M. J. VILLENA, V. SÁNCHEZ & A. BALLESTER. 2008. Tendencias del fitoplancton en el lago de la Albufera de Valencia e implicaciones para su ecología, gestión y recuperación. *Limnetica* 27 (1): 11-28.
- ROMO, S. & M.J. VILLENA, M. SAHUQUILLO, J.M SORIA, M. GIMÉNEZ, T. ALFONSO, E. VICENTE & M.R. MIRACLE. 2005. Response of a shallow Mediterranean lake to nutrient diversion: does it follow similar patterns as in northern shallow lakes? *Freshwater Biology*, 50: 1706-1717.
- SAHUQUILLO, M., M. MELÃO & M. MIRACLE. 2007. Low filtering rates of *Daphnia magna* in a hypertrophic lake: laboratory and in situ experiments using synthetic microspheres. *Hydrobiologia*, 594: 141-152.
- SCHOENBERG, S. A. 1989. Effects of algal concentration, bacterial size and water chemistry on the ingestion of natural bacteria by cladocerans. *Journal of Plankton Research*, 11 (6): 1273-1295.
- SHOAF, T. W., AND B. W. LIUM. 1976. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethylsulphoxide. *Limnology and Oceanography*, 21 (6): 926-928.

- SIMON, M. & F. AZAM. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 51: 201-213.
- SOMMARUGA, R. 1995. Microbial and classical food webs: A visit to a hypertrophic lake. *Fems Microbiology Ecology*, 17: 257-270.
- STARKWEATHER, P. L. & K.G. BOGDAN. 1980. Detrital feeding in natural zooplankton communities: discrimination between live and dead algal foods. *Hydrobiologia*, 73 (1-3): 83-85.
- TELESH, I. V., M. RAHKOLA & M. VILJANEN. 1998. Carbon content of some freshwater rotifers. *Hydrobiologia*, 387: 355-360.
- TÓTH, L. G. & K. KATO. 1997. Size-selective grazing of bacteria by *Bosmina longirostris*—an image-analysis study. *Journal of Plankton Research*, 19 (10): 1477-1493.
- VICENTE, E. & M. MIRACLE. 1992. The coastal lagoon Albufera de Valencia: An ecosystem under stress. *Limnetica*, 8: 87-100.
- WEISSE, T. & A. FRAHM. 2002. Direct and indirect impact of two common rotifer species (*Keratella* spp.) on two abundant ciliate species (*Urotricha furcata*, *Balanion planctonicum*). *Freshwater Biology*, 47 (1): 53-64.
- WETZEL, R. 2001. *Limnology: Lake and River Ecosystems* (3<sup>rd</sup> ed.). Academic Press, San Diego, CA, USA.
- WORK, K. A. & K. E. HAVENS. 2003. Zooplankton grazing on bacteria and cyanobacteria in a eutrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 25 (10): 1301-1306.

## **Parte II**

### **Modelización biogeoquímica de la Albufera de Valencia**



## **Capítulo IV**

**Hacia el desarrollo de un modelo biogeoquímico para abordar los problemas de eutrofización en el lago somero hipertrófico de la Albufera de Valencia, España.**





**Capítulo IV.** Onandia, G., Gudimov, A., Miracle, M.R., Ahrenditsis, G. 2015. Towards the development of a biogeochemical model for addressing the eutrophication problems in the shallow hypertrophic lagoon of Albufera de Valencia, Spain. *Ecological Informatics*, in press, DOI: 10.1016/j.ecoinf.2015.01.004.



# **Parte III**

## **Síntesis de resultados y discusión general**



## **Capítulo V**

### **Resumen global**



## Lugar de estudio

Los diferentes trabajos que integran esta tesis se han desarrollado en la Albufera de Valencia, y en su conjunto, están dirigidos a mejorar el conocimiento sobre distintos aspectos del funcionamiento ecológico de este lago. La Albufera de Valencia es un lago somero, con una profundidad media de aproximadamente 1 m. Situado a  $\approx 15$  km al sur de la ciudad de Valencia, es un sistema costero, separado del mar por una barra de arena de entre 500 y 1000 m de ancho (Vicente & Miracle, 1992). El lago presenta una superficie de  $\approx 23,2$  km<sup>2</sup> y está rodeado por un área unas diez veces más extensa (223 km<sup>2</sup>), que anteriormente fue parte de él y en la actualidad está dedicada al cultivo del arroz (Vicente & Miracle, 1992). Esta área está atravesada por barrancos naturales y acequias destinadas al riego que desembocan en el lago. El lago, junto a los arrozales circundantes y la barra de arena, que acoge dos dunas paralelas cubiertas por vegetación mediterránea, integran el “Parque Natural de la Albufera de Valencia”, declarado como tal en 1986. Este Parque fue incluido en la lista Ramsar de humedales de importancia internacional en 1990 y posteriormente clasificado como Zona de Especial Protección para las Aves (ZEPA).

Además de los cauces de entrada mencionados, el lago cuenta con tres canales o “golas” que lo comunican con el mar y cuyo flujo está regulado por una serie de compuertas. La manipulación de estas compuertas, asociada a las necesidades hídricas del cultivo del arroz, afecta de manera significativa el nivel de agua del lago y por tanto, el ciclo hidrológico anual del mismo, como ya se ha comentado en la sección introductoria. A principios de invierno, se cierran las compuertas y los campos que rodean al lago y que en esta estación no se cultivan, se inundan. Actualmente se ha reducido mucho la extensión de los arrozales inundados en invierno, anegándose básicamente aquellos campos situados por debajo del nivel de agua máximo del lago. La inundación se realiza hasta el nivel denominado “la perellonà”, que indica que el nivel que alcanza el agua contenida en los campos es equivalente al nivel de agua del lago. Además, también se anegan ciertos campos que se utilizan como cotos de caza.

Durante el mes de enero, el agua contenida en los campos inundados se vacía, drenándose principalmente hacia el lago. En este punto, las compuertas de las golias se abren permitiendo la salida de agua al mar y provocando un notable aumento de flujo de agua a través del sistema. Posteriormente, en primavera, los campos desecados se preparan para la siembra del arroz, que tendrá lugar en mayo tras una nueva inundación de los campos, pero en este caso, hasta un nivel de aproximadamente 20-30 cm, necesario para permitir el crecimiento del arroz. Los campos permanecen inundados de este modo durante toda la estación de crecimiento (de mayo a mediados de septiembre). Durante este periodo, las compuertas suelen permitir una salida mínima de agua y en consecuencia, las tasas de renovación del lago son muy bajas (Romo *et al.*, 2005). A finales de verano los arrozales se vacían, provocando un segundo periodo de elevado flujo a través del lago, aunque de menor magnitud que en invierno, y a continuación tiene lugar la cosecha. Finalmente, el uno de noviembre, los campos vuelven a inundarse y comienza un nuevo ciclo de cultivo.

## **Metodología general y diseño experimental**

En la primera parte de la tesis, se aborda el estudio de la producción primaria fitoplanctónica, la producción bacteriana y las características filtradoras de la comunidad zooplanctónica mediante la utilización de marcadores radioactivos. Los marcadores radioactivos son compuestos químicos en los que uno o más átomos han sido substituidos por un isótopo radioactivo. La desintegración de este radioisótopo permite detectar y cuantificar el compuesto químico que lo contiene. Para ello, suele utilizarse un contador de centelleo. Este instrumento es capaz de generar destellos en respuesta a las desintegraciones y convertir, a continuación, estos destellos en una señal susceptible de ser medida. Los marcadores radioactivos utilizados para la cuantificación de procesos biológicos son substratos típicamente incorporados por los



organismos. Así, en este trabajo, la producción primaria se estimó a partir de la incorporación de bicarbonato sódico marcado con carbono-14 por parte del fitoplancton en el proceso fotosintético (Steeman-Nielsen, 1952). De la misma manera, las estimas de producción bacteriana se realizaron a través de la incorporación de leucina y timidina tritiadas, substratos necesarios para la síntesis de proteínas y DNA respectivamente (Fuhrman & Azam, 1982; Kirchman *et al.*, 1985; Smith & Azam, 1992). En el caso de la caracterización de los procesos implicados en la alimentación de zooplancton (filtración y asimilación), se emplearon soluciones algales y bacterianas marcadas respectivamente a través de la incorporación de bicarbonato sódico marcado con carbono-14 y de timidina tritiada debido a que la alimentación de zooplancton se basa en gran medida en la ingesta de estos dos grupos de microorganismos. Las estimas de producción primaria y bacteriana se realizaron de manera paralela en dos series de experimentos *in situ*. La primera serie incluyó cuatro experimentos distribuidos en verano e invierno, que a su vez constaron de dos medidas (realizadas a mediodía y por la tarde). Además, cada medida se realizó a distintas profundidades, y en el caso de la producción bacteriana, en condiciones de luz y oscuridad. La segunda serie de experimentos, también llevados a cabo *in situ*, comprendió estimas realizadas a una única profundidad en condiciones de iluminación natural a lo largo de dos ciclos diarios en primavera. Los experimentos destinados a explorar las características filtradoras de las especies zooplanctónica presentes de manera natural en el lago se llevaron a cabo a finales de invierno/principios de primavera y mediados de primavera en el laboratorio, pero en condiciones análogas a las naturales. Las fechas concretas en las que se realizaron estos experimentos y las condiciones físico-químicas del lago en estas fechas se detallan en las Tablas 5.1 y 5.2, respectivamente.

	2011				2012			
	Profundidad (m)	Febrero	Agosto	Periodicidad	Enero	Febrero	Abril	Mayo
		Periodicidad	Periodicidad					
<b>Producción primaria</b>	0.2	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	4 h*	4 h*
	0.6	-	-	-	-	-	4 h*	4 h*
	0.8	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	-	-
	1.1	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	-	-
<b>Producción bacteriana</b>	0.2	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	4 h	4 h
	0.6/0.8	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	4 h	4 h
	1.1	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	-	-
	0.2	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	-	-
<b>Alimentación zooplancton</b>	0.8	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	-	-
	1.1	M/T	M/T	M/T	M/T	M/T	-	-
	-	x	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>INCUBACIÓN</b>								
	Luz							
	Oscuridad							
	<i>Daphnia magna</i>							
	<i>Bosmina longirostris</i>							x
	<i>Keratella cochlearis</i>							x
	<i>Zooplankton 50-100 µm</i>							x

x: experimento realizado el 29/03/2011

**Tabla 5.1.** Fechas en las que se llevaron a cabo los experimentos de producción primaria, producción bacteriana y alimentación de zooplancton. M/T: mañana/tarde; \* Sólo durante las horas de luz.

	2011				2012			
	Febrero	Marzo	Agosto	Enero	Febrero	Abril	Mayo	
	Media ± SD	Dato único	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	
T (°C)	14.7 ± 0.22	16.2	28.3 ± 0.73	11.5 ± 0.44	10.8 ± 0.86	19.26 ± 0.97	21.2 ± 1	
Secchi (m)	0.50 ± 0.02	0.4	0.35 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.55 ± 0.05	0.23 ± 0.03	0.25	
K <sub>d</sub>	3.64 ± 0.26	4.7	3.73 ± 0.18	3.96 ± 0.26	2.53 ± 0.07	8.4 ± 1	7.1 ± 0.64	
Cond (µS cm <sup>-1</sup> )	1643 ± 1.6	1426	1894 ± 14.2	1632 ± 4.4	2015 ± 5.4	1774 ± 60	1656 ± 10	
O <sub>2</sub> % <sub>max</sub>	145	141	141	152	137	197.0	181.0	
pH <sub>max</sub>	8.65	8.9	8.98	8.8	8.78	9.48	10.05	
Alk (mg L <sup>-1</sup> )	36.7 ± 3.1	24.4	16.1 ± 0.7	34.7 ± 0.6	44.0 ± 0.7	14.8 ± 1.4	12.6 ± 1.1	
TIC (mg L <sup>-1</sup> )	34 ± 1	26.5	17 ± 1	32 ± 0.2	40 ± 0.7	13 ± 1	11 ± 2	
NO <sub>3</sub> -N (µg L <sup>-1</sup> )	1957 ± 81.8	1895	1.62*	940 ± 7.8	3066*	1029.6 ± 195	378.6 ± 157	
NO <sub>2</sub> -N (µg L <sup>-1</sup> )	114.3 ± 2.3	6.8	1.1*	35.7 ± 2.6	125*	56.6 ± 4.1	30.4 ± 16	
NH <sub>4</sub> -N (µg L <sup>-1</sup> )	41.1 ± 15	21.7	5.89*	40.3 ± 5	41.6*	39.5 ± 17	140.8 ± 53	
TN-N (µg L <sup>-1</sup> )	4049 ± 353	4.7	3213*	3364 ± 29	5476*	5275 ± 211	4869 ± 329	
SRP (µg L <sup>-1</sup> )	0.83 ± 0.8	3.7	3.87*	2.85 ± 1.7	2.16*	3.7 ± 1	16.5 ± 7.7	
TP-P (µg L <sup>-1</sup> )	136 ± 21	174	106*	122 ± 4	130*	348 ± 29	272 ± 15	
DOC (mg L <sup>-1</sup> )	7.7 ± 0.2	7.4	12.1 ± 0.6	7.7 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7 ± 0.1	8 ± 0.3	
TOC (mg L <sup>-1</sup> )	13.5 ± 1.2	11.2	17.9 ± 1.3	12.8 ± 0.7	13.0 ± 0.8	14.4 ± 0.9	14.7 ± 0.7	
LOI (mg L <sup>-1</sup> )	25.2 ± 3	33	54.7 ± 5.5	30 ± 0.8	20.7 ± 0.8	61 ± 2.6	62 ± 3.2	
Chlor-a (µg L <sup>-1</sup> )	102 ± 9	177	113 ± 10	121 ± 4	64 ± 1	315 ± 17	301 ± 5	
SS (mg L <sup>-1</sup> )	42 ± 8	50	69*	43 ± 4	26 ± 3	76 ± 13	100 ± 8	
WT (FAU)	32 ± 7	46	65*	45 ± 2	27 ± 4	86 ± 13	82 ± 4	

\* esta valor corresponde a una medida única.

**Tabla 5.2.** Media y desviación estándar de parámetros fisico-químicos y biológicos durante los experimentos. max.: máximo valor registrado durante el mes de muestreo; K<sub>d</sub>: coeficiente de extinción; Alk: alcalinidad; TIC: carbono inorgánico total ;TN: nitrógeno total; TP: fósforo total; SRP: fósforo reactivo soluble; DOC: carbono orgánico disuelto; TOC: carbono orgánico total; LOI: pérdida por ignición; SS: sólidos en suspensión, WT: turbidez del agua.



