

## **Introducció i objectius**



---

# Introducció general

## El concepte de pigments marcadors en ecologia i paleolimnologia

Els organismes fotosintètics per poder créixer necessiten energia en forma de radiació solar, carboni inorgànic en forma de diòxid de carboni o ions bicarbonat, nutrients minerals i aigua. En el curs de l'evolució, els organismes fotosintètics que s'han quedat o han retornat al medi aquàtic tenen un avantatge respecte els que viuen a la part terrestre i aquesta és la disponibilitat il·limitada d'aigua, però per contra, el medi aquàtic absorbeix i reflecteix la llum. En medis aquàtics, tant la intensitat com la qualitat espectral de la llum varien de manera marcada amb la fondària. Exceptuant en el cas de les aigües somes, la disponibilitat de llum pot esdevenir un factor limitant per a la producció primària en determinats ecosistemes. Els organismes aquàtics que fan fotosíntesi han de competir per la radiació solar no només entre ells sinó també amb els altres components del medi, biòtics i abiòtics. Aquest fet ha dut, en el curs de l'evolució, a l'adquisició per part de cadascun dels principals grups d'organismes fotosintètics de tot un conjunt característic de pigments captadors de la llum. Aquests pigments són de gran interès bioquímic en contribuir a la comprensió tant de l'adaptació d'aquests organismes al medi, com de la filogènia i taxonomia dels diferents grups (Kirk, 1994).

Els pigments dels organismes fotosintètics es classifiquen en: clorofil·les, carotenoides i biliproteïnes en funció de la seva estructura química (p.e. Rowan, 1989). En tots els organismes fotoautòtrofs la clorofil·la és el pigment fotosintètic fonamental. En les plantes vasculares es troba tant clorofil·la a com clorofil·la b, però no és així en tots els grups algals com tampoc ho és en cianobacteris ni en bacteris fotosintètics. Només els procloròfits, euglenòfits i cloròfits presenten les dues, els altres grups combinen la clorofil·la a amb la clorofil·la c. També tenen clorofil·les els microorganismes que realitzen fotosíntesi utilitzant el sulfhídric o l'hidrogen com a font d'electrons, aquestes clorofil·les són estructuralment diferents i reben el nom de bacterioclорofil·les (p.e. Oelze, 1985; Hurley i Watras, 1991). Els carotenoides són sintetitzats, com les clorofil·les i biliproteïnes, pels organismes fotosintètics tot i que es troben també àmpliament distribuïts en bacteris no fotosintètics, fongs, i animals que els ingereixen en la dieta (p.e. Goodwin, 1980; Goodwin, 1983; Pfander, 1992; Schiedt i Liaaen-Jensen, 1995). Els carotenoides es classifiquen en dos grups: els carotens i les xantofil·les. Les funcions dels carotenoides en els organismes fotosintètics són bàsicament dues: en primer lloc, capturar l'energia de la llum per a realitzar la foto-

síntesi, en aquest sentit cobreixen una part del rang de longituds d'ona en les quals no absorbeix la clorofil·la (principalment les xantofil·les); i en segon lloc, prevenir la destrucció per fotooxidació de l'aparell fotosintètic (principalment els carotens) (Siefermann-Harms, 1987). Les biliproteïnes són proteïnes conjugades que també intervenen en el procés de captació de l'energia de la llum per a realitzar la fotosíntesi. Contenen una o més ficobilines com a grup prostètic i es troben en els cianobacteris, rodòfits i alguns criptòfits (Rowan, 1989). Els quatre grans grups de biliproteïnes són: la ficocianina, l'al·loficocianina, la ficoeritrina i la ficoeritrocianina. L'espectre d'absorció de les biliproteïnes se situa en la zona dels 550-660 nm. Per analitzar aquest grup de pigments cal utilitzar tècniques d'extracció diferents de les descrites en aquest treball ja que es tracta de pigments solubles en aigua. Aquests pigments sembla ser es destrueixen abans de ser incorporats en el sediment en les fases inicials de descomposició dels organismes, per la qual cosa encara no s'han utilitzat en paleolimnologia i no han estat considerats en aquest treball.

