

Part II

Comparació entre l'anàlisi de pigments amb HPLC i l'estima del biovolum de grups algal utilitzant la microscòpia

Introducció

En mostres naturals, la mesura directa del contingut de carboni del fitoplàncton no és possible, de manera que la biomassa del fitoplàncton habitualment s'estima utilitzant mètodes basats en altres paràmetres (Sournia, 1978). El recompte i càlcul del volum cel·lular per microscòpia i la mesura de la concentració de clorofil·la a (Chl-a) són els mètodes més utilitzats (Smayda, 1978). Els dos mètodes presenten però avantatges i limitacions tècniques. La microscòpia, proporciona una informació qualitativa molt valuosa sobre la composició i diversitat de les espècies del fitoplàncton. La mesura del volum de les espècies però, és una tasca molt laboriosa que depèn tant de l'utilització de mostres preservades com de les qualitats taxonòmiques de l'investigador. La fixació de les cèl·lules pot alterar-ne el volum segons les espècies i la naturalesa i concentració del fixador utilitzat (Montagnes *et al.*, 1994). A més a més, el grau d'incertesa pot ser elevat en el cas d'organismes petits (< 5 µm). El desenvolupament de tècniques com la microscòpia per epifluorescència (Daley i Hobbie, 1975), la microscòpia electrònica (Johnson i Sieburth, 1982), l'anàlisi dels pigments per cromatografia (Abaychi i Riley, 1979), la citometria de flux (Olson *et al.*, 1985) i les tècniques d'immunofluorescència (Shapiro *et al.*, 1989) han millorat substancialment l'estudi de la fracció més petita del plàncton, tot i que l'anàlisi a nivell d'espècies és encara difícil d'assolir pel picoplàncton.

L'anàlisi de pigments utilitzant la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) facilita la separació, identificació i quantificació d'un nombre elevat de carotenoides específics de determinats tàxons. La classificació quimiotaxonòmica de les comunitats de fitoplàncton a partir de l'anàlisi de pigments marcadors permet el càlcul de l'abundància relativa de diferents tàxons (Jeffrey *et al.*, 1997). No obstant, la conversió de la concentració de pigment a biomassa fitoplanctònica no és directa degut a que alguns pigments marcadors apareixen en més d'un grup algal (Rowan, 1989) i degut a que el contingut de pigment cel·lular pot canviar per diferents raons (Capblancq i Catalan, 1994; Llewellyn i Gibb, 2000). 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). Aquesta dependència pot portar a desajustos, en el temps i en l'espai, dels patrons de variació entre Chl-a i biovolum i referma la necessitat d'interpretar amb precaució les estimes de biomassa realitzades a partir de la Chl-a (Felip i Catalan, 2000).

Encara que el contingut de pigment cel·lular es pugui veure alterat, les concentracions de carotenoides i clorofil·les en la cèl·lula varien de manera semblant (Goericke i Montoya, 1998) i per tant els quocients entre pigments canvien en menor grau de com ho fa el contingut de pigment en relació al biovolum. De manera que, per estimar la contribució de cada grup algal a la població de fitoplàncton, la major part de mètodes utilitzen quocients entre un determinat pigment marcador de grup i la Chl-a.

En una de les primeres aproximacions que es van dur a terme per estimar la contribució de diferents grups algals al total de Chl-a utilitzant els pigments marcadors, s'utilitzava una anàlisi de regressió lineal múltiple entre la Chl-a i els pigments marcadors de diferents grups (Gieskes *et al.*, 1988). Aquest mètode però, no distribuïa de manera consistent la Chl-a total entre els grups i no distingia entre aquells que presentaven pigments marcadors compartits. Posteriorment, per tal d'evitar la manca de discriminació de l'aproximació feta utilitzant les regressions múltiples, es van proposar nous mètodes (Everitt *et al.*, 1990; Letelier *et al.*, 1993; Mackey *et al.*, 1996). El mètode que s'ha utilitzat en aquest estudi permet estimar l'abundància de classes algals a partir de pigments marcadors utilitzant l'anàlisi factorial i es troba compilat dins el programa informàtic CHEMical TAXonomy (CHEMTAX) que funciona des de MATLAB (Mackey *et al.*, 1997). Els seus autors van obtenir resultats satisfactoris en comprovar el seu funcionament en una base de dades creada artificialment per tal de reproduir les concentracions de pigments d'espècies pròpies de l'Atlàntic Sud i del Pacífic Equatorial. El mètode els permetia distribuir la Chl-a total de la mostra en Chl-a pertanyent als diferents grups algals i els permetia distingir entre grups algals amb una composició de pigments qualitativament idèntica a partir de les diferències quantitatives en els quocients entre pigments (Wright *et al.*, 1996). La utilització del CHEMTAX en l'estudi de la composició de grups en el fitoplàncton d'aigua dolça ha estat fins ara escassa. En l'estudi de la composició de grups algals de llacs del nord de Wisconsin (Descy *et al.*, 2000), el CHEMTAX va permetre als autors distingir entre diatomees i crisòfits i entre cloròfits i euglenòfits. La comparació amb els comptatges cel·lulars presentava però algunes discrepàncies que els autors van atribuir principalment al protocol de mostreig i al procediment per a estimar la biomassa.

L'objectiu principal d'aquest estudi era examinar els avantatges i els inconvenients d'utilitzar els pigments marcadors per estimar la composició de grups algals en el fitoplàncton d'un llac oligotròfic utilitzant el CHEMTAX en comparació amb l'utilització del biovolum calculat a partir dels comptatges cel·lulars. 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 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 limitat pels nutrients. L'aproximació que s'ha realitzat proporciona 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. Els resultats es discuteixen en termes de limitacions metodològiques, respostes d'aclimatació i composició d'espècies.

Mètodes

L'estany Redon: situació geogràfica, paràmetres morfomètrics i dinàmica estacional