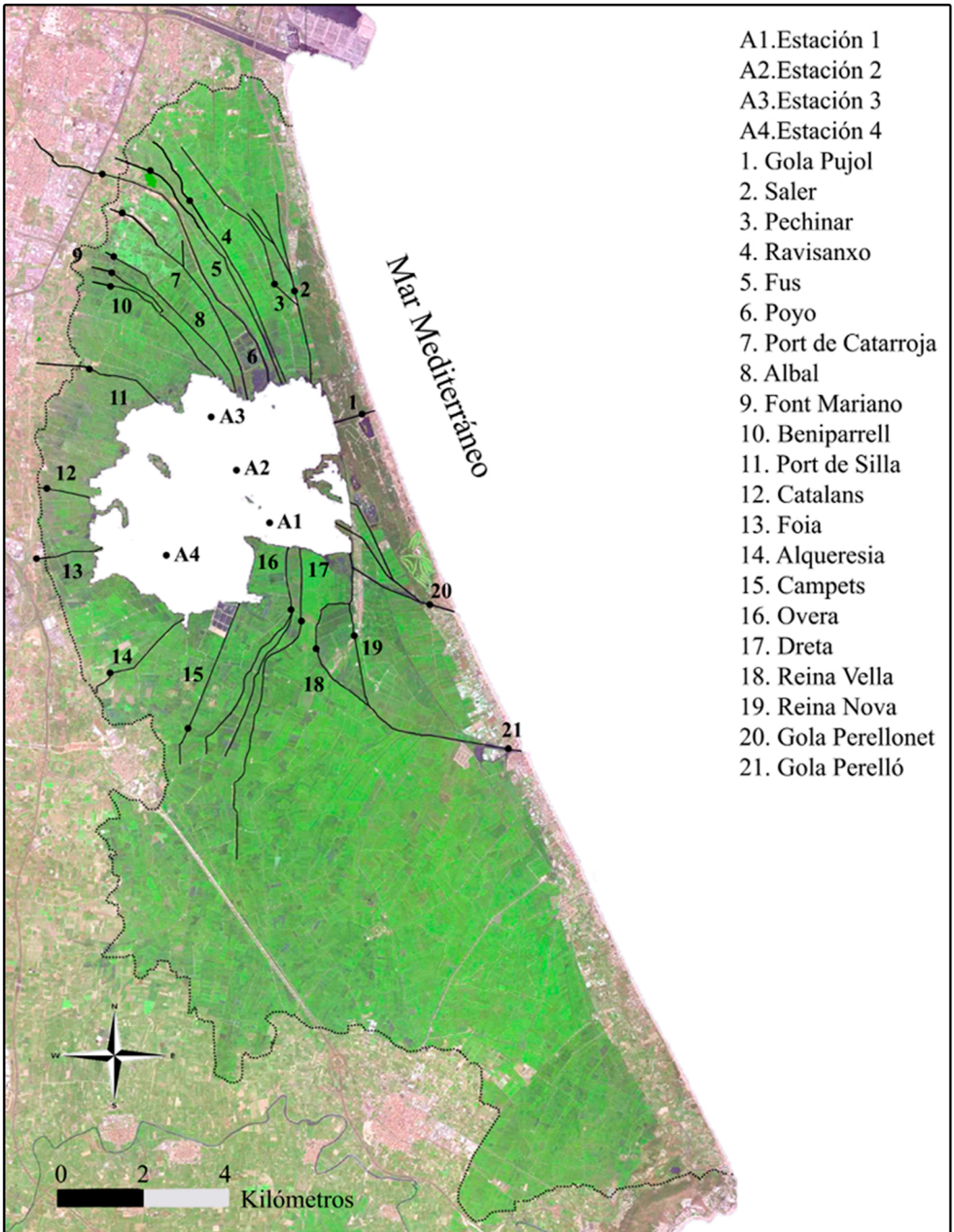
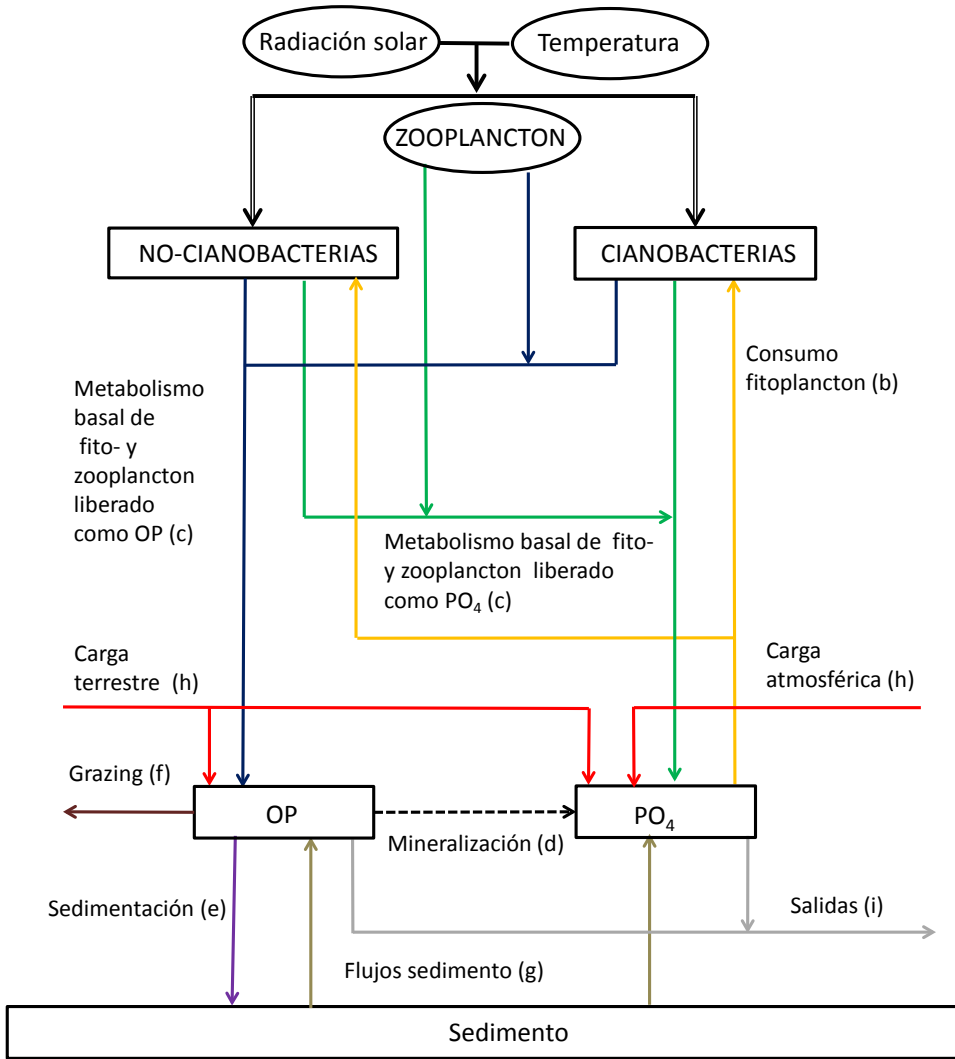


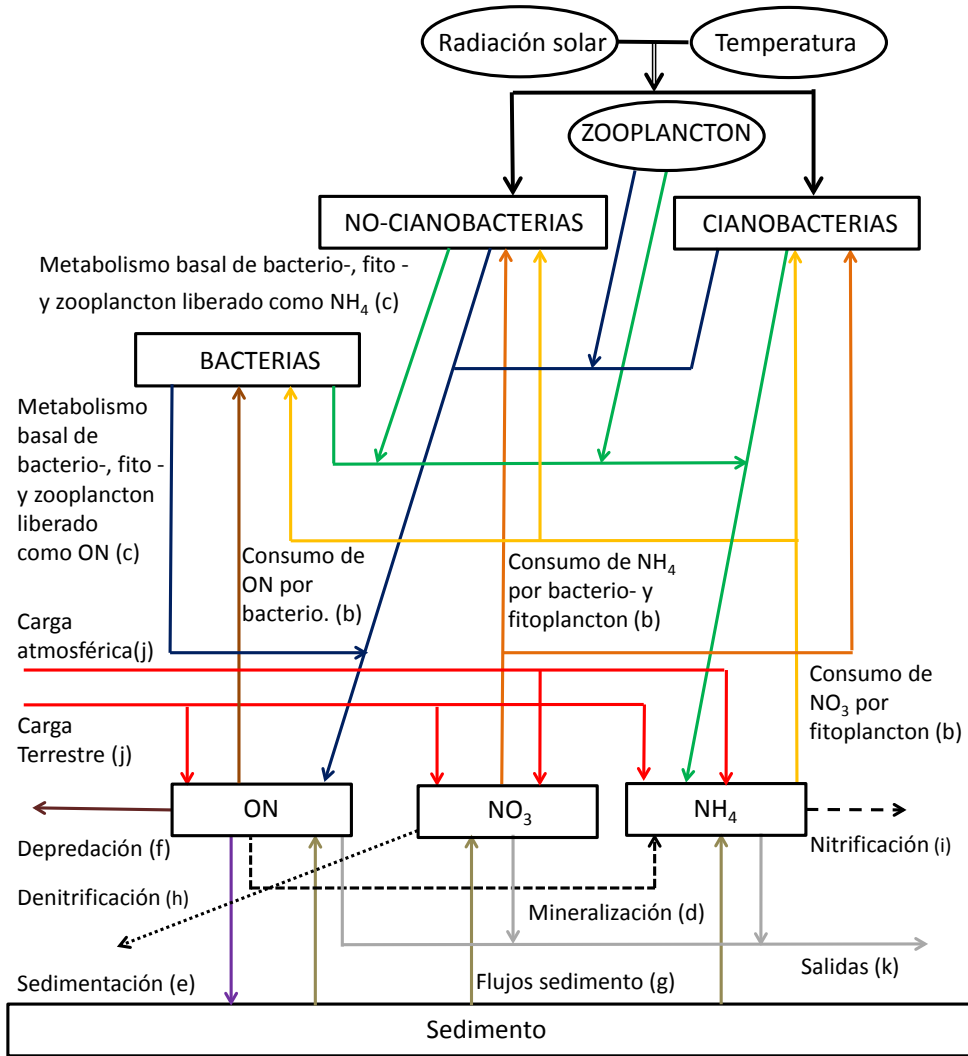
Fig. 5.1. Mapa de la Albufera de Valencia, indicando las estaciones de muestreo dentro del lago y en los arrozales circundantes. La línea discontinua representa el límite del “Parque Natural de la Albufera de Valencia”.

El presente modelo está parcialmente basado en el modelo de eutrofización desarrollado para el lago Washington por Arhonditsis & Brett (2005a,b). Dada la escasa profundidad de la Albufera de Valencia y la ausencia de estratificación vertical, el modelo conceptual del lago consiste en un único compartimento espacial que representa i) dos ciclos de nutrientes: nitrógeno y fósforo, ii) dos grupos de fitoplancton: cianobacterias y no-cianobacterias y iii) bacterias heterótrofas. En concreto, el modelo considera las interacciones entre las siguientes variables de estado: nitrato, amonio, nitrógeno orgánico, fosfato, fósforo orgánico, detritus, bacterias heterótrofas, cianobacterias y no-cianobacterias (Fig 5.2).

Las funciones externas de control o de forzamiento (*forcing functions* en su acepción inglesa) incluyen: zooplancton, temperatura del agua, radiación solar, oxígeno disuelto, coeficiente de extinción, duración del día, precipitación, evaporación, viento, deposición atmosférica, entradas y salidas de agua al lago y la consiguiente carga asociada de nutrientes. Cabe mencionar que en el caso del zooplancton, los datos disponibles no fueron suficientes para caracterizar adecuadamente los dos grupos funcionales existentes. Estos dos grupos corresponden a i) una comunidad dominada por cladóceros, observada durante el evento de aguas claras de 2010, y a ii) una comunidad fundamentalmente dominada por copépodos, rotíferos y pequeños cladóceros, observada durante la mayor parte del periodo estudiado. El hecho de que en 2011 no se produjera un evento de aguas claras hizo imposible comprobar la solidez de los resultados referentes al grupo funcional de los cladóceros. En base a esta limitación, decidimos representar el papel del zooplancton en el ecosistema como una función de forzamiento externa y no como una variable de estado.



**Fig. 5.3.** Modelo conceptual del ciclo del fósforo: (a) funciones externas de forzamiento para el crecimiento de fitoplancton (temperatura, radiación solar); (b) consumo por parte del y fitoplancton; (c) metabolismo basal de fito- y zooplancton liberado en forma de PO<sub>4</sub> y O<sub>2</sub>; (d) mineralización de OP; (e) sedimentación de partículas; (f) depredación de detritus; (g) flujos de PO<sub>4</sub> y OP desde el sedimento por difusión, resuspensión del viento y bioturbación; (h) aportes externos de PO<sub>4</sub> y OP; (i) salidas de PO<sub>4</sub> y OP.



**Fig. 5.2.** Modelo conceptual del ciclo del nitrógeno: (a) funciones externas de forzamiento para el crecimiento de fitoplancton (temperatura, radiación solar); (b) consumo por parte del bacterio- y fitoplancton; (c) metabolismo basal de bacterio-, fito- y zooplancton liberado en forma de  $\text{NH}_4$  y  $\text{ON}$ ; (d) mineralización de  $\text{ON}$ ; (e) sedimentación de partículas; (f) depredación de detritus; (g) flujos de  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$  y  $\text{ON}$  desde el sedimento por difusión, resuspensión del viento y bioturbación; (h) aportes externos de  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{ON}$ ; (i) salidas de  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{ON}$ .



En cambio, la información disponible sobre fitoplancton y bacterias permitió incluir estos componentes biológicos como variables de estado y validar la capacidad predictiva del modelo en base a los datos recogidos en 2011. Atendiendo a los patrones estacionales observados para la comunidad de fitoplancton, optamos por la representación de los dos grupos de fitoplancton ya mencionados: cianobacterias y no-cianobacterias. Las cianobacterias están definidas como “estrategas de la k”, con tasas de crecimiento y mortalidad bajas, una constante media de saturación baja para el nitrógeno y elevada para el fósforo y una alta tolerancia a la baja disponibilidad de luz. Este grupo se caracteriza por presentar una temperatura de referencia alta, una velocidad de sedimentación baja y escasa palatabilidad para el zooplancton. El segundo grupo de fitoplancton, las no-cianobacterias, se diferencia del primero tanto en la competencia por los recursos (nitrógeno y fósforo), como en las tasas metabólicas, la morfología y su palatabilidad para el zooplancton (Tabla 5.4). En concreto, las no-cianobacterias están representadas como “estrategas de la r”, con altas tasas de crecimiento y mortalidad, una constante media de saturación baja para el fósforo pero alta para el nitrógeno, baja temperatura de referencia, alta tasa de sedimentación y gran palatabilidad para el zooplancton.

**Tabla 5.4.** Parámetros relacionados con la caracterización de los dos grupos de fitoplancton modelados.

	Cianobacterias	No-cianobacterias
<b>Palatabilidad para el zooplancton</b>	0.25	0.5
<b>Tasa de crecimiento</b>	0.9	1.5
<b>Tasa de mortalidad</b>	0.009	0.01
<b>Tasa de sedimentación</b>	0.03	0.05
<b>Tª referencia</b>	25	16.5
<b>N máximo interno</b>	0.4	0.1
<b>N mínimo interno</b>	0.3	0.005
<b>P máximo interno</b>	0.004	0.019
<b>P mínimo interno</b>	0.001	0.001
<b>Cte media saturación P</b>	18	13
<b>Cte media saturación N</b>	125	150

Cte: constante

La ecuación que representa la dinámica de la biomasa de fitoplancton contempla la producción de biomasa derivada del crecimiento y las pérdidas de biomasa asociadas a los procesos de mortalidad, sedimentación, depredación por zooplancton y exportación al mar:

$$\frac{dFITO_{i,x}}{dt} = \text{crecimiento}_{i,x} \times FITO_{i,x} - mp_i \times e^{kt(T_x - Temp_{ref})} \times FITO_{i,x} \\ - V_{\text{sedimentación}_i} \times FITO_{i,x} / z_x \\ - \text{Depredación}_{i,x} \times f_{\text{temperatura}_x} \times ZOOP_x - \text{salidas} \times FITO_{i,x}$$

donde  $i$  = grupo funcional de fitoplancton (cianobacterias, no-cianobacterias);  $x$  = capa vertical,  $x = 1$ .

El término correspondiente al crecimiento considera la influencia de la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes mediante un modelo multiplicativo (Cerco & Cole, 1994):

$$\text{Crecimiento}_{i,x} = ct_{\text{max}_i} \times f_{\text{nutrientes}_{i,x}} \times f_{\text{luz}_{i,x}} \times f_{\text{temperatura}_{i,x}}$$

donde  $i$  = grupo funcional de fitoplancton (cianobacterias, no-cianobacterias);  $x$  = capa vertical,  $x = 1$ ;  $ct_{\text{max}_i}$  = tasa de crecimiento máximo de fitoplancton.

También es importante destacar que la incorporación de fósforo y nitrógeno por parte del fitoplancton se simula teniendo en consideración “luxury uptake” *i.e.* la incorporación de nutrientes depende tanto de las concentraciones tanto intra- como extracelulares y está restringida por unos límites internos superiores e inferiores de capacidad de almacenamiento.

El otro componente biológico representado por una variable de estado, las bacterias heterótrofas, fueron modeladas como un único grupo funcional. La ecuación correspondiente al bacterioplancton incluye tanto el crecimiento, como las pérdidas derivadas de la depredación por zooplancton, mortalidad y exporte al mar. Con respecto al crecimiento bacteriano, éste se ha representado siguiendo una aproximación similar a la propuesta por Fasham *et al.* (1990) y depende de la disponibilidad de nitrógeno orgánico disuelto y amonio.

$$\frac{dBACT_{i,x}}{dt} = \text{incorporación}_{bact} \times BACT - mb \times \sigma_t \times BACT^{1.65}$$

donde  $mb$  =tasa de mortalidad bacteriana;  $\sigma_t = ((1 - \varepsilon \times \cos (2 \pi / 365)) / (1 + \varepsilon))$ .

## Resultados

### Producción por parte de las bacterias heterótrofas en condiciones hipertróficas

La producción bacteriana (PB), estimada mediante las tasas incorporación de leucina y timidina (LIR y TIR), mostró un patrón diario caracterizado por un incremento a lo largo de la noche y un notable descenso al amanecer. El carbono orgánico disuelto (DOC) presentó el patrón opuesto a escala diaria, estando negativamente correlacionado con LIR y TIR (Fig.5.4). El ratio LIR:TIR no experimentó grandes variaciones a lo largo del día. Sin embargo, se observó una pauta definida por un aumento al atardecer y valores más elevados durante la noche, y una correlación positiva entre el ratio LIR:TIR y el DOC.

A escala estacional, no se dieron grandes variaciones en la PB, que osciló entre 186 y 390 mg C m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. No obstante, es importante mencionar que se produjo una disminución en el periodo invernal coincidiendo con un marcado descenso de la biomasa fitoplanctónica (que se tradujo en un aumento de la transparencia del agua). Posteriormente, en primavera, la PB aumentó a la vez que se alcanzó el máximo de clorofila-*a* (acompañado por un aumento en la turbidez del agua). El ratio LIR:TIR también experimentó ciertas fluctuaciones, mostrando valores más altos en verano. Además, encontramos una correlación positiva entre el ratio LIR:TIR estimado en condiciones luz (entendidas como condiciones de exposición a la radiación fotosintéticamente activa o PAR) y el DOC.