## Marcadors taxonòmics

La contribució com a marcador taxonòmic de cadascun dels tres grups de pigments descrits és ben diferent essent els carotenoides i particularment les xantofil·les el grup més diversificat i per tant el més indicat per trobar-hi marcadors més específics. La taula I mostra la distribució dels pigments i d'alguns productes d'alteració de les clorofil·les amb més interès taxonòmic en les diferents classes d'algues, cianobacteris i també en bacteris fotosintètics. Dins els carotenoides que es poden trobar més habitualment en els estanys, l'al·loxantina juntament amb el  $\beta,\epsilon$ -carotè són marcadors de criptòfits; la peridinina, dinoxantina i diadinoxantina ho són de dinoflagel·lades; la fucoxantina i diadinoxantina de diatomees i crisòfits; la diatoxantina de diatomees; la luteïna, neoxantina i alguns dels components del cicle de les xantofil·les (violaxantina i zeaxantina) són marcadors de cloròfits; la mixoxantofil·la, equinenona, zeaxantina i per a algunes espècies l'oscil·laxantina, són marcadors de cianobacteris. El  $\beta,\beta$ -carotè es troba en totes les classes algals llevat de rodòfits i criptòfits on només apareix ocasionalment en algunes espècies, per aquest motiu és d'escassa informació taxonòmica. Les bacterioclorofil·les també van acompanyades per uns carotenoides característics. Els bacteris fotosintètics vermells (Rhodospirillaceae) contenen bacterioclorofil·la a (BChl-a) i de vegades BChl-b associades amb carotenoides de la sèrie de l'espiril·loxantina. Els bacteris fotosintètics vermells del sofre (Chromatiaceae) contenen BChl-a associada amb carotenoides de la sèrie de l'oquenona o del rodopinal. Els bacteris fotosintètics verds del sofre (Chlorobiaceae) tenen diverses bacterioclorofil·les: BChl-c, -d, o -e, associades amb clorobactè en el cas de les BChl-c i -d (varietats verdes) o bé associades amb isorenieratè en el cas de la BChl-e (varietats brunes).

Els pigments s'han utilitzat com a marcadors taxonòmics per reconstruir canvis en la composició de grups algals sobretot en sistemes marins (p.e. Jeffrey *et al.*, 1997; Latasa i Bidigare, 1998; Schlüter *et al.*, 2000; Breton *et al.*, 2000; Riegman i Kraay, 2001; Ediger *et al.*, 2001); però també en sistemes aquàtics continentals principalment en llacs relativament productius (p.e. Steenbergen i Korthals, 1982; Wilhelm *et al.*, 1991; Soma *et al.*, 1993; Fietz i

Nicklisch, 2004), en canvi no han estat tan utilitzats en llacs oligotròfics (Descy *et al.*, 2000).

### **Altres valors dels pigments com a indicadors**

Els pigments fotosintètics presenten molts dobles enllaços en la seva estructura, fet que els fa molt susceptibles a alteracions de la molècula. Això fa que en els sediments dels llacs també es trobin compostos derivats dels pigments més comuns que s'han format per degradació de les molècules originals i que també es poden utilitzar com a indicadors dels processos que els han originat. Els pigments es degraden tant a la columna d'aigua, (Leavitt, 1993; Steenbergen *et al.*, 1994; Cuddington i Leavitt, 1999) com després de la deposició en els sediments (Hurley i Armstrong, 1990; Hodgson *et al.*, 1998). La degradació de pigments a la columna d'aigua és normalment molt ràpida i extensiva (> 95% de tots els compostos; vida mitjana de dies) i inclou l'oxidació mediada químicament i microbiològica (Leavitt i Carpenter, 1990a), l'herbivorisme produït pels invertebrats (McLeroy-Etheridge i McManus, 1999; Poister *et al.*, 1999; Pandolfini *et al.*, 2000), la degradació bacteriana (Leavitt i Carpenter, 1990b), la lisi cel·lular i el metabolisme enzimàtic durant la senescència (Louda *et al.*, 1998). Tots aquests processos interaccionen de manera complexa per regular la quantitat i la composició del conjunt de pigments del sediment superficial (Cuddington i Leavitt, 1999). La degradació de pigments en el sediment és sovint menys ràpida, particularment sota condicions d'anòxia (Hurley i Armstrong, 1990), però també depèn de la presència de llum i de la bioturbació produïda per alguns invertebrats (Leavitt i Carpenter, 1989).