L'estany Redon (42° 38' N, 0° 46' E) és un estany oligotròfic d'alta muntanya situat al Pirineu Central a 2240 m sobre el nivell del mar. Té una àrea de 24 ha i una fondària màxima de 73 m (32 m de fondària mitjana) (Figura 3.1). Es tracta d'un estany dimíctic que es troba cobert per gel i neu entre 5 i 6 mesos cada any. Durant el període lliure de gel, l'entrada de radiació solar és elevada degut a la transparència de l'aigua, amb fondàries del disc de Secchi que arriben fins a 20 m. La dinàmica estacional del fitoplàncton de l'estany està dirigida per la disponibilitat de llum i la càrrega interna de nutrients (Catalan i Camarero, 1991) i segueix la pauta típica dels llacs oligotròfics, presentant màxims de producció quan la termoclina arriba a la fondària en què es diposita i acumula el sediment fi, ric en nutrients (per sota els 25 m en el cas del Redon). Durant l'estratificació, la productivitat és baixa degut a la dependència en la càrrega interna de nutrients. En aquest període, la zona fòtica és més profunda que la fondària de la termoclina i això permet el desenvolupament d'un màxim profund de clorofil·la en la part superior de l'hipolimnion, on hi arriba entre un 1 i un 0.1% de la llum de superfície (Catalan, 1988). Durant el període en què l'estany es troba cobert pel gel, un 1% de la llum de superfície pot arribar a una fondària de 10 m (Catalan, 1992). Més tard, l'acumulació de neu sobre la coberta de gel bloqueja la penetració de la llum limitant de manera gradual la fotosíntesi. El patró de distribució que segueix la concentració de Chl-a descrit en els primers estudis realitzats a l'estany (Catalan, 1991) es repeteix anualment (Figura 3.2), tot i que la variabilitat interanual en aquest patró pot ser més o menys gran. Una descripció de la variabilitat estacional dels paràmetres físics i químics de l'estany Redon durant el període estudiat es troba a Ventura *et al.* (2000). Les algues són el principal component de la biomassa planctònica de l'estany i els crisòfits el grup més abundant (Felip, 1997; Felip *et al.*, 1999a).

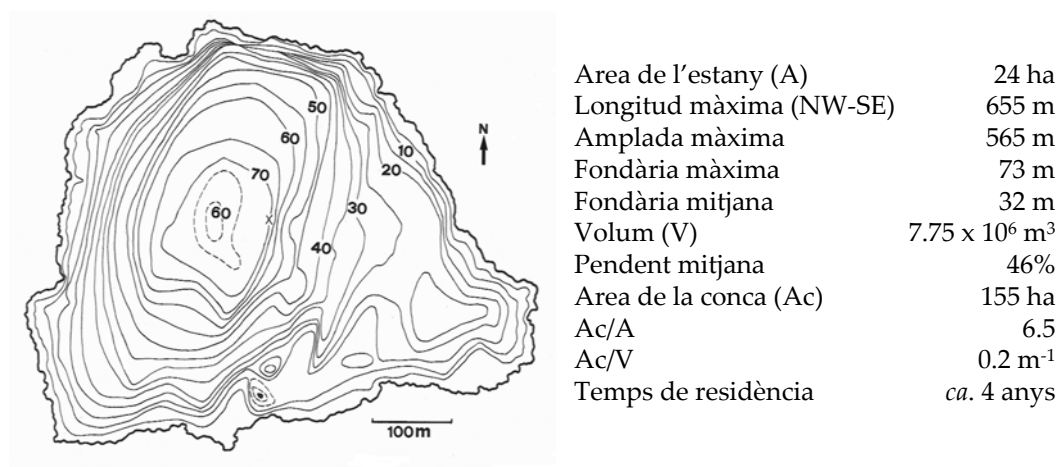


Figura 3.1. Mapa batimètric de l'estany Redon, el punt de mostreig hi apareix representat per una creu, i paràmetres morfològics (Catalan, 1987).

L'estany es va mostrejar mensualment en el punt més profund (Figura 3.1) cada 9 m de fondària, des de juliol de 1996 a juliol de 1998 utilitzant una ampolla de mostreig Ruttner. L'estudi s'ha centrat però, en les mostres d'octubre a desembre de 1996 i de juny a desembre de 1997, períodes pels quals es disposava tant de recomptes cel·lulars com de dades de pigments per les mateixes mostres. Durant els dos períodes lliures de gel, l'estany estava estratificat fins al mostreig de novembre. El desembre de 1996, una capa de 20 cm de gel negre cobria la superfície de l'estany i la columna d'aigua presentava una estratificació inversa. En canvi, el desembre de 1997 encara no hi havia coberta de gel i la columna d'aigua estava barrejada. Durant el primer any, l'anàlisi de pigments es va realitzar a major resolució (interval de 3 m). La Chl-a corresponent a cada grup algal es va estimar utilitzant totes les mostres de pigments ($n = 114$) per tal de maximitzar el rendiment del CHEMTAX. En canvi, la comparació amb els biovolums es va realitzar en un nombre inferior de mostres ($n = 64$).

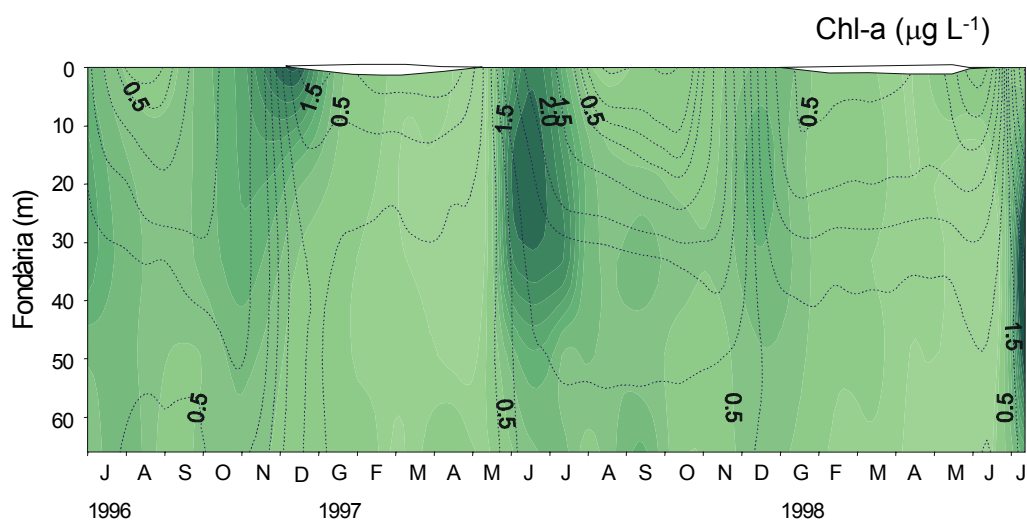


Figura 3.2. Diagrama d'isotermes (°C; línies de punts) i isopletes de Chl-a ($\mu\text{g L}^{-1}$; gradient de color) a l'estany Redon des de juliol de 1996 fins a juliol de 1998 (Ventura *et al.*, 2000).

Caracterització del medi físic: fondària de la termoclina i percentatge de llum incident

La temperatura i l'oxigen dissolt de la columna d'aigua de l'estany es van mesurar mensualment a intervals de 1 m utilitzant una sonda WTW TA-197. El percentatge de llum incident ($I_0(z)$; %) que arribava a determinada fondària (z ; m) es va calcular amb l'equació

$$I_0(z) = 100 e^{-K_d z}$$

a partir de la informació obtinguda amb la mesura de la fondària de visió del disc de Secchi (Z_{SD} ; m) que permetia calcular el coeficient d'extinció de la llum en la columna d'aigua (K_d ; m^{-1}) assumint la relació $K_d = 1.7/Z_{SD}$ (Poole i Atkins, 1929). El desembre de 1996, el percentatge de llum incident que era transmesa a través de la coberta de gel es va estimar utilitzant els valors de reflexió i coeficients d'extinció trobats a la bibliografia (Catalan, 1988). Es va assumir que les mostres que pertanyien a una capa barrejada (epilimnion i la columna sencera d'aigua el desembre de 1997) estaven exposades dins de cada capa a irradiàncies mitjanes similars. Per calcular la irradiància mitjana de cada capa barrejada es va utilitzar els valors de $I_0(z)$ calculats per cada fondària dins la capa barrejada. Per aquelles mostres de capes clarament estratificades (metalimnion, hipolimnion i les mostres sota la coberta de gel), es van assignar els valors de $I_0(z)$ que els corresponien segons la fondària.