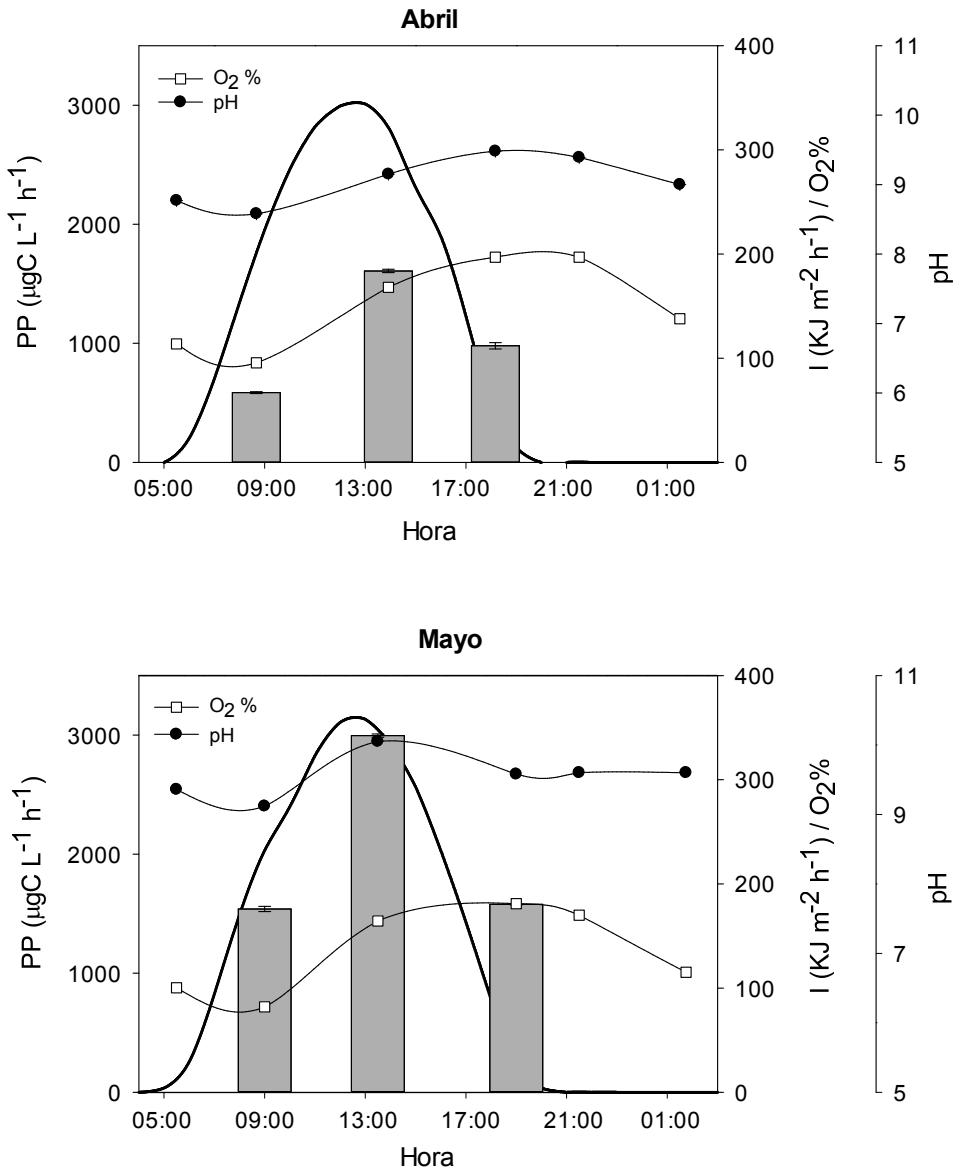
En lo referente a aspectos de tipo metodológico, los valores de PB obtenidos en condiciones de luz y oscuridad fueron muy similares, aunque los primeros tendieron a ser ligeramente superiores. Es destacable que se observó una correlación positiva entre el ratio luz:oscuridad de LIR y las concentraciones de amonio y por otra parte, una correlación negativa entre el ratio luz:oscuridad de TIR y el DOC.

## **Producción primaria fitoplanctónica en condiciones hipertróficas y su relación con la producción bacteriana**

La producción primaria fitoplanctónica (PP) mostró variaciones diarias muy marcadas y definidas por la magnitud de la radiación solar, alcanzando el máximo a mediodía en todas las fechas experimentales. Esto se tradujo en grandes variaciones en la saturación de oxígeno y el pH de la columna de agua (Fig. 5.5).

Las variaciones de PP en profundidad fueron proporcionales a la disponibilidad de luz en la columna de agua, siendo máxima cerca de la superficie (0,2 m) y decreciendo hacia el fondo del lago. No obstante, en una fecha experimental en la que aumentó marcadamente la transparencia del agua durante el invierno, el máximo se alcanzó a la profundidad de 0,8 m como consecuencia de la fotoinhibición.

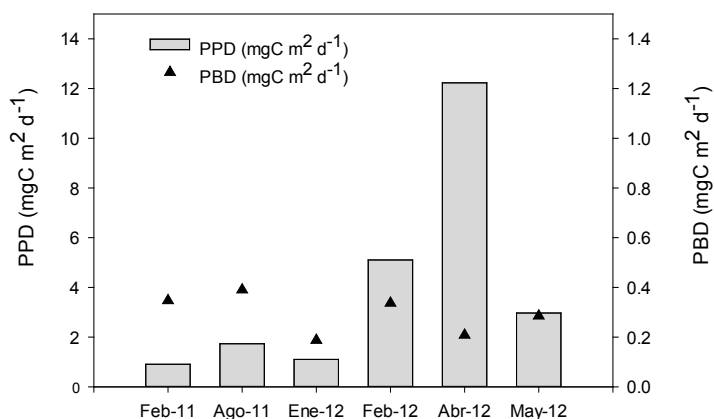
Al igual que a escala diaria, la PP experimentó grandes variaciones estacionales, mostrando valores mínimos en invierno, moderados en verano y máximos en primavera. A su vez, la PP específica ( $\mu\text{g C L}^{-1}$ ;  $\mu\text{g Chl-}a \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), mostró una dinámica estacional análoga. Los periodos estudiados mostraron características físico-químicas y biológicas muy dispares. El flujo de agua circulante a través del lago se incrementó considerablemente en invierno con respecto a primavera y verano. Estos cambios de flujo favorecieron cambios en los valores de biomasa (y por tanto en los niveles de turbidez del agua) y la composición de la comunidad fitoplanctónica. En invierno, diatomeas, clorófitas y criptófitas representaron una importante contribución a la biomasa, que presentó valores mínimos. En primavera, la biomasa aumentó considerablemente, siendo las diatomeas el grupo más relevante. En verano, diatomeas, clorófitas y criptófitas estuvieron prácticamente ausentes y las cianobacterias, especialmente de tipo filamentoso, dominaron la comunidad fitoplanctónica. En esta estación la cianobacteria fijadora de nitrógeno *Cylindrospermopsis raciborskii* supuso una contribución especialmente importante a la biomasa, que alcanzó los valores máximos. También en verano, se registró un



**Fig. 5.5.** Variaciones diarias de la producción primaria (PP) a 0.2 m a lo largo de dos ciclos diarios. Las barras representan la media de dos medidas de PP y las barras de error el rango de variación entre ellas. También se muestran los cambios diarios en la saturación de oxígeno (O<sub>2</sub> %) y pH, así como la radiación solar (I).

drástico descenso en los niveles de nitrógeno disuelto (DIN) y del ratio DIN/SRP (fósforo reactivo soluble) con respecto a primavera y verano.

Con respecto al acoplamiento entre la PP y PB (Fig. 5.6), no se observó ninguna correlación significativa ni entre los valores horarios, ni entre los valores diarios integrados ( $\text{mg C m}^{-2} \text{h}^{-1}$  o  $\text{mg C m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ). La comparación entre estas variables, cuantificada en forma de valores diarios integrados (PBD y PPD), mostró que la PBD representó aproximadamente entre el 2 y el 40 % de la PPD en las fechas estudiadas. Mientras en primavera y verano (periodos de elevada PPD) la PBD representó una pequeña proporción de la PPD (2-5 %), en invierno esta proporción aumentó considerablemente, llegando a alcanzar  $\approx 40\%$ . El carbono orgánico disuelto liberado por el fitoplancton de manera contemporánea durante la fotosíntesis (EDOC) fue mayor que la demanda bacteriana de carbono o carbono requerido por las bacterias para la producción bruta (producción neta más respiración) en todas las fechas experimentales.



**Fig. 5.6.** Valores diarios integrados de producción primaria (PPD) y producción bacteriana (PBD) en las fechas experimentales.

## Características filtradoras de la comunidad zooplanctónica en condiciones hipertróficas

Durante los dos periodos estudiados en este trabajo, finales de invierno/principios de primavera y mediados de primavera, los parámetros biológicos y fisico-químicos en el lago fueron muy diferentes. En concreto, la composición de la comunidad fitoplanctónica pasó de estar dominada por diatomeas y clorofíceas a estar dominada por cianobacterias, y esta sucesión estuvo acompañada por un cambio en la especie dominante de zooplancton, en concreto, del cladócero de gran tamaño *Daphnia magna* al de menor tamaño *Bosmina longirostris*.

Los experimentos realizados a finales de invierno/principios de primavera indicaron que las tasas de filtración de *Daphnia magna* fueron notablemente bajas tanto para el fitoplancton como para las bacterias heterótrofas. Las tasas de filtración de *D. magna* obtenidas para ambos grupos de organismos fueron prácticamente idénticas. De manera similar, las tasas de filtración por unidad de biomasa y la eficiencia de asimilación de *D. magna* fueran comparables para fitoplancton y bacterias heterótrofas. Los experimentos realizados a mediados de primavera indican que la especie dominante de metazooplancton en la Albufera de Valencia durante este periodo, *B. longirostris*, mostró una clara preferencia por las células de mayor tamaño. En concreto, esta especie mostró tasas de filtración más altas para las algas de 1-15  $\mu\text{m}$  que para las bacterias  $< 1 \mu\text{m}$ . Asimismo, la mayor parte del carbono ingerido por *B. longirostris* fue proporcionado por algas de 3-15  $\mu\text{m}$ . En lo referente a la fracción de zooplancton correspondiente a un tamaño de 50-100  $\mu\text{m}$ , la especie predominante fue *Keratella cochlearis*. Nuestros experimentos indican que si bien este rotífero es capaz de alimentarse de bacterias, muestra una preferencia evidente por algas de 3-15  $\mu\text{m}$ . Por último, considerando la comunidad de zooplancton en su totalidad, las tasas específicas de carbono por unidad de biomasa fueron mayores para el fitoplancton que para las bacterias (2  $\mu\text{g C}$  de fitoplancton frente a 0,5  $\mu\text{g C}$  de bacterias ingeridas por  $\mu\text{g C}$  zooplancton). En términos de carbono total ingerido por el zooplancton, estos



zooplancton, estos resultados se traducen en un aporte mayoritario de carbono por parte del fitoplancton (75%).

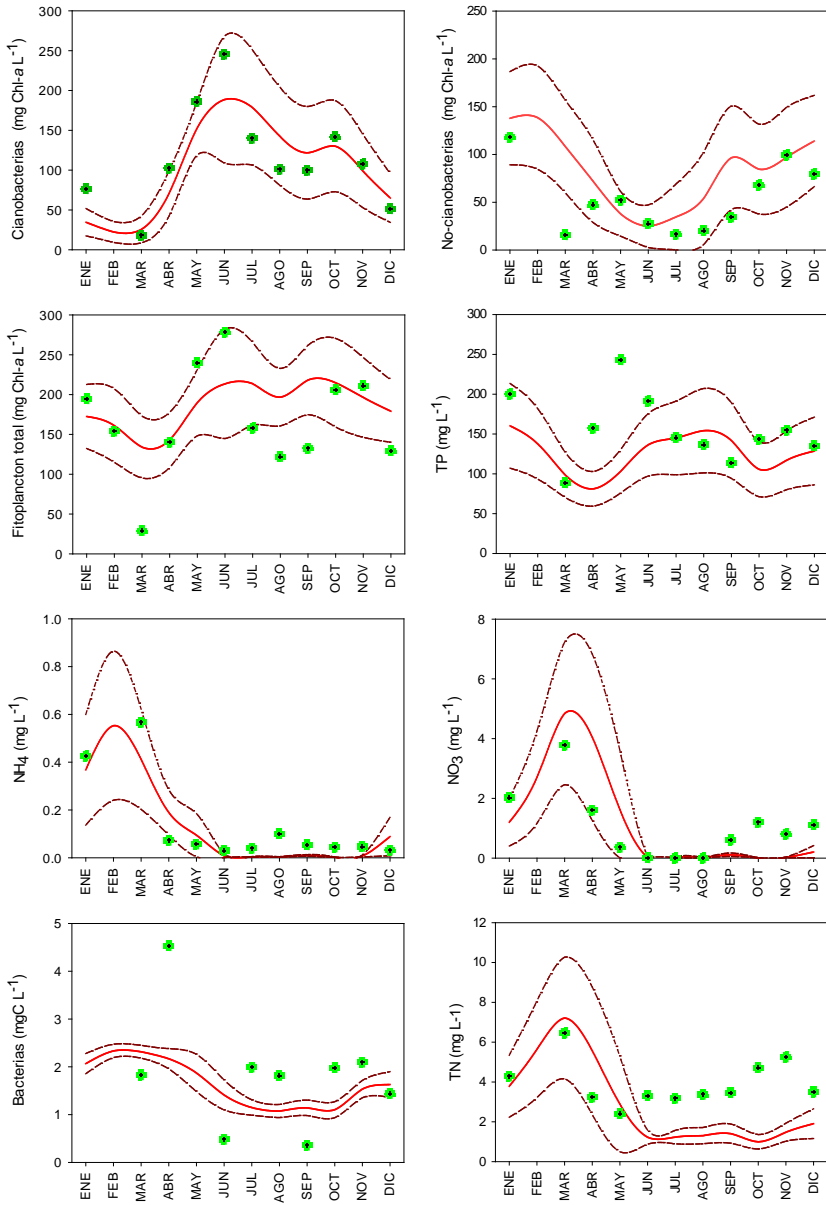
### **Los modelos ecológicos como herramientas de conocimiento y gestión de los ecosistemas acuáticos: el caso de la Albufera de Valencia**

Los resultados referentes a la comparación entre los valores observados y simulados correspondientes a 2010 para ciertas variables de estado (incluyendo los intervalos de confianza al 95%) se muestran en la Fig. 5.6. El modelo es capaz de simular satisfactoriamente los patrones estacionales de nitrato, amonio, así como de nitrógeno y fósforo total. Las predicciones para la biomasa total de fitoplancton y n-cianobacterias coinciden con los datos observados, aunque el modelo no reproduce con exactitud el evento de aguas claras observado a finales de invierno. Sin embargo, en el caso de las cianobacterias, el modelo simula de manera realista la dinámica estacional observada, capturando los valores mínimos y máximos. Las variaciones estacionales observadas para las bacterias heterótrofas no son replicadas en detalle por el modelo, pero éste sí reproduce el valor medio de biomasa observado. La competencia del modelo fue valorada en mayor detalle y profundidad mediante la aplicación de dos pruebas de bondad de ajuste: error relativo y eficiencia de modelización. El error relativo es un parámetro independiente de escala que refleja el porcentaje de discrepancia entre los valores simulados y observados. La eficiencia de modelización evalúa la capacidad predictiva del modelo usando como valor de referencia los valores medios observados. Así, un valor cercano a uno indica que los valores simulados se ajustan de manera precisa a los observados, mientras que un valor cercano a cero indica que la media de los valores observados constituye una predicción igual de eficiente que la que ofrece el modelo para las observaciones individuales. Por último, un valor negativo indica que la media de los datos

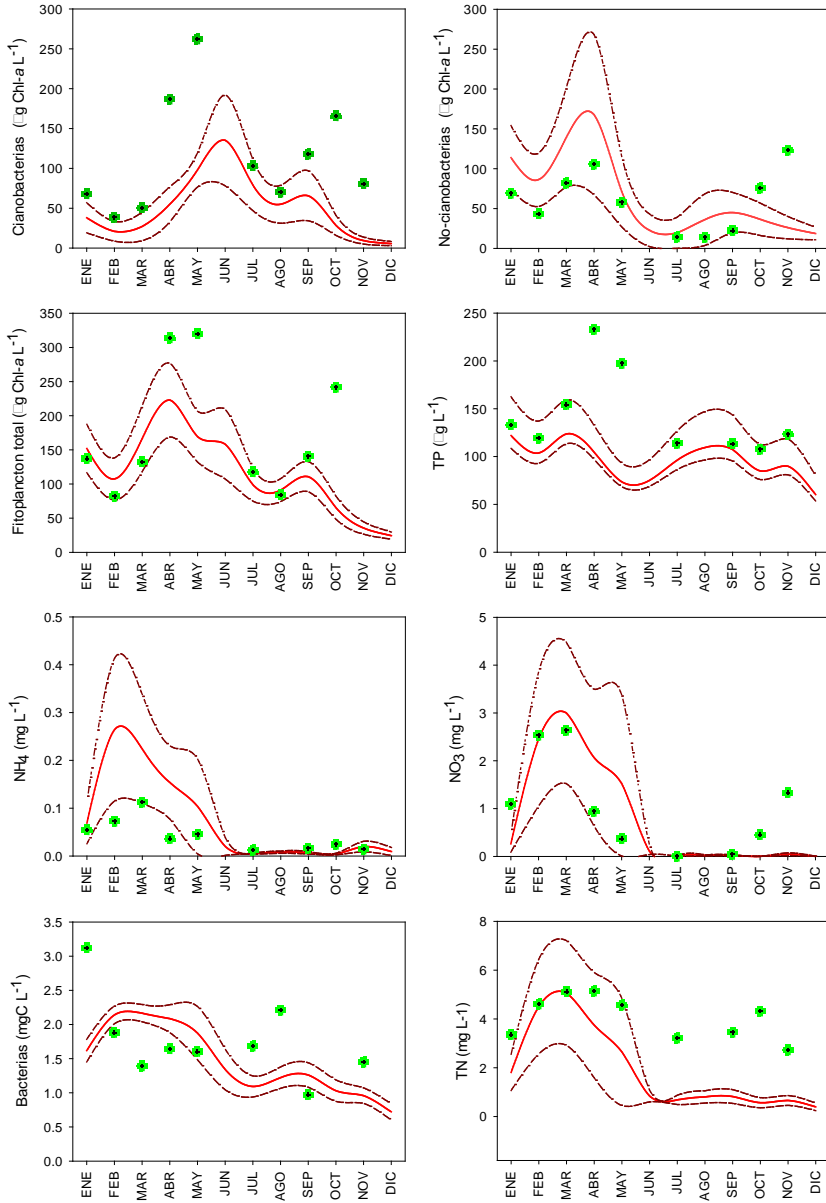
observados ofrecería una predicción mejor que la proporcionada por el modelo (Stow *et al.*, 2003).