Les característiques moleculars dels processos de degradació difereixen entre clorofil·les i carotenoides. Els carotenoides passen a cis-carotenoides i després a productes incoloros per trencament del sistema conjugat fins que només queden menys de set dobles enllaços conjugats (Britton *et al.*, 1995). En canvi, les clorofil·les es degraden a feofitines quan perden l'àtom de  $Mg^{2+}$  de l'anell tetrapirròlic, i a feofòrbids quan a més a més de l'àtom de  $Mg^{2+}$  també perden la cadena de fitol i alguns grups laterals (Hendry *et al.*, 1987; Scheer, 1991). La presència de feopigments és indicadora de poblacions senescentes.

Altres valors dels pigments com a indicadors estan relacionats amb la funció fotoprotectora d'alguns carotenoides, tant en el rang del visible com en el rang de la llum ultraviolada amb pigments específics com la escitonemina (p.e. Laurion *et al.*, 2002; Hodgson *et al.*, 2004). El valor d'aquesta informació també es troba en el càlcul de la proporció entre els pigments amb diferents funcions dins la cèl·lula, fotosíntesi respecte fotoprotecció, que pot donar informació sobre respostes de fotoaclimatació (Eisner *et al.*, 2003).

INTRODUCCIÓ GENERAL I OBJECTIUS

**Taula I.** Distribució dels pigments en les divisions i classes algals a partir de diverses fonts (Liaaen-Jensen, 1964; Goodwin, 1980; Rowan, 1989; van den Hoek *et al.*, 1995; Jeffrey *et al.*, 1997). La mida del símbol indica la concentració del pigment. Símbols plens indiquen que el pigment apareix regularment en el grup, símbols buits indiquen que el pigment hi és ocasional.

	Rhodospirillaceae	Chromatiaceae (bacteris vermells del sofre)	Chlorobiaceae (bacteris verds del sofre)	Chlorobiaceae (bacteris bruns del sofre)	Cyanobacteria	Prochlorophyta	Rhodophyta	Heterokontophyta/Chrysiophyceae i Synurophyceae	Heterokontophyta/Xanthophyceae	Heterokontophyta/Eustigmatophyceae	Heterokontophyta/Bacillariophyceae	Heterokontophyta/Raphidophyceae	Heterokontophyta/Dictyochophyceae	Heterokontophyta/Phaeophyceae	Haptophyta	Cryptophyta	Dinophyta	Euglenophyta	Chlorophyta/Prasinophyceae	Chlorophyta/Chlorophyceae i Charophyceae
<b>Clorofil·les</b>																				
Chl a					●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Chl b						●														●
Chl c1								●	●		●	●	1	●	●		4	●		●
Chl c2	8							●	●		●	●	1	●	●	●	●		1	
Chl c3								●		2		1	●	●					1	
<b>Ficobilines</b>																				
Ficocianina					●		●										●			
Al·loficocianina					●		●													
Ficoeritrina					●		●										●			
Ficobilisomes					●		●													
<b>Bacteriolorofil·les</b>																				
Bacteriolorofi·la a	●	●																		
Bacteriolorofi·la b	●																			
Bacteriolorofi·la c			●																	
Bacteriolorofi·la d			●																	
Bacteriolorofi·la e				●																

**Productes de degradació de les clorofil·les**

Feofitina a	detritus de plantes i algues
Feofitina b	detritus de plantes terrestres
Feofòrbid a	femes de zooplàncton
Feofòrbid b	detritus de plantes terrestres, femes protozous
Clorofil·lida a	diatomees, teixits senescents, artefacte de l'extracció

1= chl c no especificada.