Comptatges fitoplànctonics i estima del biovolum

Les mostres on s'havia de determinar la presència de picoplàncton autotròfic es van preservar en formaldehid i es van quantificar per microscòpia d'epifluorescència (MacIsaac i Stockner, 1993). L'abundància de fitoplàncton es va estimar utilitzant el mètode de Utermöhl després de fixar la mostra amb una solució de Lugol (Sournia, 1978). El biovolum es va calcular per similitud de forma amb figures geomètriques conegudes i mitjançant la mesura de les dimensions cel·lulars principals (Sheat *et al.*, 1975). En aquells casos en què es va observar diferències de mida cel·lular dins una mateixa espècie de fitoplàncton, els individus d'aquesta espècie eren separats en classes de mida cel·lular diferent per poder determinar el seu volum de manera més acurada.

Per comparar el biovolum algal amb els pigments, es van col·locar en el mateix grup els biovolums de tres ordres de la divisió Chlorophyta (volvocals, clorococals i desmidsals), donat que en cloròfits els tàxons per sota de divisió no presenten pigments marcadors particulars que ens permetin distingir-los.

Anàlisi de pigments

Immediatament després de mostrejar, 3 L d'aigua eren filtrats utilitzant una bomba de buit i filtres de fibra de vidre Whatman GF/F ($\phi = 47$ mm). Aquests filtres es protegien amb paper d'alumini i es congelaven dins un recipient amb nitrogen líquid per prevenir la degradació dels pigments fins dur a terme les anàlisis al laboratori. Els pigments es van extreure a partir dels filtres congelats utilitzant 5 mL d'acetona al 90% i un homogeneïtzador per ultrasons (sonicant durant 2 min). L'extracte es filtrava a través d'un filtre Whatman ANODISC 0.1 μm ($\phi = 25$ mm) i s'analitzava per HPLC.

El sistema cromatogràfic utilitzat fou el descrit en el capítol 1. Es va utilitzar una columna polimèrica C30 (dimensions: 250 x 4.6 mm, mida de partícula: 5 μm , YMC Europe GmbH) protegida per una precolumna amb la mateixa fase estacionària. El detector es fixava a 440 i 660 nm per a la integració de pics de carotenoides i forbines respectivament. Els pigments es van separar utilitzant una modificació del mètode descrit per Kraay *et al.* (1992). Després d'injectar la mostra (40 μL de l'extracte d'acetona), els pigments eren eluïts de la columna per un gradient lineal que anava de 100% de solvent A (51:36:13 metanol: acetonitril: aigua MilliQ, v/v/v) a 75% de A i 25% de solvent B (70:30 etil acetat: acetonitril, v/v) en 2 min i a 100% de B en 48 min seguit per una espera en isocràtic de 5 min a 100% de B. El flux era de 1.3 mL min⁻¹. La composició de solvent retornava a les condicions inicials després de 5 min de gradient, seguits de 5 min més per equilibrar el sistema abans d'injectar la següent mostra. Els pigments van ser identificats comparant els espectres dels pics amb una llibreria d'espectres obtinguda a partir d'extractes de cultius purs d'algues de la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP; Windermere, UK). Els estàndards de Chl-a i Chl-b es van obtenir de Sigma Chemical Co. Ltd. (UK). Els coeficients d'extinció utilitzats per als càlculs es van obtenir de la bibliografia (Davies, 1976; Rowan, 1989; Jeffrey *et al.*, 1997) i es troben recopilats a la taula 1.5 del capítol 1.

Descripció del programa CHEMTAX i selecció dels pigments

El programa CHEMTAX requereix tenir les dades de concentracions de pigments estructurades en una matriu S , on cada fila i és una mostra i cada columna j un pigment marcadore de grup. Aquesta matriu S , ha de ser factoritzada en una matriu H , que dóna els quocients entre els diferents pigments marcadors i la Chl-a de cada grup, i una matriu C , que dóna les abundàncies de cada grup algal en cada mostra. Donat que existeix un nombre infinit de possibles factoritzacions de S , per tal d'obtenir-ne una el màxim de versemblant, el programa treballa a partir d'una estima de H , H_0 , que és una matriu construïda a partir de valors bibliogràfics i per tant s'utilitza com a llavor o matriu d'entrada. Les estimes de les matrius \hat{C} i \hat{H} per C i H són determinades de manera que \hat{H} sigui el màxim de semblant a H_0 , subjecte a restriccions de positivitat i normalitat de \hat{C} i \hat{H} . L'estima inicial per a la matriu d'abundàncies de grups algals \hat{C}_0 es calcula de manera directa a partir de la solució de l'equació de mínims quadrats:

Minimitzant $\|S - \hat{C}_0 H_0\|$ subjecte a

$$[\hat{C}_0]_{ij} \geq 0 \text{ per tot } i, j$$

$$\sum [\hat{C}_0]_{ij} = 1 \text{ per tot } j$$

Per resoldre l'equació, el programa utilitza el mètode descrit a Lawson i Hanson (1974) i calcula el valor del residu:

$$\varepsilon_0 = \|S - \hat{C}_0 H_0\|$$

L'algoritme utilitzat per obtenir la millor factorització de S segueix una sèrie ordenada d'instruccions. Cada element no zero h_{ij} de la matriu H_0 es veu modificat consecutivament per un factor especificat (típicament del 10%) i \hat{C} i ε són recalculats cada vegada. La modificació que produeix la disminució més gran en ε es guarda, donant una nova matriu H_1 de quocients. De manera que es genera una sèrie de matrius $H_0, H_1, H_2, \dots, H_m, \dots$, amb les corresponents $\hat{C}_0, \hat{C}_1, \hat{C}_2, \dots, \hat{C}_m, \dots$, amb $\{\varepsilon_0\} = \|S - \hat{C}_0 H_0\|$ que disminueix de manera estricta amb m . Aquestes sèries són generades fins que ε_m disminueix per sota un límit preestablert, com pot ser el nombre d'iteracions permeses o el fet que iteracions successives no produeixin canvis significatius en el valor de ε_m . Les matrius H_n i \hat{C}_n obtingudes finalment, contenen respectivament les estimes de quocients entre pigments en els diferents grups algals i les abundàncies de cada grup algal en cada mostra expressades com una fracció de la Chl-a total mesurada en la mostra.