Atendiendo a las pruebas de bondad de ajuste, y en concreto a los valores de error relativo correspondientes a 2010, la menor discrepancia entre los valores observados y simulados se obtuvo para las variables de estado fitoplancton total, cianobacterias y fósforo total, mientras que la mayor discrepancia se obtuvo para el *fosfato*. Respecto a la eficiencia de modelización, cianobacterias y amonio mostraron valores positivos, siendo los valores para no-cianobacterias, fosfato, nitrógeno y fósforo total negativos.

La comparación de los valores observados y las simulaciones correspondientes al periodo de 2011 se muestran en la Fig. 5.7. Es importante destacar, en primer lugar, que en este año no tuvo lugar un “eventos de aguas claras”, y los valores mínimos registrados para la clorofila-a fueron aproximadamente  $80 \mu\text{g L}^{-1}$ . En el caso de la biomasa total de fitoplancton, el modelo captura el patrón estacional general pero subestima tanto el máximo de primavera, como el pico secundario de otoño. Estos resultados reflejan la subestimación asociada a los valores observados para las cianobacterias. Por el contrario, el modelo sobrestima las observaciones correspondientes a la biomasa de no-cianobacterias. La variabilidad estacional de los valores observados para las bacterias heterótrofas no es capturada por el modelo, sin embargo, .... simula adecuadamente los valores medios. En lo referente a las pruebas de bondad de ajuste para al periodo de 2011, los valores más bajos de error relativo se obtuvieron para fitoplancton total y fósforo total, mientras que el valor de las cianobacterias aumentó marcadamente con respecto al obtenido para el periodo de calibración (2010). Por otra parte, fosfato y amonio mostraron las mayores discrepancias entre los valores observados y simulados. Atendiendo a la eficiencia de modelización, el fosfato, nitrato y bacteria obtuvieron valores positivos. Sin embargo, el resto de variables de estado mostró valores negativos.



**Fig. 5.6.** Comparación entre los valores mensuales observados y simulados por el modelo para cianobacterias, no-cianobacterias, fitoplancton, amonio, nitrato, nitrógeno total (TN), fósforo total (TP) y bacterioplancton heterótrofo durante el periodo de calibración (2010). Los puntos verdes representan las observaciones y las líneas sólidas las predicciones del modelo. Las líneas discontinuas representan los márgenes de incertidumbre del 95% asociados a las funciones externas de forzamiento del modelo.

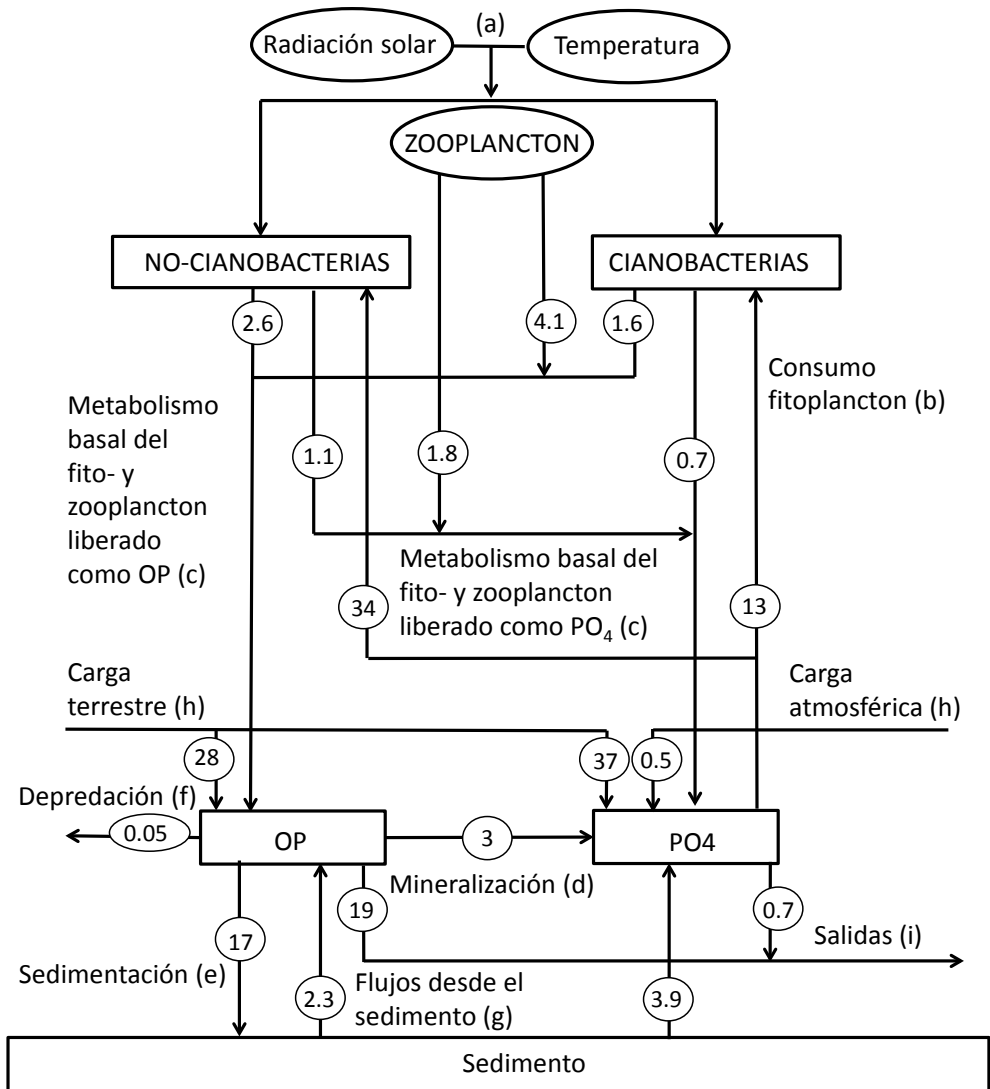


**Fig. 5.7.** Comparación entre los valores mensuales observados y simulados por el modelo para cianobacterias, no-cianobacterias, fitoplancton, amonio, nitrato, nitrógeno total (TN), fósforo total (TP) y bacterioplancton heterótrofo durante el periodo de validación (2011). Los puntos verdes representan las observaciones y las líneas sólidas las predicciones del modelo. Las líneas discontinuas representan los márgenes de incertidumbre del 95% asociados a las funciones de forzamiento externas del modelo.

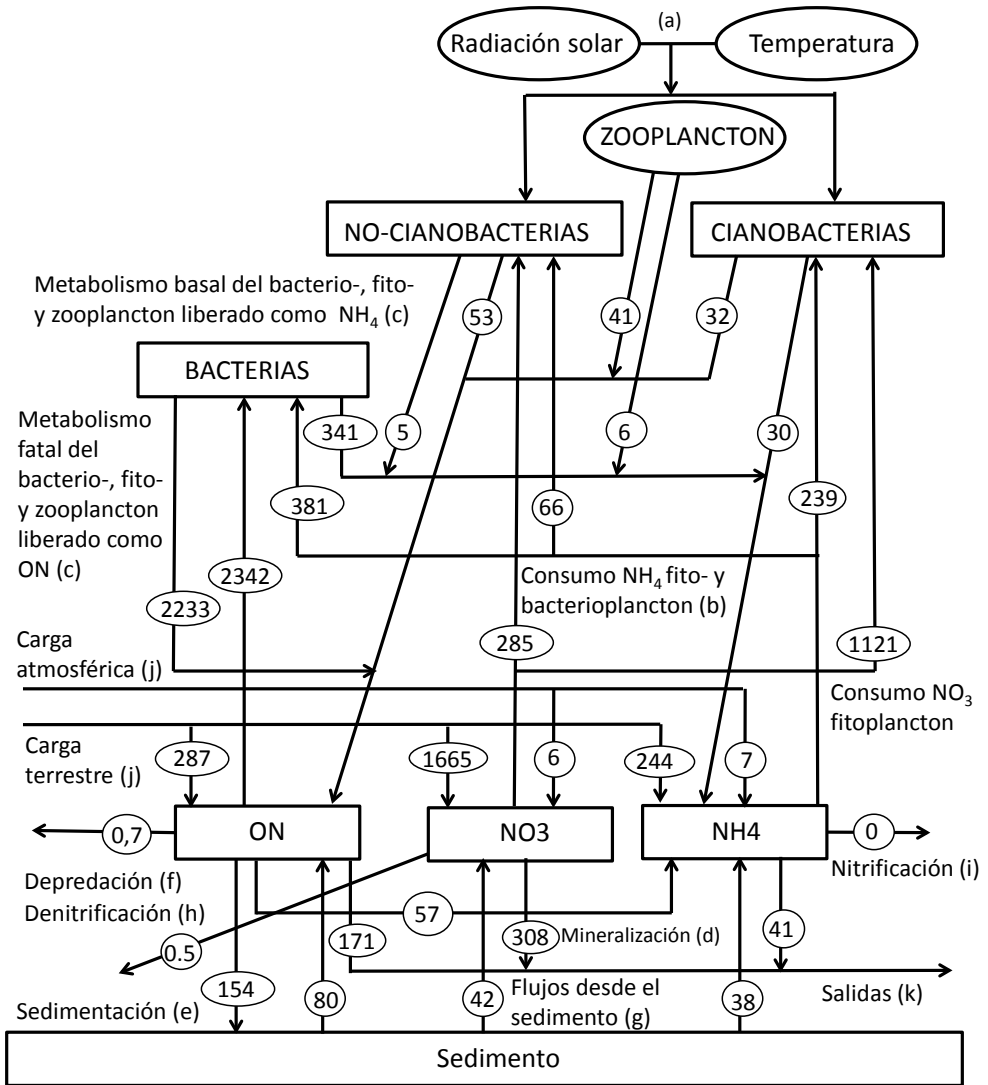
El análisis de sensibilidad indicó que los parámetros de mayor influencia para el fitoplancton total y la biomasa de cianobacterias fueron fundamentalmente los relacionados con las estrategias de crecimiento y sedimentación de ambos grupos de fitoplancton. Otros factores relevantes son aquellos relacionados con la temperatura de referencia, la proporción de nitrógeno y fósforo inerte enterrado en el sedimento o las cuotas máximas de fósforo y nitrógeno en no-cianobacterias y cianobacterias, respectivamente.

Los ciclos anuales de nitrógeno y fósforo simulados por el modelo se muestran en las figuras 5.8 y 5.9. Estos ciclos ilustran la magnitud de las cargas de nutrientes externas y los distintos procesos ecológicos representados por el modelo. Para la interpretación de estos resultados es importante tener presente que las cargas externas de nutrientes consideradas por el modelo están basadas en concentraciones de nutrientes ponderadas por el flujo medido en los canales seleccionados durante el periodo de estudio (2010-2011) y por tanto los ciclos de nitrógeno y fósforo en el lago están estrechamente relacionados con el régimen hidrológico del mismo. El modelo considera unos aportes hidrológicos de origen fluvial y por precipitación que resultan en un total de  $231 \text{ hm}^3 \text{ año}^{-1}$  y que teniendo en cuenta las pérdidas debidas a evaporación en la superficie del lago, resultan en una tasa de renovación de  $8,9 \text{ año}^{-1}$ .

Las cargas alóctonas de nitrógeno, suponen una entrada de  $2209 \times 10^3 \text{ kg año}^{-1}$  y sólo una pequeña fracción, aproximadamente el 25%, abandona el lago a través de las golas. En el caso del fósforo, los aportes externos suman  $65,5 \times 10^3 \text{ kg año}^{-1}$  y las salidas del sistemas, también constituyen una pequeña proporción del 30%. En cuanto a los flujos de nutrientes desde el sedimento, el modelo refleja unos aportes de fósforo de  $6,2 \times 10^3 \text{ kg año}^{-1}$ , y un flujo mucho más elevado de nitrógeno, de  $160 \times 10^3 \text{ kg año}^{-1}$ .



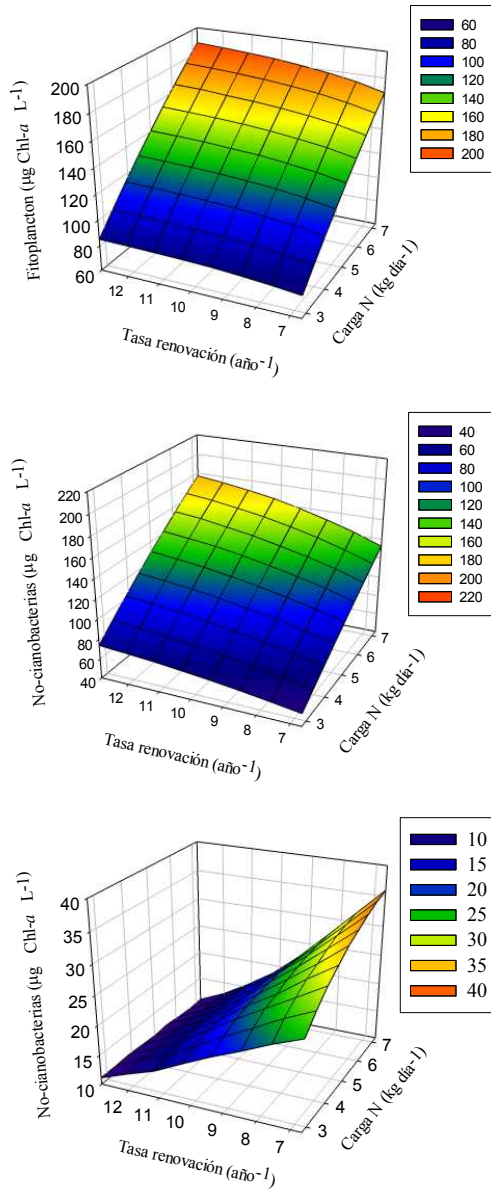
**Fig. 5.8.** Ciclo del fósforo: (a) funciones externas de forzamiento para el crecimiento de fitoplancton (temperatura, radiación solar); (b) consumo por parte del fitoplancton; (c) metabolismo basal de fito- y zooplancton liberado en forma de PO<sub>4</sub> y OP; (d) mineralización de OP; (e) sedimentación de partículas; (f) depredación de detritus; (g) flujos de PO<sub>4</sub> y OP desde el sedimento por difusión, resuspensión por viento y bioturbación; (h) aportes externos de PO<sub>4</sub> y OP; (i) salidas de PO<sub>4</sub> y OP. Las cifras representan flujos anuales acumulados (t<sup>-1</sup>).



**Fig. 5.9.** Ciclo del nitrógeno: (a) funciones de forzamiento externas para el crecimiento de fitoplancton (temperatura, radiación solar); (b) consumo por parte del fitoplancton; (c) metabolismo basal de bacterio-, fito- y zooplancton liberado en forma de  $NH_4$  y  $ON$ ; (d) mineralización de  $ON$ ; (e) sedimentación de partículas; (f) depredación de detritus; (g) flujos de  $NH_4$ ,  $NO_3$  y  $ON$  desde el sedimento por difusión, resuspensión por viento y bioturbación; (h) pérdidas de  $NO_3$  asociadas a la denitrificación; (i) nitrificación; (j) aportes externos de  $NH_4$ ,  $NO_3$  y  $ON$ ; (k) salidas de  $NH_4$ ,  $NO_3$  y  $ON$ . Las cifras representan flujos anuales acumulados ( $t^{-1}$ ).

El análisis de escenarios indica que tanto el fitoplancton en su conjunto, como cianobacterias y no-cianobacterias de manera independiente, muestran una respuesta lineal al amplio rango de cargas de nutrientes y tasas de renovación exploradas, siendo esta respuesta más acusada para los nutrientes. Los resultados basados en valores medios anuales ilustran una relación positiva entre la biomasa del fitoplancton (fitoplancton total, cianobacterias y no cianobacterias) y las tasas de renovación del lago *i.e.* mayores tasas de renovación favorecen valores más elevados de biomasa fitoplanctónica. Sin embargo, si nos centramos en periodos de tiempo más cortos, como por ejemplo febrero-marzo (Fig. 5.10), podemos apreciar un posible efecto de dilución asociado a altas tasas de renovación. En concreto, mientras la biomasa de fitoplancton total y no-cianobacterias aumenta ligeramente a medida que aumentan tasas de renovación, la biomasa de cianobacterias muestra la reacción opuesta, es decir, un marcado declive.