2= algunes diatomees tenen chl c3 enlloc de c1.

3= ocasionalment fucoxantina enlloc de peridina degut a la presència d'una alga endosimbiont.

4= ocasionalment degut a la presència d'una alga endosimbiont.

5= producte del metabolisme en alguns invertebrats herbívors.

6= en espècies marines.

7= en espècies bentòniques

8= Chl-c2 absent en les Sinurofícies (Andersen i Mulkey,1983);

Taula I. Continuació

Carotenoides	Rhodospirillaceae	Chromatiaceae (bacteris vermells del sofre)	Chlorobiaceae (bacteris verds del sofre)	Chlorobiaceae (bacteris bruns del sofre)	Cyanobacteria	Prochlorophyta	Rhodophyta	Heterokontophyta/Chrysophyceae i Synurophyceae	Heterokontophyta/Xanthophyceae	Heterokontophyta/Eustigmatophyceae	Heterokontophyta/Bacillariophyceae	Heterokontophyta/Raphidophyceae	Heterokontophyta/Dictyochophyceae	Heterokontophyta/Phaeophyceae	Haptophyta	Cryptophyta	Dinophyta	Euglenophyta	Chlorophyta/Prasinophyceae	Chlorophyta/Chlorophyceae i Charophyceae
Afanizofil·la					○															
Al·loxantina																●				
Anteraxantina						○	●	○	○	●			○							●
Astaxantina 5									○	○							○			○
β,ε-carotè						●	○	○	○	○			○	●	●				○	○
β,β-carotè					●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Cantaxantina 5					●				●											
Clorobactè		●																		
α-criptoxantina						○		●												
β-criptoxantina					●	●	○	●	●	●									●	○
Diadinoxantina								○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○
Diatoxantina									●	●	●	●	○	○					●	
Dinoxantina											●									
Equinona					●	○			●						●					
Escitonemina 7					●															
Esferoidè	●																			
Espiriloxantina	●																			
Fucoxantina								○		●	6	●	●	●	3					
Giroxantina																	○			
β-isorenieratè			●																	
Isorenieratè				●																
Luteïna							○					●							●	●
Mixoxantofil·la					●															
Neoxantina					○		○	●	●	●	●		○				○	●	●	
Nostoxantina					○															
Oquenona		●																		
Oscil·laxantina					●															
Peridina																	●			
Prasinoxantina																			○	
Pirroxantina																	○			
Rodopina		●																		
Sifonaxantina																			●	○
Vaucherixantina									●	●										
Violaxantina						●	○		●	●	6		●						●	●
Zeaxantina					●	●	●	○	○	●	6		●		●	●		●	●	●

## Indicadors en paleolimnologia

Els indicadors (*proxies*) en paleolimnologia proporcionen informació a partir de la qual es poden inferir canvis paleoambientals. Els indicadors d'origen biològic més utilitzats en paleolimnologia han estat les restes de pol·len (Bennett i Willis, 2001), diatomees (Battarbee *et al.*, 2001), estomatocists de crisòfits (Zeeb i Smol, 2001), cladòcers (Korhola i Rautio, 2001), quironòmids (Walker, 2001) i els indicadors orgànics (bioindicadors) geoquímics (Meyers, 1997).

Molts d'aquests bioindicadors geoquímics es troben en la quantitat i composició de la matèria orgànica dels sediments dels llacs. Entre els més utilitzats hi ha la concentració i taxes d'acumulació de carboni orgànic (p.e. Hodell i Schelske, 1998), el quocient  $C_{orgànic}/N_{total}$  (p.e. Kaushal i Binford, 1999), la composició d'isòtops estables de carboni (p.e. Hodell i Schelske, 1998) i nitrògen (p.e. Hodell i Schelske, 1998; Teranes i Bernasconi, 2000), els bioindicadors moleculars (Meyers, 2003 i referències citades) i l'índex d'hidrogen (HI) (p.e. Ariztegui *et al.*, 2001).