Una assumptió necessària que cal fer en aplicar mètodes iteratius com els que utilitza el CHEMTAX, és que els quocients entre pigments no poden canviar de manera significativa al llarg del conjunt de dades (Mackey *et al.*, 1996). Com ja s'ha comentat anteriorment, aquest requisit és difícil de complir donat que els quocients entre pigments poden variar en fer-ho la composició d'espècies del fitoplàncton o el seu estat fisiològic degut a canvis en la irradiància o la disponibilitat de nutrients (Goericke i Montoya, 1998). Per reduir l'efecte que tenen en el resultat final els canvis en els quocients entre pigments s'han proposat algunes alternatives com ara utilitzar determinats quocients entre pig-

ments marcadors enloc de fer-ho respecte la Chl-a de grup (Schlüter i Møhlenberg, 2003) o dividir les mostres en grups segons un criteri determinat com ara la fondària a la que s'ha recollit la mostra (Mackey *et al.*, 1998) o el percentatge d'irradiància que li arriba (Descy *et al.*, 2000). En aquest estudi però degut a que l'objectiu principal era realitzar una comparació amb les estimes de biovolum, es va creure més interessant no dividir el conjunt de mostres de cap manera per tal d'avaluar millor les causes de les possibles diferències entre els dos estimadors de la biomassa.

Per utilitzar el programa, calia en primer lloc definir els grups algals entre els que es volia distribuir la Chl-a mesurada en les mostres. Degut a la baixa contribució de xantòfits i cianobacteris al biovolum algal durant el període d'estudi i la manca de senyal de pigments marcadors exclusius d'aquests grups, l'estudi es va centrar en determinar les contribucions de crisòfits, dinoflagel·lades, cloròfits, criptòfits i diatomees.

Taula 3.1. Quocients entre el pigment marcador i la Chl-a de grup. Els valors de la matriu d'entrada (H_0) es van obtenir de la bibliografia i els de la matriu de sortida (H_m) són els estimats pel programa CHEMTAX (en negreta quocients que han canviat de valor).

	Peridina	Fucoxantina	Neoxantina	Violaxantina	Diadinoxantina	Al·loxantina	Luteïna	Chl-b	Chl-a
ENTRADA (H_0)									
Crisòfits	0	0.19	0	0.06	0	0	0	0	1
Cloròfits	0	0	0.035	0.022	0	0	0.14	0.27	1
Dinoflagel·lades	0.5	0	0	0	0.12	0	0	0	1
Criptòfits	0	0	0	0	0	0.257	0	0	1
Diatomees	0	0.77	0		0.39	0	0	0	1
SORTIDA (H_m)									
Crisòfits	0	0.375	0	0.096	0	0	0	0	1
Cloròfits	0	0	0.031	0.025	0	0	0.161	0.534	1
Dinoflagel·lades	0.5	0	0	0	0.120	0	0	0	1
Criptòfits	0	0	0	0	0	0.364	0	0	1
Diatomees	0	0.77	0	0	0.39	0	0	0	1

n = 114

La matriu H_0 , es va construir a partir dels valors mitjans dels quocients de la bibliografia (Hager i Stransky, 1970; Mackey *et al.*, 1996). Els quocients per crisòfits es van obtenir d'un cultiu d'*Ochromonas* sp. (J.-P. Descy, comunicació personal). La clorofil·la c1 (Chl-c1) i la clorofil·la c2 (Chl-c2), no es van identificar clarament amb el sistema cromatogràfic utilitzat i per tant no es van incloure com a pigments marcadors. La dinoxantina i el β,ϵ -carotè també es van excloure perquè havien estat detectats en concentracions molt baixes i en poques mostres.

En la bibliografia, existeixen dades contradictòries sobre la composició de pigments en el grup dels crisòfits (Bjørnland i Liaaen-Jensen, 1989), sobretot pel que fa a la presència de diadinoxantina i neoxantina en algunes espècies. Amb l'objectiu d'avaluar l'efecte que podia tenir incloure aquests dos pigments com a marcadors de crisòfits es va realitzar un primer anàlisi en el que es van incloure. La reducció dels valors dels quocients en crisòfits per aquests dos pigments fins a valors pràcticament negligibles en la matriu de sortida del programa (H_m) indicava l'escassa (si no nul·la) presència d'aquests pigments en les espècies de crisòfits de l'estany Redon. Així doncs es van eliminar com a pigments marcadors de crisòfits i es va utilitzar la matriu H_0 com es mostra a la taula 3.1.

Resultats

Composició del fitoplàncton

Les dinoflagel·lades i els crisòfits eren els grups dominants en termes de biovolum, mentre que els cloròfits i crisòfits ho eren en termes d'abundància i número d'espècies (Taula 3.2). Els criptòfits van ser ocasionalment importants i els xantòfits i diatomees van estar poc representats donat que suposaven de mitjana menys del 0.2% del total de biovolum fitoplanctònic. Les espècies amb una major contribució al biovolum fitoplanctònic en cada grup algal foren: *Stichogloea doederleinii* i *Ochromonas* sp. (crisòfits), *Sphaerocystis schroeteri* i *Dictyosphaerium cf. subsolitarium* (cloròfits), *Gymnodinium* spp. i *Peridinium inconspicuum* (dinoflagel·lades), *Cryptomonas ovata* i *Cryptomonas marsonii* (criptòfits), *Fragilaria nanana* i *Aulacoseira* spp. (diatomees) i *Itsmochloron trispinatum* (xantòfits) (Taula 3.3). El picoplàncton autòtrof fou pràcticament absent a l'estany durant el període d'estudi. Només dues espècies de picocianobacteris (*Chroococcus* sp. i *Synechocystis* sp.) es van observar de manera esporàdica, tot i que sempre apareixien en densitats molt baixes.

Taula 3.2. Descriptors estadístics del biovolum i abundància de fitoplàncton i número d'espècies observades dins de cada grup algal a l'estany Redon durant el període estudiat.

	Biovolum ($\times 10^{-3} \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$)			Abundància (ind mL^{-1})			Espècies (#)
	Mitjana	Max.	Min.	Mitjana	Max.	Min.	
Dinoflagel·lades	87	738	0.2	46	468	0.2	4
Crisòfits	62	2234	5.7	421	2584	38	13
Criptòfits	26	157	0	11	86	0	4
Cloròfits	15	45	0.5	487	1500	7	18
Diatomees	0.3	4	0	3	81	0	4
Xantòfits	0.3	4	0	0.1	3	0	2
Cianobacteris	0.01	0.4	0	0.2	6	0	2

n = 64

Taula 3.3. Espècies identificades en el fitoplàncton de l'estany Redon durant el període d'estudi. Apareixen en la llista per ordre decreixent segons la seva contribució mitjana relativa al biovolum de cada grup algal.