**Fig. 5.10.** Comparación de las predicciones del modelo para los valores de clorofila-a total, no-cianobacterias y cianobacterias durante el periodo febrero-marzo para el rango indicado de cargas de nutrientes y tasas de renovación. Las variaciones de nutrientes corresponden a concentraciones ponderadas por el flujo de agua de cargas de 4.4 - 11.3 mg de nitrógeno total  $\text{L}^{-1}$  y 130 - 340  $\mu\text{g}$  de fósforo total  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

## **Capítulo VI**

### **Discusión global**



Tal y como ya se ha comentado en la introducción, el conocimiento referente a las variaciones de producción bacteriana (PB) a escala diaria y estacional en lagos altamente eutróficos es limitado. El estudio de tales aspectos en la Albufera de Valencia representa una oportunidad para recabar nuevas evidencias y mejorar el conocimiento sobre la dinámica de las bacterias heterótrofas en este tipo de ecosistemas. En este ámbito, el presente trabajo ha permitido constatar la existencia de un patrón diario de PB en condiciones de hipertrofia en un lago somero. Estos resultados corroboran lo observado en sistemas similares, como por ejemplo en el lago somero hipertrófico Verevi en Estonia (Tammert *et al.*, 2005). Además, al igual que en la Albufera de Valencia, se ha descrito un incremento de la PB durante la noche en el lago meso-eutrófico Constanza (Alemania) y los lagos eutróficos Bagsvaerd (Dinamarca), Võrtsjärv (Estonia) y Ebrié (Costa de Marfil), (Jørgensen, 1992; Simon, 1994; Torretón *et al.*, 1994; Kisand *et al.*, 1998).

Asimismo, nuestro trabajo indica que a escala diaria se produce una síntesis equilibrada de proteínas y ADN por parte del bacterioplancton heterótrofo. No obstante, los resultados con mayor resolución temporal, referentes a primavera, indican que la síntesis de proteínas parece estar ligeramente favorecida hacia el anochecer, corroborando lo observado en el lago somero eutrófico Bagsvaerd (Dinamarca) y el lago somero hipersalino Laguna Madre (Texas) (Chin-Leo & Benner 1991; Jørgensen, 1992). La evaluación de la síntesis relativa de estas macromoléculas ha sido posible mediante el uso combinado de leucina y timidina en las estimas de PB. En concreto, el ratio LIR:TIR (tasas de incorporación de leucina y timidina, respectivamente), permite inferir el estado de crecimiento de la comunidad bacteriana. Así, un ratio LIR:TIR constante en el tiempo indica una síntesis análoga de proteínas y ADN y por tanto una situación de crecimiento equilibrado por parte de la comunidad bacteriana, mientras que oscilaciones en este ratio pueden indicar que se está produciendo un cambio en las tasas de crecimiento en respuesta a variaciones en

las condiciones ambientales (Chin-Leo & Kirchman, 1988; Gasol *et al.*, 1998; Hoppe *et al.*, 2006).

En contraposición a lo observado a escala diaria, la PB no mostró importantes variaciones a escala estacional. Sin embargo, sí se detectaron fluctuaciones en el ratio LIR:TIR. Nuestro trabajo indica que concentraciones más elevadas de carbono orgánico disuelto (DOC) favorecen la producción de proteínas y por tanto el incremento de este ratio. Estos resultados contrastan con la hipótesis de que las bacterias tienden a invertir más recursos en la acumulación de biomasa en condiciones ambientales adversas, como por ejemplo, en situaciones de baja disponibilidad de DOC (Petit *et al.*, 1999).

En lo referente a aspectos de tipo metodológico, y en concreto a la influencia de las condiciones de incubación en las estimas de PB, nuestros resultados, con valores de PB ligeramente más altos en condiciones de exposición a PAR, coinciden con los obtenidos en estudios previos en respuesta a la exposición a luz visible (Ruiz-González *et al.*, 2012). Por el contrario, en otros estudios en los que las bacterias estuvieron expuestas a distintas fracciones de radiación solar (UV-A: 315 - 400 nm, UV-B: 280 - 315; UV-R: 280 - 400 nm; PAR: 400 - 700 nm; radiación incidente) se observaron efectos inhibitorios (Aas *et al.*, 1996; Conan *et al.*, 2008; Rochelle-Newall *et al.*, 2008). La variedad de efectos observados, en muchas ocasiones contradictorios, sugiere que hay otros factores implicados. De hecho, nuestro estudio indica una posible interacción entre los efectos de la luz y la disponibilidad de nutrientes en el ratio luz:oscuridad de LIR y TIR. En concreto, los resultados apuntan a que las concentraciones de amonio modulan, al menos en parte, la incorporación de aminoácidos por parte de las bacterias heterótrofas. De la misma manera, nuestros resultados indican que a concentraciones bajas de DOC, la luz puede favorecer indirectamente la incorporación de leucina y timidina, probablemente debido a que estimula la producción de DOC por parte del fitoplancton (Ruiz-González *et al.*, 2013). A la vista de nuestros

resultados, que evidencian un posible efecto de la luz solar sobre la PB, respaldamos el uso de incubaciones en condiciones de exposición a la radiación solar natural o la utilización combinada de éstas con incubaciones realizadas en oscuridad.

Otra cuestión de tipo metodológico que cabe mencionar es la elección de las concentraciones de  $^3\text{H}$ -leucina y  $^3\text{H}$ -timidina para la estima de la PB. En nuestro estudio, las tasas de incorporación de leucina y timidina se midieron a la mitad de la concentración saturante y en consecuencia, los valores obtenidos para estas tasas corresponden aproximadamente a la mitad de las que se obtendrían a concentraciones saturantes de  $^3\text{H}$ -leucina y  $^3\text{H}$ -timidina. Por esta razón, y exclusivamente para el cálculo de los valores de BP, se aplicó un factor de 2 para aproximar nuestros valores a los correspondientes a concentraciones saturantes. Sin embargo, en futuros estudios se debería optimizar el método, estableciendo las concentraciones más adecuadas en base a las curva de saturación de  $^3\text{H}$ -leucina y  $^3\text{H}$ -timidina. Dado que suponemos que las concentraciones de estos compuestos en el medio son mínimas, probablemente las concentraciones óptimas dependen fundamentalmente de la composición de la comunidad. Asimismo, la elección del factor de conversión implicado en los cálculos de PB puede afectar de manera relevante los resultados. Aunque el factor teórico aplicado en este estudio ( $2 \times 10^{18}$  células mol de timidina incorporada<sup>-1</sup>) ha sido ampliamente utilizado en la literatura y es muy similar al derivado empíricamente para otros lagos eutróficos, se tiene constancia de que los factores de tipo empírico muestran una variación temporal y se ven afectados por distintos factores ambientales (Bell *et al.*, 1983; Tammert *et al.*, 2005; Calvo-Díaz & Morán, 2009). Por tanto, el cálculo de factores de conversión empíricos específicos ayudaría a cuantificar de manera más precisa la PB en la Albufera de Valencia.

Por último, la naturaleza hipertrófica del lago de estudio invita a explorar el límite superior de la PB. Si bien los valores obtenidos en la Albufera de Valencia son considerablemente elevados (hasta  $706 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ), no superan el valor máximo

recogido en la literatura referente a lagos hipertróficos, que equivale aproximadamente a  $1100 \text{ mg C m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Sommaruga, 1995).

En la presente investigación hemos evaluado también las variaciones diarias de producción primaria (PP), en este caso claramente definidas por las fluctuaciones en la disponibilidad de luz a lo largo del día. El marcado máximo observado a mediodía en superficie difiere de la disminución superficial con respecto a capas más profundas descrita por otros estudios en este periodo del día (Oliver *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2011). Esto se explica posiblemente por la ausencia de fotoinhibición cerca de la superficie (a 0,2 m de profundidad), derivada del efecto de sombra producido por la elevada biomasa fitoplanctónica presente en el lago. El hecho de que en invierno, durante el periodo de máxima transparencia del agua (asociada a una reducción de la biomasa fitoplanctónica), se observase el fenómeno de fotoinhibición, refuerza la hipótesis de que el efecto de sombra producido por el fitoplancton desempeña un papel fundamental en definir las variaciones a escala diaria de PP en la Albufera de Valencia. Nuestro estudio indica, además, que la elevada biomasa fitoplanctónica también define el perfil vertical de PP en el lago, provocando una rápida extinción de la luz a medida que aumenta la profundidad y limitando de manera creciente la PP en la columna de agua. En consecuencia, el grueso de esta producción se concentra en las capas superficiales del lago.

En cuanto a las variaciones a escala estacional, la PP presentó valores moderados en invierno debido a la baja radiación solar, pero sobre todo al descenso de la biomasa fitoplanctónica en esta estación. La mencionada disminución fue la consecuencia del incremento del flujo de agua a través del lago en este periodo, que provocó la exportación de una gran parte de esta biomasa al mar y se tradujo en un marcado aumento en la transparencia del agua. Estos resultados son relevantes en el contexto de restauración del ecosistema, ya que indican que el aumento de la tasa de renovación de agua del lago podría ayudar a disminuir los niveles de PP y por tanto a mitigar la eutrofización, tal y como se ha demostrado en numerosos lagos eutróficos,

como por ejemplo los lagos Balaton y Kastoria (Padisák *et al.*, 1999; Moustaka-Gouni *et al.*, 2006). El máximo de PP tuvo lugar en primavera, favorecido parcialmente por la alta disponibilidad de luz y nutrientes. Otro factor influyente fue la reducción del flujo de agua circulante a través del lago en este periodo, lo cual propició el desarrollo de una floración de cianobacterias. El agotamiento estival del nitrógeno se debió principalmente al intenso crecimiento algal durante primavera y principios de verano y probablemente en menor medida, a la denitrificación en la interfase agua-sedimento (Seitzinger, 1998). Probablemente, las bajas concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto limitaron el crecimiento algal dando lugar a los valores moderados de PP observados en esta estación.

La dinámica estacional de PP en la Albufera de Valencia, con el máximo en primavera, difiere de la observada en numerosos lagos hipertróficos, con un máximo estival (Kamjunke *et al.*, 1997; Kisand & Nõges, 1998; Liboriussen & Jeppesen, 2003; Schelske *et al.*, 2003). Esto probablemente se debe a que a diferencia de la mayoría de los lagos mencionados, situados en la zona templada septentrional, la Albufera de Valencia presenta temperaturas moderadamente elevadas en primavera ( $\approx 20^{\circ}\text{C}$ ). Asimismo, la importante limitación de nitrógeno durante el verano, posiblemente impidió que se alcanzaran tasas fotosintéticas elevadas a pesar de las condiciones favorables de luz y temperatura características de esta estación. Sin embargo, el patrón estacional de PP específica sí coincidió con la variaciones descritas en el lago somero hipertrófico Zeekoevlei (Sudáfrica), con valores menores en invierno y más elevados en primavera (Harding, 1997).

Las variaciones estacionales de PP estuvieron asociadas a un cambio en la composición de la comunidad fitoplanctónica y a su vez en la comunidad de zooplancton. Nuestra investigación ha permitido evaluar, en condiciones muy semejantes a las naturales, la contribución de las poblaciones de fitoplancton y bacterias heterótrofas a la transferencia de carbono a las especies dominantes de metazooplancton durante dos fases bien diferenciadas del ciclo anual: finales de



invierno/principios de primavera y mediados de primavera (tras el máximo de PP). Las bajas tasas de filtración por parte de *Daphnia magna* observadas a finales de invierno/principios de primavera, probablemente reflejan el efecto inhibitorio causado por la gran abundancia de cianobacterias filamentosas en las suspensiones alimenticias derivadas del agua del lago, ya que diversos estudios previos atribuyen una disminución de las tasas de filtración de *D. magna* a abundancias elevadas de individuos de este grupo (DeMott *et al.*, 2001; Sahuquillo *et al.*, 2007; Pannoso & Lüring, 2010). El hecho de que las tasas de filtración de *Daphnia magna* fueran prácticamente idénticas para el fitoplancton y las bacterias heterótrofas, corrobora los hábitos de alimentación no selectivos de los dáfnidos previamente descritos en la literatura (DeMott, 1982; Lampert, 1987; Kamjunke *et al.*, 1999) y supone una novedosa aportación a los escasos datos obtenidos en condiciones análogas a las naturales.

Asimismo, tanto las tasas de filtración por unidad de biomasa como la eficiencia de asimilación de *D. magna* fueran comparables para fitoplancton y bacterias, lo cual pone de manifiesto el papel de estas últimas como una fuente de alimentación para el metazooplancton a finales de invierno/principios de primavera, periodo en el cual aumentan las tasas de renovación de agua en el lago y la transparencia del agua. Estos resultados pueden tener implicaciones más amplias para la sucesión anual de zooplancton en ecosistemas altamente eutróficos, ya que corroboran la hipótesis de que las bacterias podrían proporcionar una fuente alternativa de alimentación en periodos en los que la biomasa algal es reducida (Kamjunke *et al.*, 1999). En referencia a la ingestión de bacterias por parte del zooplancton en la Albufera de Valencia, estudios recientes han corroborado que las bacterias constituyen la principal fuente de alimentación para las especies de rotíferos dominantes en verano: *Anuraeopsis fissa* y *Brachionus angularis* (Miracle *et al.*, 2014).

Los experimentos realizados a mediados de primavera reflejaron una preferencia de *Bosmina longirostris* por las células de mayor tamaño, lo que concuerda con

resultados de estudios previos (DeMott, 1982; Schoenberg, 1989; Tóth & Kato, 1997). Como en el caso de *D. magna*, las tasas de filtración obtenidas fueron bajas, probablemente como consecuencia de que las abundancias celulares en las suspensiones de alimentación superaron el nivel de limitación incipiente. Este nivel puede definirse como una concentración de alimento a partir de la cual la tasa de ingestión deja de aumentar de manera proporcional a la concentración de alimento, y se establece una relación negativa entre ambas (Downing & Rigler, 1984).

Los resultados referentes a la ingestión de carbono por *B. longirostris* indican que el fitoplancton es la mayor fuente de carbono. Asimismo, el fitoplancton constituye el aporte mayoritario de carbono ingerido por unidad de biomasa para el total de la comunidad zooplanctónica, integrada parcialmente por *Keratella cochlearis* y larvas nauplio del copépodo *Acanthocyclops americanus* (si bien estos resultados muy probablemente reflejan las preferencias alimenticias de la especie dominante en este periodo, *B. longirostris*). En definitiva, nuestro trabajo sugiere que en primavera, durante los periodos de dominancia de *B. longirostris*, la transferencia de la energía de algas y bacterias ocurre en gran parte a través de la red trófica tradicional.

Nuestras observaciones concuerdan con la idea general de que los cladóceros de pequeño tamaño suelen desplazar a los más grandes en situaciones de dominancia de cianobacterias filamentosas. Esto se debe a que los dáfnidos son más sensibles que *Bosmina* sp. a abundancias elevadas de estas especies fitoplanctónicas (Lampert, 1982; Gliwicz & Lampert, 1990; Abrantes *et al.*, 2009). De la misma manera, nuestros datos apoyan el uso de los cladóceros como un indicador eficiente del estado trófico de los lagos someros y en particular de *B. longirostris* como indicador de eutrofia (Alonso, 1996; Haberman, 2007; Haberman & Haldna, 2014).

La síntesis del estudio de los procesos biológicos desarrollado en los capítulos I, II y III permite analizar distintos aspectos relevantes para el flujo del carbono en el ecosistema. Estos aspectos incluyen el acoplamiento entre las producciones primaria

y bacteriana, la contribución relativa a la producción de carbono orgánico particulado por parte del fitoplancton y las bacterias heterótrofas y la transferencia de este carbono a niveles tróficos superiores como el zooplancton.

El contraste entre las marcadas fluctuaciones de PP y la relativa invariabilidad en la PB a escala estacional, unido a la falta de correlación entre ambas variables, sugiere que a esta escala temporal, no existe un acoplamiento entre la PP y la PB. Este hecho posiblemente se debe a que dada la elevada PP observada en el lago, las concentraciones de materia orgánica disuelta existentes en el agua son suficientes para cubrir las demandas de carbono de las bacterias heterótrofas y por tanto, éstas no dependen del carbono orgánico disuelto producido de manera contemporánea por el fitoplancton como subproducto de la fotosíntesis (EDOC). De hecho, en las fechas estudiadas, las concentraciones de EDOC sobrepasaron las concentraciones de carbono requeridas para la producción bacteriana bruta. Este hecho sugiere además, que el bacterioplancton heterótrofo no depende de los aportes alóctonos de materia orgánica, aunque ésta no puede ser totalmente descartada como una posible fuente adicional de carbono.

La falta de acoplamiento entre la PP y la PB observada en la Albufera de Valencia coincide con resultados del lago somero Vörtsjärv, en el que la producción fitoplanctónica era capaz de cubrir las demandas bacterianas de carbono (Kisand & Nöges, 1998). Sin embargo, difieren de la fuerte correlación encontrada en el embalse eutrófico de Bautzen, en el que la producción algal podía cubrir sólo parcialmente la demanda bacteriana de carbono (Kamjunke *et al.*, 1997). En definitiva, nuestros resultados, junto a los obtenidos en sistemas similares, apoyan la hipótesis de que la alta disponibilidad de DOC favorece el desacoplamiento entre las producciones primaria y secundaria (Gasol *et al.*, 1998).