Els bioindicadors moleculars són compostos que caracteritzen molt específicament determinades fonts biòtiques i que retenen la seva identitat després de quedar enterrats en els sediments, fins i tot després de patir alteracions parcials. Els pigments dels organismes fotosintètics i particularment els carotenoides, són uns dels bioindicadors moleculars utilitzats en estudis paleolimnològics (p.e. Sanger, 1988). Els pigments indicadors, un cop dipositats en el sediment del llac, constituïran amb el temps l'únic registre fòssil de les comunitats d'organismes fotosintètics amb estructures toves que creixien en el passat en el llac. Altres bioindicadors moleculars amb un nivell de resolució diferent són els n-alkans, esterols, àcids grassos insaturats i els derivats de lignina, que són indicadors de la contribució al conjunt de matèria orgànica del registre sedimentari d'algues, bacteris i plantes vasculares que viuen dins el llac i, ocasionalment, de plantes vasculares que viuen a la conca (Meyers, 2003 i referències citades).

Els primers estudis paleolimnològics utilitzaven els pigments per reconstruir els canvis històrics en la producció primària del sistema (Vallentyne, 1956; Fogg i Belcher, 1961; Sanger i Gorham, 1972; Daley *et al.*, 1977) i com a indicadors de la presència de poblacions de cianobacteris (Griffiths, 1978; Engstrom *et al.*, 1985). El desenvolupament de noves tècniques analítiques com la cromatografia i un major coneixement sobre l'especificitat taxonòmica (Goodwin, 1980) i sobre els processos diagenètics que els afecten (Leavitt, 1993), va permetre ampliar la seva aplicació en estudis paleolimnològics per reconstruir amb més detall la composició de comunitats d'algues i bacteris fotosintètics (Züllig, 1981; Züllig, 1986; Züllig, 1989; Yacobi *et al.*, 1990; Soma *et al.*, 1995; Sabater i Haworth, 1995), per estudiar interaccions tròfiques (p.e. Leavitt *et al.*, 1989; Carpenter i Leavitt, 1991) o per reconstruir la radiació ultraviolada a la que estava exposat el sistema en el passat (Leavitt *et al.*, 1997; Leavitt *et al.*, 2003). També s'han utilitzat com a indicadors de perturbacions d'origen antròpic sobre els sistemes aquàtics, com ara processos d'eutrofització (Lami *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 1999; Cottingham *et al.*, 2000), per reconstruir canvis en la salinitat i en el clima (Vinebrooke *et al.*, 1998) o per reconstruir canvis en l'estratificació i l'anòxia del sistema en el passat (Koopmans *et al.*, 1996; Hodgson *et al.*, 1998; Squier *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 2003).



## Objectius i estructura de la tesi

L'objectiu general de la tesi era estudiar el senyal de pigments fotosintètics indicadors en diversos compartiments (columna d'aigua, sediment superficial i registre sedimentari) dels estanys d'alta muntanya dels Pirineus, per aprofundir en el seu valor com a marcadors de la composició taxonòmica i indicadors de processos en les diverses escales associades a cadascun d'aquests processos. Alguns dels estanys pirinencs han estat molt estudiats pel que fa a la variació estacional de la composició i producció del fitoplàncton (Capblancq, 1972; Catalan, 1987; Catalan i Camarero, 1991; Catalan, 1991; Felip, 1997; Felip *et al.*, 1999a). En canvi, la composició de grups algals a escala regional hi és menys coneguda (Capblancq, 1972; Margalef *et al.*, 1975; Vilaseca, 1978). Per veure l'efecte local, en el senyal de pigments, de canvis en factors com la irradiància o el règim de barreja, es va fer un estudi estacional en l'estany Redon. Per veure la variabilitat regional es va fer un estudi extensiu de la columna d'aigua i el sediment superficial en més de 80 estanys que cobrien un ampli rang de mides, tipus de substrat rocós i vegetació de la conca que els donen unes característiques morfològiques i físico-químiques diferents. Finalment, l'aplicació com a indicadors de comportament d'un sistema a llarg termini es va realitzar amb la reconstrucció de la producció primària de l'estany Redon al llarg de l'Holocè.