Cloròfits	Crisòfits	Criptòfits
<i>Sphaerocystis schroeteri</i>	<i>Stichogloea doederleinii</i>	<i>Cryptomonas ovata</i>
<i>Dictyosphaerium cf. subsolitarium</i>	<i>Ochromonas</i> spp.	<i>Cryptomonas marsonii</i>
<i>Oocystis parva</i>	<i>Chromulina</i> spp.	<i>Chroomonas acuta</i>
<i>Chlamydomonas</i> spp.	<i>Dinobryon cylindricum</i>	<i>Rhodomonas minuta</i>
<i>Monoraphidium</i> sp.	<i>Ochromonas globosa</i>	
<i>Oocystis borgeii</i>	<i>Pseudokephyrion inflatum</i>	Diatomees
<i>Chlamydomonas nivalis</i>	<i>Chrysococcus</i> sp.	<i>Fragilaria nanana</i>
<i>Botryococcus braunii</i>	<i>Chrysococcus cf. rufescens</i>	<i>Aulacoseira</i> spp.
<i>Pseudoquadrigula</i> sp.	<i>Chromulina parvula</i>	<i>Cyclotella pseudostelligera</i>
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	<i>Uroglena</i> spp.	<i>Cyclotella</i> sp.
<i>Pteromonas</i> sp.	<i>Chrysolykos skujae</i>	
<i>Provasoliella</i> sp.	<i>Bitrichia</i> sp.	Xantòfits
<i>Chloromonas groveii</i>	<i>Kephyrion planctonicum</i>	<i>Itsmochloron trispinatum</i>
<i>Cosmarium</i> sp.		<i>Monallantus</i> sp.
<i>Chloromonas</i> sp.	Dinoflagel·lades	
<i>Tetrahlepharis globulosus</i>	<i>Peridinium inconspicuum</i>	Cianobacteris
<i>Trochiscia</i> sp.	<i>Gymnodinium</i> spp.	<i>Chroococcus</i> sp.
<i>Dysmorphococcus variabilis</i>	<i>Gymnodinium cnecoides</i>	<i>Synechocystis</i> sp.
	<i>Amphidinium elenkinii</i>	

3. COMPARACIÓ DEL SENYAL DE PIGMENTS AMB LA MICROSCÒPIA

Una anàlisi de correspondències (CA) (Hill, 1974) va permetre de resumir la variabilitat en la distribució espaciotemporal dels grups algals (Figura 3.3). El percentatge de variància associada als dos primers eixos de l'anàlisi era del 60%. El primer eix reflectia principalment un gradient de fondària. Els criptòfits eren més rellevants en mostres profundes, mentre que les dinoflagel·lades ho eren en mostres superficials. El segon eix ordenava els grups algals entre aquells que apareixien de manera predominant durant els períodes estratificats (criptòfits, dinoflagel·lades, xantòfits, diatomees i cianobacteris) i els que ho feien en tot moment, tant durant els períodes estratificats com els de barreja (crisòfits i cloròfits).

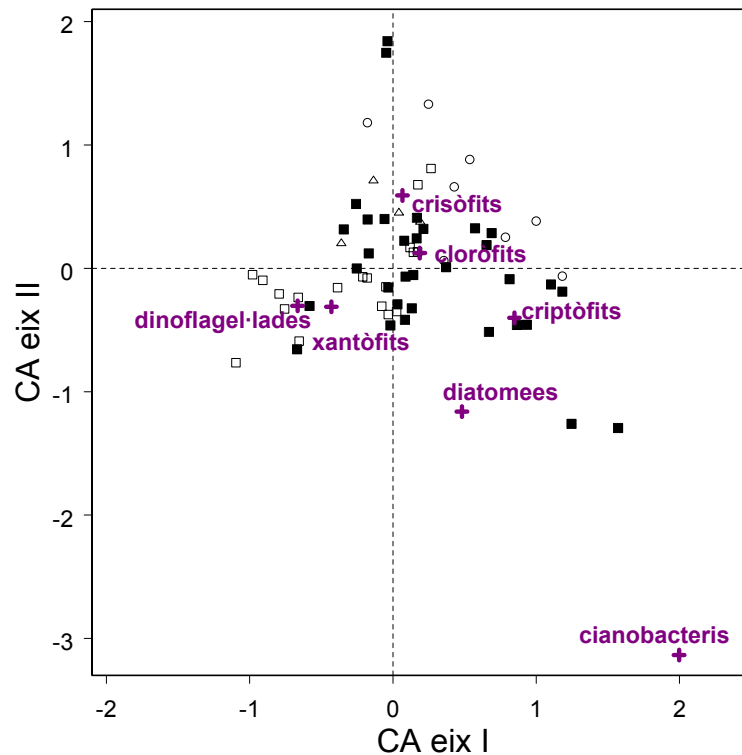


Figura 3.3. Gràfic obtingut a partir de l'anàlisi de correspondències realitzat utilitzant el biovolum dels grups algals com a matriu d'espècies. Els símbols representen: mostres per sobre la termoclina en períodes amb estratificació a la columna (quadrats transparents); mostres per sota la termoclina en períodes amb estratificació (quadrats negres); desembre-96 sota la recent formada coberta de gel de 0.2 m (cercles) i desembre-97 sense termoclina (triangles). Les creus representen la posició que pren cada grup algal.

Pigments marcadors de cada grup algal

Entre els pigments identificats mitjançant l'HPLC hi havia la Chl-a, Chl-b, Chlc-c1, Chl-c2, luteïna, neoxantina, violaxantina, fucoxantina, peridinina, dinoxantina, diadinoxantina, al-ioxantina, i β,ϵ -carotè. També es van identificar dos derivats de la Chl-a: el feofòrbid-a i els àlomers de la Chl-a. El primer es va detectar en mostres superficials agafades el desembre de 1996 sota la recent formada coberta de gel i en capes més profundes el Setembre de 1997. Per altra banda, els àlomers de la Chl-a es van trobar en mostres de superfície del desembre dels dos anys i en algunes mostres agafades a diferent fondària durant l'estratificació d'estiu. El mètode cromatogràfic utilitzat proporcionava una bona resolució de pics (Figura 3.4). En particular, el mètode permetia distingir entre luteïna i zeaxantina, segons es va veure en els cromatogrames obtinguts a partir del cultiu de cloròfits. No obstant, la zeaxantina es trobava per sota el límit de quantificació en les mostres de camp.

Després dels càlculs amb el CHEMTAX, la major part de quocients de la matriu H_m havien augmentat de valor respecte els de la matriu H_0 (Taula 3.1). Els canvis més rellevants es van produir en el quocient de la fucoxantina (crisòfits) i el de la Chl-b (cloròfits), que gairebé es van doblar de valor. El quocient va disminuir per la neoxantina i no va canviar ni per la peridinina ni per la diadinoxantina.