En el contexto de la contribución relativa a la producción de carbono orgánico particulado, como se ha mencionado anteriormente, los importantes cambios estacionales observados en la PP contrastan con las pequeñas variaciones experimentadas por la PB en el lago. Por tanto, las fluctuaciones en los valores del ratio de producción bacteriana:producción primaria diaria (PBD:PPD) responden fundamentalmente a cambios en la PPD. El amplio rango de valores observados coincide con el descrito en otros lagos altamente eutróficos (Søndergaard, 1993; Robarts *et al.*, 1994; Kamjunke *et al.*, 1997) y es interesante destacar, que nuestro valor medio de 16% se aproxima mucho a la cifra de 15% encontrada para un total de 21 ecosistemas de agua dulce con una productividad primaria similar a la de la Albuferade Valencia (Fouilland & Mostajir, 2010).

La proporción de carbono particulado que cada uno estos grupos de organismos proporcionan (expresada mediante el ratio PPD/PBD) invita a explorar las relaciones entre las producciones primaria y bacteriana con niveles tróficos superiores. En todos los periodos estudiados, el ratio DPP:DPB fue superior a 1, indicando que el fitoplancton probablemente representa el mayor aporte de carbono particulado disponible para los niveles tróficos superiores en la Albufera de Valencia a lo largo del ciclo anual. Sin embargo, este hecho no implica necesariamente que el fitoplancton constituya la principal fuente de energía para los consumidores, ya que las cianobacterias filamentosas y coloniales, muy abundantes en el lago, no son comestibles para la mayoría de especies de zooplancton y entran en la vía detrítica. En consecuencia, cabría esperar que las bacterias heterótrofas representen una importante fuente de energía para niveles tróficos superiores en lagos hipertróficos y que la transferencia de carbono a través del bucle microbiano sea importante en este tipo de lagos.

A este respecto, nuestro trabajo indica que mientras a finales de invierno/principios de primavera casi la mitad del carbono ingerido por el zooplancton fue proporcionado por las bacterias, a mediados de primavera esta cifra prácticamente se redujo a un

cuarto. Esto sugiere que si bien en los periodos de dominancia de *B. longirostris* la transferencia de energía desde los niveles tróficos inferiores se produce principalmente a través de la red trófica tradicional, durante periodos de dominancia de *D. magna*, en los que se reduce la biomasa algal, el acoplamiento trófico entre el bucle microbiano y la red trófica clásica gana importancia en la transferencia de energía.

Por último, nuestro estudio pone de manifiesto que tan solo una pequeña fracción de la biomasa fitoplanctónica es consumida por el zooplancton, tal y como se ha observado en otros lagos eutróficos, ilustrando la limitada capacidad del zooplancton para controlar el crecimiento algal y en un contexto más amplio, apoyando la hipótesis de que el control *top-down* es reducido en los lagos de zonas templadas cálidas (Agasild & Nøges, 2005; Jeppesen *et al.*, 2007).

Dentro del marco del procedimiento estándar de modelización (Jørgensen, 1997), el desarrollo de un modelo ecológico puede considerarse como un proceso iterativo que implica una serie de pasos fundamentales: definición del problema, desarrollo de un diagrama conceptual del sistema, formulación matemática de los procesos, análisis de sensibilidad, calibración y validación. Siguiendo esta línea de razonamiento, nuestro estudio presenta un modelo biogeoquímico dirigido a reproducir los procesos ecológicos que definen la dinámica del fitoplancton en la Albufera de Valencia y que en definitiva subyacen a los problemas de eutrofización del lago.

En términos generales, el modelo desarrollado reproduce de manera realista los patrones estacionales de clorofila-*a* total, nitrato, amonio, así como de nitrógeno y fósforo total (teniendo a su vez en cuenta la incertidumbre asociada a las funciones de forzamiento externas). Sin embargo, las pruebas de bondad de ajuste sugieren que en este momento, la capacidad predictiva del modelo para ciertas variables de estado (e.g. fosfato) no está demostrada. El hecho de que el valor máximo y mínimo para el error relativo y la eficiencia de modelización respectivamente se obtuvieran para el

periodo de validación puede ser una evidencia de que ciertos parámetros han sido mal especificados y se han anulado entre sí dando lugar a una mayor competencia del modelo para los datos correspondientes al periodo de calibración.

Como se ha mencionado anteriormente, el análisis de sensibilidad constituye una de las etapas críticas en el desarrollo de un modelo ecológico. Este tipo de análisis permite identificar los parámetros más influyentes para el modelo y por tanto aquellos procesos que deben ser estudiados en mayor profundidad. En base a nuestros resultados, podemos concluir que la correcta caracterización de las tasas de crecimiento y sedimentación de ambos grupos de fitoplancton son fundamentales para garantizar la capacidad predictiva del modelo y por tanto su utilidad como herramienta de gestión.

Los modelos ecológicos, entendidos como una herramienta para abordar la gestión de ecosistemas eutróficos, están dirigidos principalmente a ampliar el conocimiento ecológico de los lagos y a proporcionar una herramienta predictiva sobre la respuesta potencial de estos ecosistemas (Arhonditsis & Brett, 2004). El modelo desarrollado, concebido como herramienta heurística, ha permitido extraer información referente a los flujos de fósforo y nitrógeno en el lago. El análisis de los distintos procesos ecológicos relacionados con los ciclos de nutrientes muestra que las cargas aportadas por las aguas influyentes suponen, con mucho, la mayor contribución a los aportes de fosfato a la columna de agua (> 90%). El aporte correspondiente a los sedimentos es menor que el originado por mecanismos de reciclado (mineralización y metabolismo basal del plancton), y dado que este último es insuficiente para cubrir las demandas del fitoplancton, el crecimiento algal debe depender de los aportes externos de fósforo. En referencia al ciclo del fósforo, también es interesante destacar que el modelo atribuye un consumo de más del 70% del fósforo incorporado por el fitoplancton al grupo de las cianobacterias y sugiere que los sedimentos constituyen un sumidero de fósforo a escala anual.

Al igual que en el caso del fósforo, las cargas aportadas por las aguas entrantes en la Albufera constituyen el mayor aporte de este elemento a la columna de agua, mayoritariamente en forma de nitrato. También en este caso, los mecanismos de reciclado del nitrógeno son insuficientes para cubrir las demandas del fitoplancton, que por tanto son cubiertas por aportes externos. Sin embargo, es importante señalar que de acuerdo a nuestro análisis, el nitrógeno liberado por las bacterias a través del metabolismo basal proporciona aproximadamente la mitad del nitrógeno requerido para el crecimiento fitoplanctónico, hecho que destaca el papel crítico de las bacterias como mineralizadores en el ecosistema. Otros aspectos interesantes referentes al ciclo del nitrógeno son el consumo por parte de las no-cianobacterias de más del 80% del nitrógeno incorporado por el total del fitoplancton y la existencia de un flujo neto de este nutriente desde los sedimentos a la columna de agua.

Si bien las ecuaciones que integran el modelo son fruto de la experiencia empírica recabada en numerosos lagos, no dejan de estar basadas en formulaciones teóricas. En este punto, es importante matizar que los resultados proporcionados por el modelo en respuesta a diferentes medidas de gestión deben interpretarse teniendo en cuenta que existen ciertas limitaciones en la capacidad predictiva del modelo. La elección de los escenarios explorados se debe en parte al hecho de que el control de las cargas de nutrientes se ha destacado como una prioridad para los lagos someros eutróficos situados en zonas templadas cálidas (Moss *et al.*, 2004; Romo *et al.*, 2005). Dado que a menudo esta medida tiene un efecto limitado y que el ciclo hidrológico del lago está fuertemente regulado por los requerimientos para el cultivo del arroz, la modulación de las tasas de renovación del lago puede suponer una herramienta de gestión efectiva en la Albufera de Valencia (Gulati & van Donk, 2002). De hecho, el proporcionar unos pulsos intensos de agua con cargas bajas de nutrientes a finales de invierno y principios de primavera ha sido propuesto anteriormente como medida para mejorar las condiciones de luz en el lago y favorecer el restablecimiento de macrófitos (Miracle *et al.*, 2012; Rodrigo *et al.*, 2013).

El análisis de escenarios indica que las cargas externas de nutrientes son el factor que tiene una mayor influencia sobre el fitoplancton. Por tanto, el control de éstas debería establecerse como prioridad para la restauración del lago. La restauración de ecosistemas acuáticos suele estar dirigida o centrada en la reducción de los niveles de fósforo por ser el nutriente generalmente considerado como limitante en lagos (Schindler, 1977). No obstante, nuestro análisis ilustra la importancia que el nitrógeno tiene para el ecosistema. Esta idea se ve reforzada por el marcado descenso del nitrógeno inorgánico disuelto en verano que sugiere que el fitoplancton puede experimentar de manera periódica colimitación de nutrientes o limitación por nitrógeno. Es más, diversos estudios indican que la recuperación de macrófitos sumergidos es más probable a concentraciones moderadamente altas de fósforo si la carga de nitrógeno es baja (Jeppesen *et al.*, 2007). En definitiva, enfatizamos la importancia de que los esfuerzos de restauración del lago se dirijan tanto a reducir las cargas terrestres de nitrógeno como a las de fósforo. La relación positiva entre la biomasa del fitoplancton y las tasas de renovación del lago ilustrada por nuestro análisis de escenarios puede explicarse por el hecho de que el incremento de las tasas de renovación conlleva un incremento proporcional en la carga de nutrientes y en consecuencia, tasas de renovación más altas conllevan un incremento indirecto de la biomasa algal (a través de un mayor suministro de nutrientes) que no es compensado por el transporte de biomasa algal fuera del lago (derivado de la mayor tasa de renovación). La notable disminución de la biomasa de cianobacterias en el periodo de febrero-marzo, probablemente refleja que en condiciones de un elevado flujo de agua a través del lago, las pérdidas de biomasa derivadas del transporte fuera del mismo no pueden ser compensadas por las lentas tasas de crecimiento asignadas a este grupo.

Para concluir, nuestro trabajo considera futuras direcciones de investigación que podrían mejorar el presente modelo con el fin de profundizar en la comprensión del funcionamiento ecológico de la Albufera de Valencia. En primer lugar, en próximas



versiones del modelo se debería contemplar la posible introducción de macrófitos y su interacción con el resto de componentes del sistema. En el contexto de restauración de lagos someros eutróficos, la introducción de macrófitos representa una medida de muy extendida debido a su eficiente contribución a la estabilización de la transparencia del agua mediante diversos mecanismos (Ozimek *et al.*, 1990; Hilt *et al.*, 2006; Ibelings *et al.*, 2007). A pesar de que en la actualidad la escasa disponibilidad de luz impide su crecimiento durante la mayor parte del año en la Albufera de Valencia, en el futuro podrían desempeñar un papel relevante para la restauración del lago, especialmente en el caso de que se redujeran de manera efectiva de los aportes externos de nutrientes.

En segundo lugar, cabe destacar la importante influencia que tienen los procesos de intercambio entre los sedimentos y la columna de agua para la dinámica de los lagos someros eutróficos. Con frecuencia, la recuperación de este tipo de lagos se ve retrasada como consecuencia de las cargas internas de nutrientes (Søndergaard *et al.*, 2003, 2005). Aunque no podemos afirmar con total seguridad que este es el caso de la Albufera de Valencia, el hecho de que las concentraciones de clorofila-*a* permanecieran altas incluso en respuesta a reducciones substanciales de las cargas externas de fósforo y nitrógeno revelan cierto nivel de histéresis en relación a éstas, lo que sugiere que la carga interna modularía parcialmente la respuesta del lago, al menos en el caso de los escenarios explorados en este estudio. Por tanto, es de vital importancia obtener una información más detallada tanto a nivel temporal como espacial sobre la distribución y u fraccionamiento químico de nutrientes en el sedimento así como sobre las interacciones del sedimento con la columna de agua con el fin de incluir un submodelo mejorado para este compartimento. En tercer lugar, la introducción del zooplancton como variable de estado es otro de los pasos críticos a tener en cuenta para la mejora del modelo. En concreto, la caracterización de los patrones de sucesión en la comunidad zooplanctónica, con dos periodos diferenciados correspondientes a los eventos de aguas claras y el resto del ciclo anual, permitiría una representación más adecuada de las interacciones entre el fitoplancton y el zooplancton en el

sistema y en consecuencia de los mecanismos de control *top-down*. Por último, los resultados obtenidos a partir del análisis de escenarios para el periodo de febrero-marzo, en los que se observa una marcada reducción de la biomasa de cianobacterias como consecuencia del aumento de la tasa de renovación de agua del lago, invita a realizar un estudio más detallado a escala estacional de la influencia del régimen hídrico en los niveles de clorofila-*a* del lago y sus implicaciones como una medida potencialmente efectiva de restauración para el mismo. En concreto, y en base a propuestas anteriores (Miracle *et al.*, 2012), sería interesante explorar el efecto del aporte de agua al lago en forma de intensos pulsos en determinadas épocas del años sobre los niveles de clorofila-*a*.



## **Conclusiones**



1. A escala diaria, la producción bacteriana muestra un claro patrón caracterizado por un aumento a lo largo de la noche seguido de un evidente descenso al amanecer, estando este patrón asociado a fluctuaciones a escala diaria en las concentraciones de carbono orgánico disuelto.
2. La producción bacteriana no muestra variaciones importantes a escala estacional. No obstante, disminuye moderadamente en el periodo invernal, en el que se reduce la densidad del fitoplancton por efecto del incremento de flujo de agua a través del lago, lo que deriva en un marcado aumento en la transparencia del agua.
3. La producción primaria exhibe un evidente patrón diario con valores máximos a mediodía. El efecto de sombra producido por la elevada biomasa de fitoplancton presente en la columna del agua evita o reduce considerablemente el fenómeno de fotoinhibición cerca de la superficie (0,2 m), lo cual se traduce un patrón diario definido por las fluctuaciones en la disponibilidad de luz a lo largo del día.
4. La disponibilidad de nutrientes y la magnitud del flujo de agua circulante a través del lago son los factores que determinan principalmente las importantes variaciones que la producción primaria experimenta a escala estacional. Los valores más elevados se dan a finales de primavera, propiciados por la elevada disponibilidad de luz y nutrientes, pero también por el desarrollo de una elevada biomasa de cianobacterias, favorecido por el escaso flujo de agua circulante a través del lago. Este desarrollo conlleva el consumo de la mayor parte del nitrógeno inorgánico disuelto y un descenso en el ratio DIN/SRP. Esto se traduce en la aparición de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en verano y en valores moderados de producción primaria derivados de la limitación por nitrógeno en esta estación. Finalmente, los valores más bajos, observados en enero, se deben a una reducción en la biomasa de fitoplancton causada por su exportación al mar como consecuencia del aumento del flujo de agua circulante a través del lago en este periodo.

---

5. A principios de primavera, la gran abundancia de bacilariofíceas, conjugatofíceas y clorófíceas favorece la aparición y dominancia de *Daphnia magna*. No obstante, la concentración de cianobacterias filamentosas permanece elevada en este periodo dificultando la alimentación de este cladócero y dando lugar a tasas de filtración bajas.

6. El marcado incremento en la abundancia de cianobacterias filamentosas y coloniales a mediados de primavera propicia la aparición y dominancia de *Bosmina longirostris*, si bien las tasas de filtración de este cladócero son bajas debido posiblemente a que las concentraciones de alimento superan el nivel de limitación incipiente. Nuestras observaciones respaldan el uso del cladóceros como indicadores del estado trófico de los lagos someros y en particular de *Bosmina* sp. como un indicador de situaciones de eutrofia.

7. *Daphnia magna* presenta hábitos de alimentación no selectivos, con tasas de filtración muy similares para el fitoplancton y las bacterias heterótrofas. Por el contrario, *Bosmina longirostris* exhibe un patrón selectivo de alimentación, con tasas de filtración más altas para células de mayor tamaño.

8. La producción primaria supone una mayor contribución a la producción de carbono orgánico particulado que la producción bacteriana en todos los periodos estudiados. La variación estacional existente en el ratio producción bacteriana:producción primaria está definida por la variaciones estacionales de producción primaria.

9. La falta de acoplamiento entre las producciones primaria y bacteriana a escala estacional probablemente se debe a que las concentraciones de carbono orgánico disuelto presentes en el lago son elevadas y exceden las requeridas por las bacterias. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la alta disponibilidad de carbono orgánico disuelto está asociada a una relación débil entre la producción primaria y bacteriana.

10. Existe una variación temporal en la contribución de las producciones primaria y bacteriana a la transferencia de carbono al zooplancton en el lago. En los periodos de elevada biomasa fitoplanctónica y dominancia de *B. longirostris*, la transferencia de energía desde los niveles tróficos inferiores estudiados (fitoplancton y bacterias heterótrofas) se produce principalmente a través de la red trófica tradicional. Sin embargo, durante periodos de reducida biomasa algal y dominancia de *D. magna*, el acoplamiento trófico entre el bucle microbiano y la red trófica clásica gana relevancia en la transferencia de energía hacia niveles tróficos superiores.

11. En la Albufera de Valencia, únicamente una pequeña proporción de la biomasa bacteriana y fitoplanctónica es consumida por el zooplancton, lo cual apoya la hipótesis de que el control *top-down* es reducido en los lagos someros altamente eutrofizados de zonas templadas cálidas.

12. El modelo biogeoquímico desarrollado permite simular de manera realista un conjunto de variables relevantes para el ecosistema (tales como clorofila-a, nitrato, amonio, nitrógeno total y fósforo total), teniendo asimismo en cuenta la incertidumbre asociada a las funciones externas de forzamiento.

13. El análisis de sensibilidad indica que la correcta caracterización de las estrategias de crecimiento de ambos grupos de fitoplancton, así como sus tasas de sedimentación, es esencial para el desarrollo de un modelo que sea verosímil como herramienta de gestión.