Aquests estudis es presenten en aquesta tesi estructurats de la següent manera:

### Part I- Aspectes metodològics

En aquesta part es presenten els aspectes metodològics relacionats amb l'anàlisi dels pigments per cromatografia. L'objectiu d'aquest apartat era establir un protocol d'anàlisi cromatogràfica que permetés analitzar mostres amb una gran complexitat en termes de nombre de pics per cromatograma com la que podem trobar en mostres de sediment.

Capítol 1- Es realitza una descripció de la tècnica i de la instrumentació utilitzada. Per a la identificació dels pics d'un cromatograma, donat que els patrons comercials de pigments són escassos, es va analitzar la composició de pigments en mostres de referència. Com a mostres de referència es van utilitzar cultius algals i de bacteris fotosintètics del sofre, també es van analitzar mostres de camp d'algues bentòniques, moltes i macròfits i de tres espècies de zooplàncton. Amb aquesta informació es va construir un catàleg de pigments amb informació de l'espectre d'absorció i temps de retenció ( $t_R$ ) de cada pigment segons els dos sistemes cromatogràfics utilitzats al llarg de la tesi.

Capítol 2- En aquest capítol es presenta com es va posar a punt una metodologia d'anàlisi. En primer lloc es van abordar aquells aspectes relacionats amb l'extracció dels pigments de la matriu de sediment: (i) es va avaluar la capacitat d'extracció que presentaven diferents dissolvents amb diferent grau de penetració combinada amb la utilització o no de tècniques disruptives amb l'objectiu de trobar aquella combinació amb millors resultats sobre mostres de sediment i (ii) es va estudiar l'efecte que tenia sobre la resolu-

ció i quantificació de pigments el fet de treballar a partir de sediment fresc o de fer-ho a partir de sediment liofilitzat. En segon lloc, es van abordar aquells aspectes relacionats amb l'optimització del funcionament del sistema cromatogràfic. Els cromatogrames obtinguts a partir de mostres de sediment contenen de dues a cinc vegades més pics que els de mostres que provenen de la columna d'aigua. Això implica que el grau de solapament entre pics pot ser alt i que per obtenir separacions reproduïbles era necessari una optimització: (i) seleccionar el tipus de fase estacionària o columna cromatogràfica i (ii) seleccionar el tipus de fase mòbil que es basa en la combinació de dissolvents i en el gradient d'elució programat.

## **Part II- Estudi del senyal de pigments a escala estacional**

El quocient entre la Chl-a i el contingut de carboni o el biovolum cel·lular depèn de factors com ara la composició taxonòmica del fitoplàncton, la intensitat de llum, la taxa de creixement i l'estat nutricional en què es desenvolupen les seves cèl·lules (Kirk, 1994). En aquesta part es presenta l'estudi del senyal de pigments a escala estacional en poblacions metabòlicament actives, amb l'objectiu d'avaluar la variabilitat del senyal de pigments en termes de canvis en algun d'aquests factors associats amb l'estacionalitat.