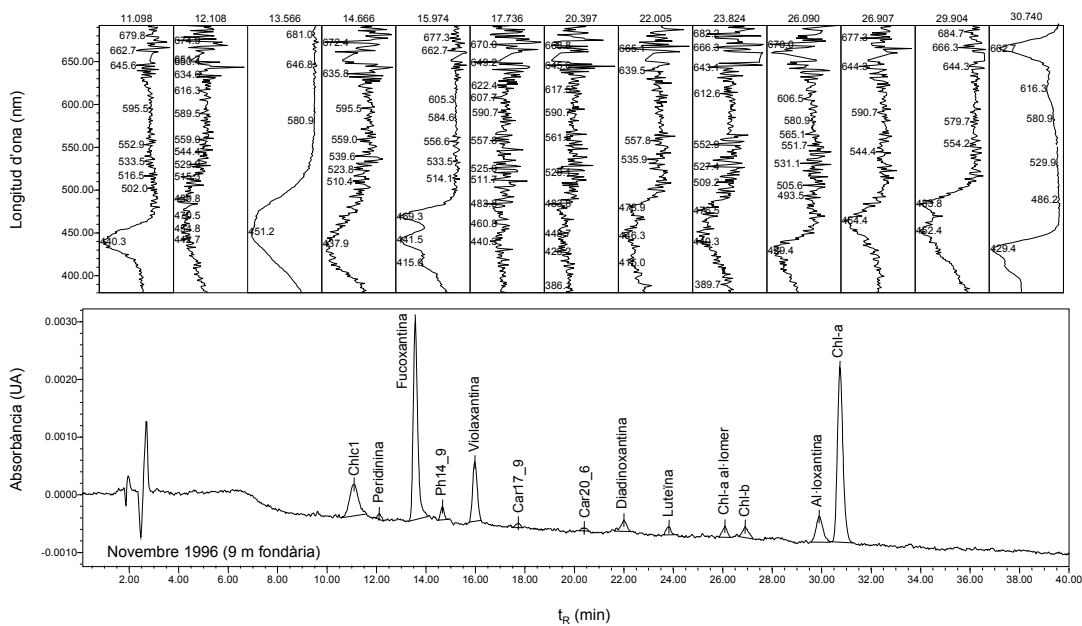


Figura 3.4. Exemple d'un cromatograma típic que mostra l'absorbància a $\lambda = 440$ nm i l'espectre de cada pic detectat d'una mostra presa el Novembre de 1996. Quan la identitat del pigment era desconeguda s'etiquetava el pic amb un codi que incloïa el temps de retenció.

Relació entre el biovolum algal i la Chl-a del CHEMTAX

La relació entre la Chl-a corresponent a cada grup algal, estimada a partir del programa CHEMTAX, i el biovolum calculat a partir dels recomptes cel·lulars, era significativa pels grups que contribuïen àmpliament al biovolum total, com ara crisòfits i pels grups amb mides cel·lulars més grans com ara dinoflagel·lades i criptòfits (Figura 3.5a,c,d). En canvi, no es va trobar cap relació clara per cloròfits ni per diatomees.

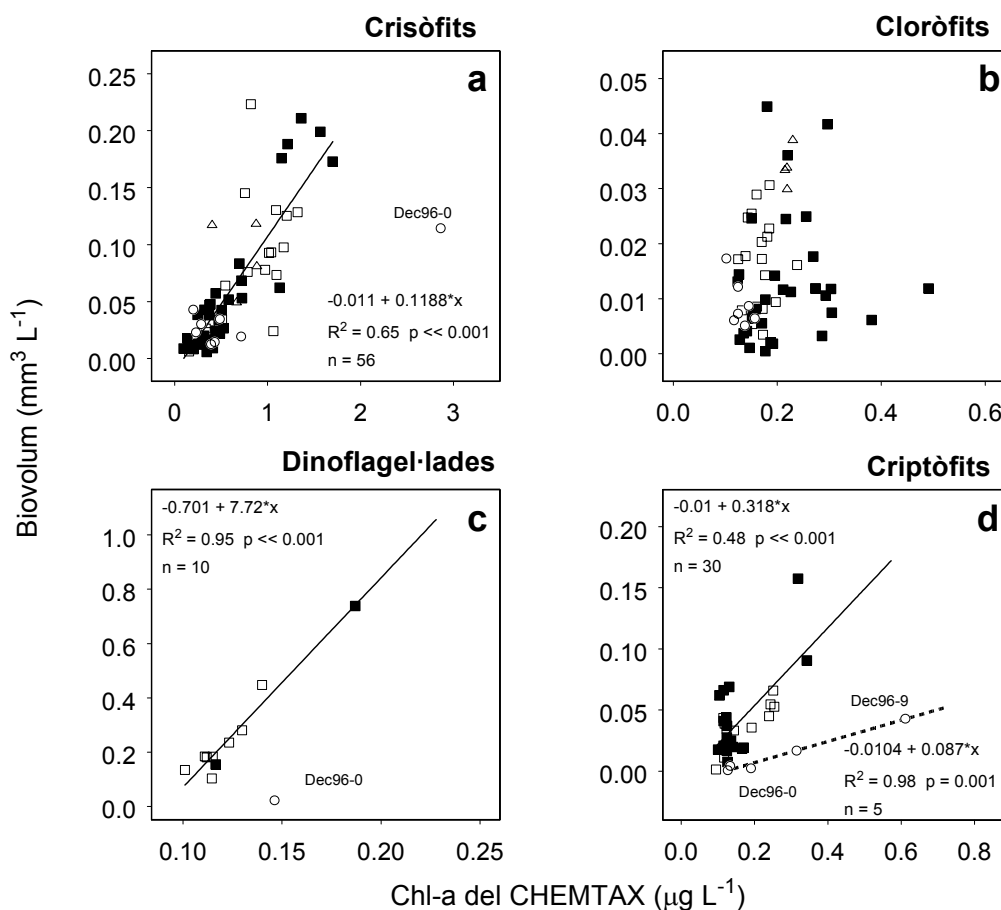


Figura 3.5. Relació entre la Chl-a estimada a partir del CHEMTAX ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) i el biovolum calculat a partir dels recomptes cel·lulars ($\text{mm}^3\cdot\text{L}^{-1}$). Els símbols han estat utilitzats com a la Figura 3.2: mostres per sobre la termoclina en períodes amb estratificació a la columna (quadrats transparents); mostres per sota la termoclina en períodes amb estratificació (quadrats negres); desembre-96 (cercles) i desembre-97 (triangles). Les mostres amb alguna particularitat han estat etiquetades amb un codi que inclou el mes, any i la fondària de mostratge. La línia sòlida representa la regressió de les mostres del període lliure de gel, la línia de punts representa la regressió de les mostres sota la coberta de gel. Noteu les diferents escales en els eixos.

Taula 3.4. Partició de la variància entre parells de grups algals que comparteixen un mateix pigment utilitzant l'anàlisi de regressions linears parcials.