14. El análisis de escenarios revela que las cargas externas de fósforo y nitrógeno son el factor que modula principalmente la respuesta del fitoplancton en el lago, sugiriendo que el control de éstas debe constituir la máxima prioridad de los planes de gestión local dirigidos a la mejora del estado trófico del lago.



---

15. Asimismo, el efecto de dilución de la biomasa de cianobacterias en el periodo de febrero-marzo, asociado a altas tasas de renovación del agua del lago, indica que la modulación del flujo de agua circulante a través del mismo a finales de invierno justo antes de la época propicia para el inicio del desarrollo de los macrófitos, podría ser utilizado para paliar los síntomas de eutrofización. Estos resultados están respaldados por el descenso de la producción primaria observado en invierno.

## Conclusions

1. Bacterial production shows a clear diel pattern characterized by an increase throughout the night followed by an obvious decrease at sunrise, being this pattern associated with diel variations in the dissolved organic carbon concentrations.
2. Bacterial production does not vary importantly at the seasonal scale. However, it decreases moderately in the winter period, when phytoplankton density falls as a result of the increased water flow through the lagoon, driving a marked increase in water transparency.
3. Primary production shows an evident diel pattern with maximum values at noon. The self-shading effect produced by the high phytoplankton biomass present in the water column prevents or reduces significantly photoinhibition near the surface (0.2 m), which translates into a diel dynamics defined by the changes in light availability.
4. Nutrient availability and the magnitude of water flow through the lagoon are the predominant factors determining the significant seasonal variations in primary production. Higher values take place at the end of spring, propitiated by the high light and nutrient availability, but also by the great development of cyanobacterial biomass, favoured by the scarce water flow through the lagoon in this period. This development involves the consumption of most of the dissolved inorganic nitrogen and a decrease in the dissolved organic nitrogen/soluble reactive phosphorus ratio. This translates into the appearance of nitrogen-fixing cyanobacteria in summer and also, moderate primary production values derived from the nitrogen limitation in this season. Finally, the lower values, observed in January, are due to the reduction of phytoplankton biomass caused by its export into the sea as a result of the increase in water flow through the lagoon in this period.

---

5. In the beginning of spring, the high abundance of bacillariophytes, conjugatophytes and chlorophytes favours the appearance and dominance of *Daphnia magna*. Nonetheless, the high concentration of filamentous cyanobacteria in this period hinders the feeding of this cladoceran, resulting in low filtering rates.

6. The marked increase in the abundance of filamentous and colonial cyanobacteria in mid spring propitiates the appearance and dominance of *Bosmina longirostris*. However, the filtering rates of this cladoceran are low probably because food concentrations exceed the incipient limiting level. Our observations support the use of cladocerans as trophic state indicators in shallow lakes and in particular, the use of *B. longirostris* as an eutrophication indicator.

7. *Daphnia magna* exhibits non-selective feeding habits, with similar filtration rates for phytoplankton and heterotrophic bacteria. On the contrary, *Bosmina longirostris* shows a selective feeding pattern, with higher filtering rates for bigger cells.

8. Primary production represents a greater contribution than bacterial production to particulate organic carbon production in all experimental dates. The seasonal variation in the bacterial production:primary production ratio is defined by the seasonal primary production variations.

9. The lack of coupling between primary and bacterial production at the seasonal scale is very likely due to the fact that the dissolved organic carbon concentrations present in the lagoon are high and surpass those required by bacteria. These results support the hypothesis that the high availability of dissolved organic carbon is associated with a weak relationship between primary and bacterial production.

10. There is a temporal variation in the contribution of primary and bacterial production to carbon transfer to zooplankton in the lake. In the periods of high phytoplankton biomass and *B. longirostris* dominance, the energy transfer from the trophic levels studied (phytoplankton and heterotrophic bacteria) takes place mainly

through the classic food-web. Nonetheless, during periods of low phytoplankton biomass and *D. magna* dominance, the coupling between the microbial and classical food web becomes more important to the energy transfer to higher trophic levels.

11. In Albufera de Valencia, only a small proportion of the bacterial and phytoplankton biomass is consumed by zooplankton, which supports the hypothesis that top-down control is reduced in highly eutrophied shallow lakes located in the warm-temperate zone.

12. The developed biogeochemical model is able to realistically reproduce a number of relevant variables for the ecosystem (such as chlorophyll-*a*, nitrate, ammonium, total nitrogen and total phosphorus), while taking into account the uncertainty associated to the external forcing functions.

13. The sensitivity analysis indicates that the correct characterization of the growth strategies of phytoplankton groups, as well as the settling rates, is essential for the development of a model that is credible as a management tool.

14. The scenario analysis illustrates that the external nitrogen and phosphorus loadings are the main factor modulating the response of phytoplankton in the lake, which suggests that their control should be set as the first priority of local management plans directed to improve the trophic state of the lake.

15. Likewise, the dilution effect of cyanobacteria biomass in the February-March period, associated to the high lake water renewal rates, indicates that the manipulation of the flushing rate of the lagoon just before the propitious time for macrophyte development, can constitute an efficient management tool for its restoration. These results are further supported by the decrease in primary production observed in winter.



**Bibliografía referente a la**  
**Introducción y**  
**Los capítulos V y VI**



- Aas, P., Lyons, M.M., Pledger, R., Mitchell, D.L., Jeffrey, W.H. 1996. Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquatic Microbial Ecology* 11: 229-238.
- Abrantes, N., Nogueira, A., Goncalves, F. 2009. Short-term dynamics of cladocerans in a eutrophic shallow lake during a shift in the phytoplankton dominance. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* 45: 237-245.
- Agasild, H. & Nøges, T. 2005. Cladoceran and rotifer grazing on bacteria and phytoplankton in two shallow eutrophic lakes: in situ measurement with fluorescent microspheres. *Journal of Plankton Research* 27: 1155-1174.
- Alonso, M. 1996. *Fauna Ibérica. Vol. 7. Crustacea, Branchiopoda*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. 486 pp.
- Arhonditsis, G.B., Adams-Vanharn, B.A., Nielsen, L., Stow, C.A., Reckhow, K.H. 2006. Evaluation of the current state of mechanistic aquatic biogeochemical modeling: citation analysis and future perspectives. *Environmental Science & Technology* 40: 6547-6554.
- Arhonditsis, G.B. & Brett, M.T. 2004. Evaluation of the current state of mechanistic aquatic biogeochemical modeling. *Marine Ecology Progress Series* 271: 13-26.
- Arhonditsis, G.B. & Brett, M.T. 2005. Eutrophication model for Lake Washington (USA) Part I. Model description and sensitivity analysis. *Ecological Modelling* 187: 140-178.
- Arhonditsis, G.B. & Brett, M.T. 2005. Eutrophication model for Lake Washington (USA) Part II - model calibration and system dynamics analysis. *Ecological Modelling* 187: 179-200.
- Arhonditsis, G.B., Stow, C.A., Rao, Y.R., Perhar, G. 2014. What has been accomplished twenty years after the Oreskes et al. (1994) critique? Current state and future perspectives of environmental modeling in the Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research* 40: Supplement 3, 1-7.
- Auer, B., Elzer, U., Arndt, H. 2004. Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resource and predation. *Journal of Plankton Research* 26: 697-709.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., Thingstad, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 10: 257-263.
- Baines, S.B. & Pace, M.L. 1991. The production of dissolved organic-matter by phytoplankton and its importance to bacteria - patterns across marine and fresh-water systems *Limnology and Oceanography* 36: 1078-1090.
- Bell, R.T., Ahlgren, G.M., Ahlgren, I. 1983. Estimating bacterioplankton production by measuring [3H] thymidine incorporation in a eutrophic Swedish lake. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1709-1721.
- Benet, J.M. 1982. *El proyecto del canal perimetral al sur de la Albufera de Valencia*, en: Moliner, J.M., Alonso, J.J., Rosello, J., Samo, A.J., Garay, E., Gil Corell,



- 
- Costa, M., Feltrer, E., Benet, J.M. (Eds), *Jornadas sobre la problemática de La Albufera*, Diputación provincial de Valencia, Valencia. 134 pp.
- Bird, D.F. & Kalff, J. 1984. Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41: 1015-1023.
- Blanco, C. 1974. *Estudio de la contaminación de la Albufera de Valencia y de los efectos de dicha contaminación sobre la fauna y flora del lago*. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España.
- Blindow, I., Hargeby, A., Meyercordt, J., Schubert, H. 2006. Primary production in two shallow lakes with contrasting plant form dominance: A paradox of enrichment? *Limnology and Oceanography* 51: 2711-2721.
- Calvo-Díaz, A. & Morán, X.a.G. 2009. Empirical leucine-to-carbon conversion factors for estimating heterotrophic bacterial production: Seasonality and predictability in a temperate coastal ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3216-3221.
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.H. 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications* 8: 559-568.
- Carrasco, J. M., Planta, M. 1985. Contaminación de la Albufera de Valencia por plaguicidas utilizados en el cultivo del arroz. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos* 25: 144-148.
- Cerco, C.F., Cole, T.M. 1994. *CE-QUAL-ICM: A 3-dimensional eutrophication model, version 1.0. User's Guide*. US Army Corps of Engineers Waterways Experiments Station, Vicksburgh, MS, USA.
- Chin-Leo, G. & Benner, R. 1991. Dynamics of bacterioplankton abundance and production in seagrass communities of a hypersaline lagoon. *Marine Ecology Progress Series* 73: 219.
- Chin-Leo, G. & Kirchman, D.L. 1988. Estimating bacterial production in marine waters from the simultaneous incorporation of thymidine and leucine *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1934-1939.
- Cole, J.J., Findlay, S., Pace, M.L. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series* 43: 1-10.
- Cole, J.J., Likens, G.E., Strayer, D.L. 1982. Photosynthetically produced dissolved organic carbon: an important carbon source for planktonic bacteria *Limnology and Oceanography* 27: 1080-1090.
- Conan, P., Joux, F., Torrétón, J.-P., Pujo-Pay, M., Douki, T., Rochelle-Newall, E., Mari, X. 2008. Effect of solar ultraviolet radiation on bacterio- and phytoplankton activity in a large coral reef lagoon (southwest New Caledonia). *Aquatic Microbial Ecology* 52: 83.
- Cooke, G.D., Welch, E. B., Peterson, S. A., Newroth, P. R. 1986. *Lake and Reservoir Restoration*. Butterworth Publishers, Stoneham, MA, USA. 392 pp.

- Coops, H., Beklioglu, M., Crisman, T.L. 2003. The role of water-level fluctuations in shallow lake ecosystems—workshop conclusions. *Hydrobiologia* 506: 23-27.
- Daily, G. 1997. *Nature's services: societal dependence on natural ecosystems*. Island Press, Washington, DC, USA. 412 pp.
- Dafauce, C. 1975. La Abufera de Valencia. Un estudio piloto. *Monografías ICONA* 4: 1–127.
- Demott, W.R. 1982. Feeding selectivities and relative ingestion rates of *Daphnia* and *Bosmina*. *Limnology and Oceanography* 27: 518-527.
- Demott, W.R., Gulati, R.D., Van Donk, E. 2001. *Daphnia* food limitation in three hypereutrophic Dutch lakes: evidence for exclusion of large-bodied species by interfering filaments of cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* 46: 2054-2060.
- Dodds, W.K., Bouska, W.W., Eitzmann, J.L., Pilger, T.J., Pitts, K.L., Riley, A.J., Schloesser, J.T., Thornbrugh, D.J. 2008. Eutrophication of US freshwaters: analysis of potential economic damages. *Environmental Science & Technology* 43: 12-19.
- Downing, J. A., Rigler, F. H. 1984. *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in freshwaters* (2a ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. 358 pp.
- Downing, J.A., Prairie, Y.T., Cole, J.J., Duarte, C.M., Tranvik, L.J., Striegl, R.G., McDowell, W.H., Kortelainen, P., Caraco, N.F., Melack, J.M., Middelburg, J.J. 2006. The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnology and Oceanography* 51: 2388-2397.
- Dröscher, I., Finlay, K., Patoine, A., Leavitt, P.R. 2008. *Daphnia* control of the spring clear-water phase in six polymictic lakes of varying productivity and size. *International Association of Theoretical and Applied Limnology – Proceedings* 30: 186-190.
- Fasham, M., Ducklow, H., Mckelvie, S. 1990. A nitrogen-based model of plankton dynamics in the oceanic mixed layer. *Journal of Marine Research* 48: 591-639.
- Fouilland, E. & Mostajir, B. 2010. Revisited phytoplanktonic carbon dependency of heterotrophic bacteria in freshwaters, transitional, coastal and oceanic waters. *Fems Microbiology Ecology* 73: 419-429.
- Fuhrman, J.A. & Azam, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: Evaluation and field results. *Marine Biology* 66: 109-120.
- Gao, G., Qin, B., Sommaruga, R., Psenner, R. 2007. The bacterioplankton of Lake Taihu, China: abundance, biomass, and production. *Hydrobiologia* 581: 177-188.
- Gasol, J.M., Doval, M.D., Pinhassi, J., Calderón-Paz, J.I., Guixa-Boixareu, N., Vaqué, D., Pedrós-Alió, C. 1998. Diel variations in bacterial heterotrophic activity and growth in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* 164: 107-124.

- 
- Gasol, J.M., Pinhassi, J., Alonso-Saez, L., Ducklow, H., Herndl, G.J., Koblizek, M., Labrenz, M., Luo, Y., Moran, X.a.G., Reinthaler, T., Simon, M. 2008. Towards a better understanding of microbial carbon flux in the sea. *Aquatic Microbial Ecology* 53: 21-38.
- Gliwicz, Z.M. & Lampert, W. 1990. Food thresholds in *Daphnia* species in the absence and presence of blue-green filaments. *Ecology*: 691-702.
- Gulati, R.D. & van Donk, E. 2002. Lakes in the Netherlands, their origin, eutrophication and restoration: state-of-the-art review. *Hydrobiologia* 478: 73–106.
- Haberman, J. & Haldna, M. 2014. Indices of zooplankton community as valuable tools in assessing the trophic state and water quality of eutrophic lakes: long term study of lake Võrtsjärv. *Journal of Limnology* 73: 263-273.
- Haberman, J., Laugaste, R., Nõges, T. 2007. The role of cladocerans reflecting the trophic status of two large and shallow Estonian lakes. *Hydrobiologia* 584: 157-166.
- Harding, W.R. 1997. Phytoplankton primary production in a shallow, well-mixed, hypertrophic South African lake. *Hydrobiologia* 344: 87-102.
- Hasler, A.D. 1947. Eutrophication of lakes by domestic drainage. *Ecology* 28: 383-395.
- Havens, K.E., Beaver, J.R., East, T.L. 2007. Plankton biomass partitioning in a eutrophic subtropical lake: comparison with results from temperate lake ecosystems. *Journal of Plankton Research* 29: 1087-1097.
- Hilt, S., Gross, E.M., Hupfer, M., Morscheid, H., Mählmann, J., Melzer, A., Poltz, J., Sandrock, S., Scharf, E.-M., Schneider, S. 2006. Restoration of submerged vegetation in shallow eutrophic lakes—A guideline and state of the art in Germany. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters* 36: 155-171.
- Hoppe, H.G., Gocke, K., Koppe, R., Kraus, G. 2006. Changing bacterioplankton growth characteristics on a large spatial scale: oligotrophic versus mesotrophic ocean. *Marine Ecology Progress Series* 323: 21–33.
- Ibelings, B.W., Portielje, R., Lammens, E.H., Noordhuis, R., Van Den Berg, M.S., Joosse, W., Meijer, M.L. 2007. Resilience of alternative stable states during the recovery of shallow lakes from eutrophication: Lake Veluwe as a case study. *Ecosystems* 10: 4-16.
- Jayaweera, M. & Asaeda, T. 1995. Impacts of environmental scenarios on chlorophyll-a in the management of shallow, eutrophic lakes following biomanipulation: An application of a numerical model. *Ecological Engineering* 5: 445-468.
- Jeppesen, E., Jensen, J.P., Søndergaard, M., Lauridsen, T., Pedersen, L.J., Jensen, L. 1997. Top-down control in freshwater lakes: the role of nutrient state, submerged macrophytes and water depth. *Hydrobiologia*: 342/343: 151-164.
- Jeppesen, E., Meerhoff, M., Jacobsen, B., Hansen, R., Søndergaard, M., Jensen, J., Lauridsen, T., Mazzeo, N., Branco, C. 2007. Restoration of shallow lakes by

- nutrient control and biomanipulation—the successful strategy varies with lake size and climate. *Hydrobiologia* 581: 269-285.
- Jeppesen, E., Søndergaard, M., Meerhoff, M., Lauridsen, T.L., Jensen, J.P. 2007. Shallow lake restoration by nutrient loading reduction—some recent findings and challenges ahead. *Hydrobiologia* 584: 239-252.
- Jørgensen, N.O.G. 1992. Incorporation of H<sup>3</sup>-Leucine and H<sup>3</sup>-Valine into protein of fresh-water bacteria- field applications. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3647-3653.
- Jørgensen, S. E., Bendoricchio, G. E. 2001. *Fundamentals of ecological modelling* (3<sup>rd</sup> ed.). Elsevier Publications, New York, NY, USA. 530 pp.
- Jørgensen, S. E. 2002. *Integration of ecosystem theories: a pattern* (3<sup>rd</sup> ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.
- Kamjunke, N., Benndorf, A., Wilbert, C., Opitz, M., Kranich, J., Bollenbach, M., Benndorf, J. 1999. Bacteria ingestion by *Daphnia galeata* in a biomanipulated reservoir: a mechanism stabilizing biomanipulation? *Hydrobiologia* 403: 109-121.
- Kamjunke, N., Boing, W., Voigt, H. 1997. Bacterial and primary production under hypertrophic conditions. *Aquatic Microbial Ecology* 13: 29-35.
- Kisand, V. & Nøges, T. 1998. Seasonal dynamics of bacterio- and phytoplankton in large and shallow eutrophic Lake Võrtsjärv, Estonia. *International Review of Hydrobiology* 83: 205-216.
- Kirchman, D., Knees, E., Hodson, R. 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 599-607.
- Kisand, V., Nøges, T., Zingel, P. 1998. Diel dynamics of bacterioplankton activity in eutrophic shallow Lake Võrtsjärv, Estonia. *Hydrobiologia* 380: 93-102.
- Lampert, W. 1982. Further studies on the inhibitory effect of the toxic blue-green *Microcystis aeruginosa* on the filtering rate of zooplankton. *Archiv für Hydrobiologie* 95: 207-220.
- Lampert, W. 1987. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 483-490.
- Lampert, W., Fleckner, W., Rai, H., Taylor, B.E. 1986. Phytoplankton control by grazing zooplankton: a study on the spring clear-water phase. *Limnology and Oceanography* 31: 478-490.
- Liboriussen, L. & Jeppesen, E. 2003. Temporal dynamics in epipelagic, pelagic and epiphytic algal production in a clear and a turbid shallow lake. *Freshwater Biology* 48: 418-431.
- Liu, Y., Wang, Y., Sheng, H., Dong, F., Zou, R., Zhao, L., Guo, H., Zhu, X., He, B. 2014. Quantitative evaluation of lake eutrophication responses under alternative water diversion scenarios: a water quality modeling based statistical analysis approach. *Science of the total Environment* 468: 219-227.