Capítol 3- En aquest capítol es presenta la comparació de dues tècniques per estimar la composició de grups algals en poblacions fitoplanctòniques, una basada en la utilització de pigments indicadors aplicant el programa CHEMTAX (Mackey *et al.*, 1996) i l'altra basada en l'estima del biovolum cel·lular a partir de la microscòpia. L'aproximació proporcionava més informació sobre els valors que prenen els quocients entre determinats pigments i sobre la variabilitat en la relació pigment-biovolum en sistemes oligotròfics d'aigua dolça. La major part de coneixements que es tenen sobre els canvis en la composició de pigments del fitoplàncton d'aigües dolces provenen de llacs de la zona temperada amb pocs representants del grup dels crisòfits, grup que és particularment important en sistemes oligotròfics com els que es troben en els estanys d'alta muntanya dels Pirineus, on el creixement cel·lular es troba molt limitat pels nutrients. Els resultats es discuteixen en termes de limitacions metodològiques, respostes d'aclimatació i composició d'espècies.

## **Part III- Estudi del senyal de pigments a escala regional**

L'estudi de les distribucions espacials i temporals del fitoplàncton en relació a determinades variables ambientals és de molt interès per entendre les respostes d'aquestes comunitats als gradients ambientals. Les relacions que es puguin establir entre el senyal de pigments i determinades variables ambientals a partir d'estudis d'abast regional són una eina que pot permetre reconstruir possibles escenaris passats en estudis paleolimnològics. En aquest context, la tercera part de la tesi es va dedicar a estudiar el senyal de pigments indicadors en un conjunt d'estanys distribuïts en un ampli rang pel que fa a característiques morfològiques, hidrològiques i d'estat tròfic i que eren representatius dels

estany d'alta muntanya dels Pirineus. El senyal de pigments es va analitzar en cada estany en tres compartiments diferents: (i) en la columna d'aigua a una profunditat propera al màxim profund de clorofil·la que es dona a l'estiu, (ii) en el biofilm de la part superficial del sediment i (iii) en el sediment profund.

Capítol 4 – En aquest capítol es presenta la caracterització de la composició de grups algals al voltant del màxim profund de clorofil·la aplicant el programa CHEMTAX (Mackey *et al.*, 1996). Aquest programa utilitza la relació que existeix entre un pigment indicador de grup i la Chl-a en el mateix grup assumint que aquesta relació es manté constant en el conjunt de mostres objecte d'estudi. La diversitat d'estanys mostrejats va fer necessari avaluar la constància en el valor de la relació, per veure si les diferències que hi havia entre estanys en el percentatge d'irradiància que arribava a la fondària de mostreig tenien influència en l'estima de la composició de grups. Un cop establert el procediment per a caracteritzar els grups, un segon objectiu va ser esbrinar quines variables ambientals eren significatives a l'hora d'explicar la composició taxonòmica de grups en el conjunt d'estanys mostrejats.

Capítol 5 - En aquest capítol, es presenta l'estudi de l'origen del senyal de pigments en el biofilm de la superfície del sediment d'un conjunt d'estanys representatius dels estanys d'alta muntanya dels Pirineus. Es va examinar la relació entre la composició de pigments i determinades variables ambientals per esbrinar a quin ambient de deposició es podia associar el senyal pigmentari. L'aparent diversitat de vies de formació de productes de degradació, o la pèrdua de senyal quan els productes de degradació no eren detectats amb el mètode utilitzat, va fer necessari explorar la relació del senyal de pigments entre els compartiments adjacents al biofilm (columna d'aigua i sediment profund) tot suposant que el sistema estava en una mena d'estat quasi estacionari, o si més no, que les diferències entre estanys eren en general més grans que les diferències temporals en un mateix estany.

## **Part IV- Aplicació en paleolimnologia**

En aquesta darrera part, es presenta la utilització del senyal de pigments indicadors en l'estudi de la variabilitat en la producció primària de l'estany Redon al llarg de l'Holocè.

Capítol 6 – En aquest capítol es presenta la reconstrucció de la producció primària d'un estany oligotròfic al llarg dels darrers deu mil anys utilitzant informació que provenia de diferents indicadors (*proxies*) de producció a més a més dels pigments. La utilització de més d'un indicador ens permetia estudiar no només els patrons de variació, sinó també els processos que hi poguéss haver darrera la variabilitat observada.