	Variància explicada pels pigments (%)				Compartida entre parells
	Cloròfits	Crisòfits	Dinoflagel·lades	Diatomees	
Violaxantina	0.24	43*	-	-	1.6
Diadinoxantina	-	2	24*	-	17*
Fucoxantina	-	52*	-	1	1.4

* $p < 0,001$

En crisòfits el contingut típic de Chl-a per unitat de biovolum era de $8.42 \mu\text{g Chl-a mm}^{-3}$ (obtingut a partir del valor de la pendent de la relació, Figura 3.5). No obstant, al principi del període amb coberta de gel es va observar un valor molt alt ($25.05 \mu\text{g Chl-a mm}^{-3}$) en la mostra més superficial (Dec96-0; Figura 3.5a). *Ochromonas* spp. i *Dinobryon cylindricum* eren les espècies que dominaven en aquesta mostra. Per a les dinoflagel·lades existia una relació clara quan el biovolum del grup se situava per sobre $0.1 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 3.5c); per sota d'aquest límit, la major part de mostres no presentaven senyal de pigments. En aquest grup també la quantitat de Chl-a per unitat de biovolum era superior en la mostra de superfície (Dec96-0; Figura 3.5c) al principi del període hivernal ($6.5 \mu\text{g Chl-a mm}^{-3}$) que durant el període lliure de gel ($0.14 \mu\text{g Chl-a mm}^{-3}$). En criptòfits, el valor del quocient era de $3.15 \mu\text{g Chl-a mm}^{-3}$ durant el període lliure de gel. Les mostres sota el gel presentaven valors més alts del quocient al llarg de tota la columna d'aigua (ca. $11.53 \mu\text{g Chl-a mm}^{-3}$). *Cryptomonas ovata* era l'espècie més important de criptòfit al llarg del període estudiat esdevenint l'única espècie detectada el desembre de 1996 sota la coberta de gel. La quantitat de Chl-a per unitat de biovolum en cloròfits era més alta en algunes mostres hipolimnètiques que a l'epilimnion (Figura 3.5b) i els valors més baixos es trobaven al principi del període amb coberta de gel. La relació no es va investigar en diatomees degut a que els recomptes cel·lulars donaven valors baixos i no hi havia cap garantia que es poguessin distingir els individus morts en resuspensió de les cèl·lules vives.

Canvis en el contingut de pigment marcador per biovolum de grup

Els canvis en la relació entre la Chl-a del CHEMTAX i el biovolum del grup es van investigar amb més detall examinant els quocients entre pigments marcadors específics i el biovolum del grup algal corresponent per veure la relació que mostraven amb la irradiància a la que havia estat sotmesa la població (Figura 3.6). Els valors dels quocients es van calcular pels pigments marcadors més representatius de cada grup algal. Quan els mar-

cadors eren compartits per varis grups algal, es va utilitzar una anàlisi de partició de la variància utilitzant regressions linears parcials (Legendre i Legendre, 1998) per detectar el grup algal que explicava un percentatge més gran de la variància en la concentració del pigment (Taula 3.4). Els resultats van revelar que la major part de la variància en la violaxantina era explicada pels crisòfits mentre la influència dels cloròfits no era significativa. Les dinoflagel·lades explicaven la major part de la variància en la concentració de diadinoxantina, tot i que en aquest cas el percentatge de variància compartit amb els crisòfits sí que era significatiu. En el cas de la fucoxantina, la variància era explicada principalment pels crisòfits, mentre que la variància explicada per les diatomees no era significativa. Amb aquests resultats es va decidir seleccionar la violaxantina i la fucoxantina per calcular els quocients amb el biovolum de crisòfits i la diadinoxantina amb el biovolum de dinoflagel·lades.

La variabilitat del quocient entre un pigment marcador de grup i el biovolum del grup corresponent era baixa en les mostres del període lliure de gel dins la zona fòtica (>1% d'irradiància) (Figura 3.6). El valor del quocient pigment-biovolum en cloròfits era (mitjana \pm desviació estàndard): $1.2 \pm 0.93 \mu\text{g luteïna mm}^{-3}$, $0.54 \pm 0.24 \mu\text{g neoxantina mm}^{-3}$, $3.4 \pm 2.8 \mu\text{g Chl-b mm}^{-3}$; pels criptòfits: $0.59 \pm 0.38 \mu\text{g al·loxantina mm}^{-3}$; per a les dinoflagel·lades: $0.1 \pm 0.06 \mu\text{g diadinoxantina mm}^{-3}$, $0.07 \pm 0.03 \mu\text{g peridinina mm}^{-3}$ i pels crisòfits: $4.11 \pm 2.2 \mu\text{g fucoxantina mm}^{-3}$. Per sota la zona fòtica, la quantitat de pigment per unitat de biovolum augmentava en algunes mostres, especialment en cloròfits. Les mostres sota el gel (Dec96) presentaven valors dels quocients més alts pels pigments dels tres grups de flagel·lats, de manera molt marcada en la mostra presa immediatament sota el gel. El quocient entre violaxantina i biovolum de crisòfits mostrava un patró en la relació amb la llum diferent del d'altres pigments. Les mostres que tendien a desviar-se dels valors més comuns eren les que pertanyien a l'epilimnion, amb la desviació augmentant proporcionalment amb la proximitat a la capa superficial (Figura 3.6).

Discussió

La comparació entre la Chl-a del CHEMTAX i el biovolum estimat a partir dels recomptes cel·lulars no s'ha d'interpretar com una validació de cap dels dos mètodes perquè cap dels dos és lliure d'error. En aquest estudi, la relació trobada entre els dos estimadors era bona per a les dinoflagel·lades, criptòfits i crisòfits mentre presentava problemes pels cloròfits (Figura 3.5). La variabilitat en la relació entre les dues estimes pot ser deguda a diversos factors, que inclouen aspectes metodològics, canvis en el contingut de pigment cel·lular degut a respostes de fotoaclimatació i de fotoprotecció i canvis en el conjunt d'espècies.