- 
- Martín, M., Oliver, N., Hernández-Crespo, C., Gargallo, S., Regidor, M. 2013. The use of free water surface constructed wetland to treat the eutrophicated waters of lake L'Albufera de Valencia (Spain). *Ecological Engineering* 50: 52-61.
- Mao, J., Chen, Q., Chen, Y. 2008. Three-dimensional eutrophication model and application to Taihu Lake, China. *Journal of Environmental Sciences* 20: 278-284.
- Mcneary, W.W. & Erickson, L.E. 2013. Sustainable Management of Algae in Eutrophic Ecosystems. *Journal of Environmental Protection* 4: 9-19.
- Meerhoff, M., Jeppesen, E. 2009. *Shallow lakes and ponds*, in: Likens, G.E. (Ed.). *Encyclopedia of Inland Waters*, Vol. 2. Elsevier, Oxford, Reino Unido, pp. 645-655.
- Miracle, M., García, M., Vicente, E. 1984. Heterogeneidad espacial de las comunidades fitoplanctónicas de la Albufera de Valencia. *Limnetica* 1: 20-31.
- Miracle, M.R. & Sahuquillo, M. 2002. Changes of life-history traits and size in *Daphnia magna* during a clear-water phase in a hypertrophic lagoon (Albufera of Valencia, Spain). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 28: 1203-1208.
- Miracle, M.R., Sahuquillo, M., Alfonso, T., Sendra, MD. 2012. *Las fases claras a l'Albufera: una via per la seua recuperació*, en: Català, J. (Ed.), *La Universitat de València i els seus entorns naturals: els parcs naturals de l'Albufera, el Túria i la Serra Calderona*. Universitat de València, València, pp. 96-99.
- Miracle, M.R., Vicente, E., Sarma, S., Nandini, S. 2014. Planktonic rotifer feeding in hypertrophic conditions. *International Review of Hydrobiology* 99: 141-150.
- Møller, E.F. 2005. Sloppy feeding in marine copepods: prey-size-dependent production of dissolved organic carbon. *Journal of Plankton Research* 27: 27-35.
- Moss, B., Stephen, D., Alvarez, C., Becares, E., Bund, W.V.D., Collings, S., Donk, E.V., Eyto, E.D., Feldmann, T., Fernández-Aláez, C. 2003. The determination of ecological status in shallow lakes—a tested system (ECOFRAME) for implementation of the European Water Framework Directive. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 13: 507-549.
- Moss, B., Stephen, D., Balayla, D., Bécares, E., Collings, S., Fernández-Aláez, C., Fernández-Aláez, M., Ferriol, C., García, P., Gomá, J. 2004. Continental-scale patterns of nutrient and fish effects on shallow lakes: synthesis of a pan-European mesocosm experiment. *Freshwater Biology* 49: 1633-1649.
- Moustaka-Gouni, M., Vardaka, E., Michaloudi, E., Kormas, K.A., Tryfon, E., Mihalatou, H., Gkelis, S., Lanaras, T. 2006. Plankton food web structure in a eutrophic polymictic lake with a history of toxic cyanobacterial blooms. *Limnology and Oceanography* 51: 715-727.
- Nandini, S., Miracle, M.R., Vicente, E., Sarma, S.S.S., Gulati, R.D. Effect of cyanobacterial extracts on the demography of cladocerans (*Moina* cf. *micrura*)

- and *Diaphanosoma lacustris*) from L'Albufera Lake, Spain. *Hydrobiologia*, en revisión.
- Nôges, T. & Nôges, P. 1999. The effect of extreme water level decrease on hydrochemistry and phytoplankton in a shallow eutrophic lake. *Hydrobiologia*: 408/409, 277-283.
- Oliver, R.L., Whittington, J., Lorenz, Z., Webster, I.T. 2003. The influence of vertical mixing on the photoinhibition of variable chlorophyll a fluorescence and its inclusion in a model of phytoplankton photosynthesis. *Journal of Plankton Research* 25: 1107-1129.
- Oltra, R. & Miracle, M. 1984. Comunidades zooplanctónicas de la Albufera de Valencia. *Limnetica* 1: 51-61.
- Olvera-Ramírez, R., Centeno-Ramos, C., Martínez-Jerónimo, F. 2010. Efectos tóxicos de *Pseudanabaena tenuis* (Cyanobacteria) en los cladóceros *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia*. *Hidrobiologica* 20: 203-212.
- Ozimek, T., Gulati, R.D., Van Donk, E. 1990. Can macrophytes be useful in biomanipulation of lakes? The Lake Zwemlust example. Biomanipulation Tool for Water Management. *Developments in Hydrobiology* 61: 339-407.
- Padisak, J., Kohler, J., Hoeg, S. 1999. *The effect of changing flushing rates on development of late summer Aphanizomenon and Microcystis populations in a shallow lake, Muggelsee, Berlin, Germany*, en: Tundisi, J.G., Straskraba, M. (Eds.), Theoretical reservoir ecology and its applications. Backhuys Publishers, São Carlos, Brasil, pp. 411-423.
- Panosso, R. & Lürling, M. 2010. *Daphnia magna* feeding on *Cylindrospermopsis raciborskii*: the role of food composition, filament length and body size. *Journal of Plankton Research* 32: 1393-1404.
- Pardo, L. 1942. *La Albufera de Valencia. Biología de las aguas continentales II*. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, Madrid, España. 263 pp.
- Petit, M., Servais, P., Lavandier, P. 1999. Bacterial production measured by leucine and thymidine incorporation rates in French lakes. *Freshwater Biology* 42: 513-524.
- Planta, M. & Carrasco, J. 1985. Contaminación de la Albufera de Valencia por plaguicidas utilizados en el cultivo del arroz. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos* 25: 144-148.
- Pomeroy, L.R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience* 24: 499-504.
- Postel, S., Carpenter, S. 1997. *Freshwater ecosystem services*, in: Daily, G. (Ed), Nature's services: Societal dependence on natural ecosystems. Island Press, Washington, DC, USA, pp. 195-214.
- Pugnetti, A., Del Negro, P., Giani, M., Acri, F., Aubry, F.B., Bianchi, F., Berto, D., Valeri, A. 2010. Phytoplankton-bacterioplankton interactions and carbon fluxes through microbial communities in a microtidal lagoon. *Fems Microbiology Ecology* 72: 153-164.

- 
- Robarts, R.D. 1988. Heterotrophic bacterial activity and primary production in a hypertrophic African lake. *Hydrobiologia* 162: 97-107.
- Robarts, R.D., Arts, M.T., Evans, M.S., Waiser, M.J. 1994. The coupling of heterotrophic bacterial and phytoplankton production in a hypertrophic, shallow prairie lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 2219-2226.
- Rochelle-Newall, E., Torretón, J.-P., Mari, X., Pringault, O. 2008. Phytoplankton-bacterioplankton coupling in a subtropical South Pacific coral reef lagoon. *Aquatic Microbial Ecology* 50: 221.
- Rodrigo, M.A. & Alonso-Guillén, J.L. 2013. Assessing the potential of Albufera de València Lagoon sediments for the restoration of charophyte meadows. *Ecological Engineering* 60: 445-452.
- Romo, S., García-Murcia, A., Villena, M.J., Sánchez, V., Ballester, A. 2008. Tendencias del fitoplancton en el lago de la Albufera de Valencia e implicaciones para su ecología, gestión y recuperación. *Limnetica* 27: 11-28.
- Romo, S. & Miracle, M.R. 1994. Population dynamics and ecology of subdominant phytoplankton species in a shallow hypertrophic lake (Albufera of Valencia, Spain). *Hydrobiologia* 273: 37-56.
- Romo, S., Villena, M.J., Sahuquillo, M., Soria, J.M., Gimenez, M., Alfonso, T., Vicente, E., Miracle, M.R. 2005. Response of a shallow Mediterranean lake to nutrient diversion: does it follow similar patterns as in northern shallow lakes? *Freshwater Biology* 50: 1706-1717.
- Ruiz-González, C., Lefort, T., Massana, R., Simó, R., Gasol, J.M. 2012. Diel changes in bulk and single-cell bacterial heterotrophic activity in winter surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* 57: 29-42.
- Ruiz-González, C., Simó, R., Sommaruga, R., Gasol, J.M. 2013. Away from darkness: a review on the effects of solar radiation on heterotrophic bacterioplankton activity. *Frontiers in microbiology* 4, 131.
- Sahuquillo, M., Melão, M., Miracle, M. 2007. Low filtering rates of *Daphnia magna* in a hypertrophic lake: laboratory and in situ experiments using synthetic microspheres. *Hydrobiologia* 594: 141-152.
- Scheffer, M., Houser, S.H., Meijer, M.L., Moss, B., Jeppesen, E. 1993. Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 275-279.
- Scheffer, M. 2004. *Ecology of shallow lakes. Population and community biology series 22*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 363 pp.
- Schelske, C.L., Aldridge, F.J., Carrick, H.J., Coveney, M.F. 2003. Phytoplankton community photosynthesis and primary production in a hypereutrophic lake, Lake Apopka, Florida. *Archiv für Hydrobiologie* 157: 145-172.
- Schindler, D. 1977. Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science* 195: 260-262.

- Schoenberg, S.A. 1989. Effects of algal concentration, bacterial size and water chemistry on the ingestion of natural bacteria by cladocerans. *Journal of Plankton Research* 11: 1273-1295.
- Seitzinger, S.P. 1988. Denitrification in fresh-water and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography* 33: 702-724.
- Sherr, E.B. & Sherr, B.F. 1988. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. *Limnology and Oceanography* 33: 1225-1227.
- Simon, M. 1994. Diel variability of bacterioplankton biomass production and cell multiplication in Lake Constance. *Archiv für Hydrobiologie* 130: 283-302.
- Smith, V.H. 2003. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research* 10: 126-139.
- Smith, D.C. & Azam, F. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Marine Microbial Food Webs* 6: 107-114.
- Smith, V.H., Joye, S.B., Howarth, R.W. 2006. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography* 51: 351-355.
- Somlyódy, L., Straten, G. V. 1986. *Modeling and managing shallow lake eutrophication: with application to Lake Balaton*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 386 pp.
- Sommaruga, R. 1995. Microbial and classical food webs: A visit to a hypertrophic lake. *Fems Microbiology Ecology* 17: 257-270.
- Sommaruga, R. & Robarts, R.D. 1997. The significance of autotrophic and heterotrophic picoplankton in hypertrophic ecosystems. *Fems Microbiology Ecology* 24: 187-200.
- Sommer, U., Gliwicz, Z.M., Lampert, W., Duncan, A. 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv für Hydrobiologie* 106: 433-471.
- Søndergaard, M. 1993. Organic carbon pools in two Danish lakes: flow of carbon to bacterioplankton. *Verhandlungen/Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*: 593-598.
- Søndergaard, M., Jensen, J.P., Jeppesen, E. 2003. Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia* 506-509: 135-145.
- Søndergaard, M., Jensen, J.P., Jeppesen, E. 2005. Seasonal response of nutrients to reduced phosphorus loading in 12 Danish lakes. *Freshwater Biology* 50: 1605-1615.
- Søndergaard, M., Jensen, J.P., Jeppesen, E., Møller, P.H. 2002. Seasonal dynamics in the concentrations and retention of phosphorus in shallow Danish lakes after reduced loading. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 5: 19-29.
- Soria, J.M. & E., V. 2002. Estudio de los aportes hídricos al parque natural de la Albufera de Valencia. *Limnetica* 21: 105-115.



- 
- Steeman-Nielsen, E.J. 1952. The use of radioactive carbon ( $^{14}\text{C}$ ) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 18: 117–140.
- Stow, C.A., Jolliff, J., McGillicuddy Jr, D.J., Doney, S.C., Allen, J., Friedrichs, M.A., Rose, K.A., Wallhead, P. 2009. Skill assessment for coupled biological/physical models of marine systems. *Journal of Marine Systems* 76: 4-15.
- Stow, C.A., Roessler, C., Borsuk, M.E., Bowen, J.D., Reckhow, K.H. 2003. Comparison of estuarine water quality models for total maximum daily load development in Neuse River Estuary. *Journal of Water Resources Planning and Management* 129: 307-314.
- Tammert, H., Kisand, V., Noges, T. 2005. Bacterioplankton abundance and activity in a small hypertrophic stratified lake. *Hydrobiologia*, 547: 83-90.
- Tõnno, I., Kunnap, H., Noges, T. 2003. The role of zooplankton grazing in the formation of 'clear water phase' in a shallow charophyte-dominated lake. *Hydrobiologia* 506: 353-358.
- Torréon, J.-P., Bouvy, M., Arfi, R. 1994. Diel fluctuations of bacterial abundance and productivity in a shallow eutrophic tropical lagoon. *Archiv für Hydrobiologie* 131: 79-92.
- Tóth, L.G. & Kato, K. 1997. Size-selective grazing of bacteria by *Bosmina longirostris*—an image-analysis study. *Journal of Plankton Research* 19: 1477-1493.
- Usaquén Perilla, O.L., García Gómez, A., García Gómez, A., Álvarez Díaz, C., Revilla Cortezón, J.A. 2012. Methodology to assess sustainable management of water resources in coastal lagoons with agricultural uses: An application to the Albufera lagoon of Valencia (Eastern Spain). *Ecological Indicators* 13: 129-143.
- Vicente, E. & Miracle, M. 1992. The coastal lagoon Albufera de Valencia: An ecosystem under stress. *Limnetica* 8: 87-100.
- Vicente, E., Soria, J.M., Peña, R. 2012. *Fluxos hídrics, qualitat d'aigua i heterogeneïtat espacial*, en: Català, J. (Ed.), La Universitat de València i els seus entorns naturals: els parcs naturals de l'Albufera, el Túria i la Serra Calderona. Universitat de València, València, pp. 92-95.
- Villena, M.J. & Romo, S. 2003. Phytoplankton changes in a shallow Mediterranean lake (Albufera of Valencia, Spain) after sewage diversion. *Hydrobiologia* 506: 281-287.
- Wetzel, R. 2001. *Limnology: Lake and River Ecosystems* (3<sup>rd</sup> ed.). Academic Press, San Diego, CA, USA, 1006 pp.
- Wetzel, R.G. 1990. Land-water interfaces: metabolic and limnological regulators. *Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie* 1: 6-24.
- Williams, P. 1981. Microbial contribution to overall marine plankton metabolism—direct measurements of respiration. *Oceanologica Acta* 4: 359-364.

- Winter, C., Herndl, G.J., Weinbauer, M.G. 2004. Diel cycles in viral infection of bacterioplankton in the North Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 35: 207-216.
- Work, K.A. & Havens, K.E. 2003. Zooplankton grazing on bacteria and cyanobacteria in a eutrophic lake. *Journal of Plankton Research* 25: 1301-1306.
- Wu, X., Kong, F., Zhang, M. 2011. Photoinhibition of colonial and unicellular *Microcystis* cells in a summer bloom in Lake Taihu. *Limnology* 12: 55-61.
- Yang, X.-E., Wu, X., Hao, H.-L., He, Z.-L. 2008. Mechanisms and assessment of water eutrophication. *Journal of Zhejiang university Science B* 9: 197-209.
- Zan, F., Huo, S., Xi, B., Su, J., Li, X., Zhang, J., Yeager, K.M. 2011. A 100 year sedimentary record of heavy metal pollution in a shallow eutrophic lake, Lake Chaohu, China. *Journal of Environmental Monitoring* 13: 2788-2797.