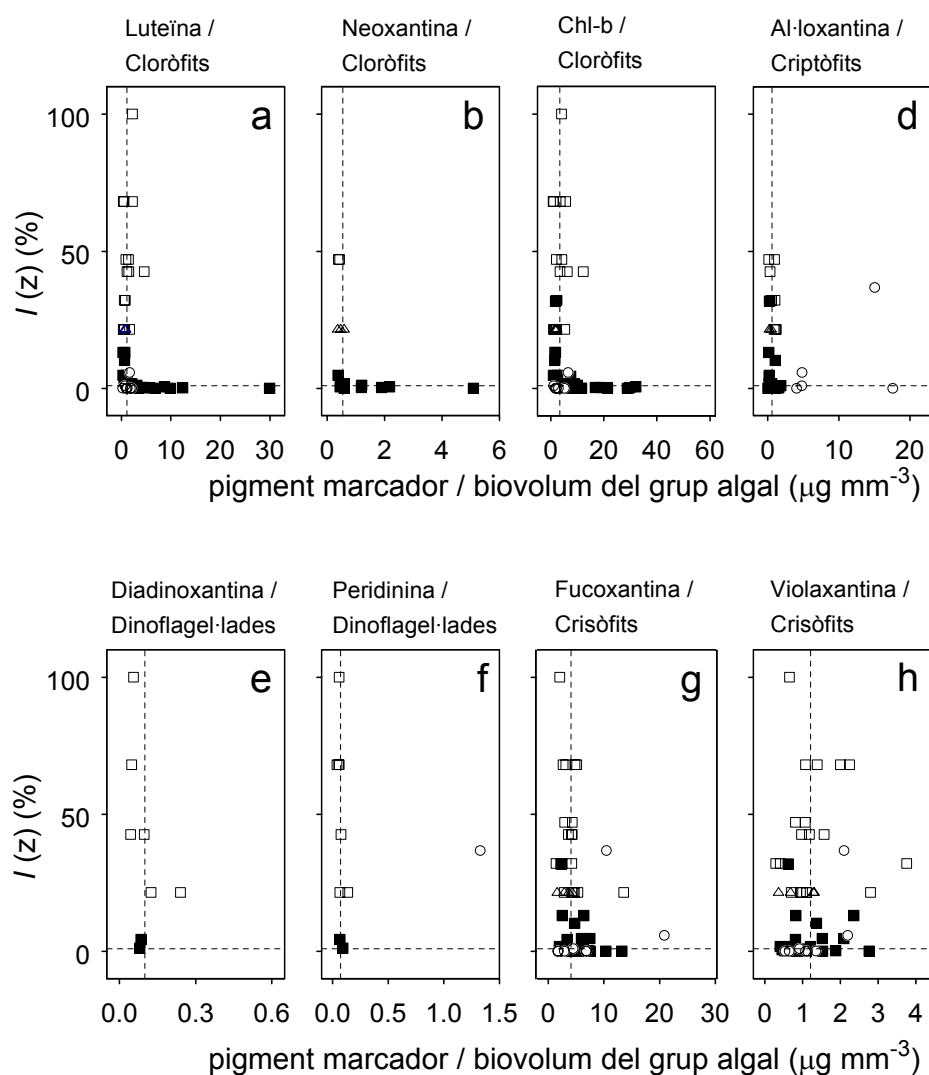


Figura 3.6. Relació entre el quocient d'un pigment marcador amb el biovolum del grup algal al que correspon i el percentatge de la irradiància subsuperficial que arriba a cada fondària de mostreig ($I(z)$; %). La línia de punts horitzontal indica $I(z) = 1$, la línia vertical representa el valor mitjà del quocient per les mostres amb $I(z) > 1$. Símbols iguals que en la Figura 3.2.

Des del punt de vista metodològic, els valors dels quocients resultants en la matriu de sortida del programa es trobaven en el rang dels trobats en la bibliografia per espècies d'aigua dolça (Wilhelm *et al.*, 1991; Soma *et al.*, 1993; Descy *et al.*, 2000). En particular, els mateixos autors donaven valors del quocient al-loxantina/Chl-a propers a 0.4 quan *Cryptomonas ovata* hi era present, fet que es produïa en totes les mostres del període estudiat a l'estany Redon. Recentment, els autors d'un estudi sobre els efectes de la limitació de nutrients i irradiància en la composició de pigments de 12 espècies de fitoplàncton marí

(Henriksen *et al.*, 2002) han assenyalat que la sortida del programa depèn força dels quocients d'entrada que s'utilitzin. No obstant, a l'estany Redon es va trobar que les diferències entre els resultats obtinguts quan la matriu d'entrada es canviava es trobaven sempre per sota el 5%. Els nostres resultats són consistents amb els obtinguts en altres estudis de grups de fitoplàncton d'estuaris i zones costaneres (Schlüter *et al.*, 2000; Havskum *et al.*, 2004) que conclouen que el CHEMTAX no depèn excessivament dels quocients utilitzats. En aquest sentit és poc probable que els desajustos entre estimadors siguin deguts a mancances pròpies del mètode que utilitza el CHEMTAX.

L'ajust entre les dos estimes era independent de la fondària o l'època de l'any durant el període lliure de gel, indicant una baixa influència dels processos de fotoaclimatació en la relació. No obstant, excepte en el grup dels cloròfits, en la resta de grups algunes mostres del període inicial amb coberta de gel s'apartaven significativament de la relació general. En aquestes mostres, la Chl-a per unitat de biovolum era més alta. L'augment del contingut de clorofil·la cel·lular quan la llum és limitant s'ha observat tan en cultius (Falkowski i Owens, 1980) com en poblacions naturals (Desortová, 1981) i es podria interpretar com una resposta de fotoaclimatació (Geider, 1987). Per què no es va trobar la mateixa resposta en les mostres de l'hipolimnion superficial que teòricament creixien a valors d'irradiància similars o fins i tot més baixos?. Els quocients entre pigment marcador i biovolum eren força estables dins la zona fòtica (> 1% irradiància de superfície) durant el període lliure de gel (Figura 3.6). Només en unes poques mostres per sota la zona fòtica els quocients augmentaven fins assolir valors similars als trobats en les capes superficials sota el gel. La manca d'un augment del contingut de pigment cel·lular en disminuir el règim de llum en el període lliure de gel es podria interpretar com una conseqüència de la limitació del creixement per la disponibilitat de nutrients (Geider *et al.*, 1997). En contrast, les poblacions que es desenvolupaven al principi del període amb coberta de gel mostraven una resposta de fotoaclimatació en forma d'un augment en el contingut de pigment per unitat de biovolum degut a què aquestes poblacions creixien en condicions més riques en nutrients a causa del període de barreja anterior.

També es podien esperar discrepàncies entre les dues estimes relacionades amb una resposta de fotoprotecció (Siefermann-Harms, 1987), deguda als elevats nivells de radiació nociva als que estan sotmeses les poblacions que es desenvolupen pròximes a la superfície dels llacs alpins (Laurion *et al.*, 2000). L'únic tret que es podia interpretar en aquest sentit era la variabilitat en el quocient violaxantina/biovolum de crisòfits, que tendia a ser més alt en proporció directa a la proximitat de la mostra a la superfície (Figura 3.6). Aquest resultat podria ser indicador de la utilització per fotoprotecció per part dels crisòfits, del cicle violaxantina-ateraxantina-zeaxantina (Lichtlé *et al.*, 1995). No obstant, la variabilitat en el contingut de violaxantina per unitat de biovolum en mostres epilimnètiques semblava no influenciar la relació general entre la Chl-a i el biovolum del grup (Figura 3.5).

Finalment, una part de la variabilitat es podria atribuir a canvis en la composició d'espècies en els diferents grups algals. En aquest sentit no es va trobar cap relació clara, tot i que alguns aspectes mereixen ser comentats. La manca de detecció de pigments de dinoflagel·lades en un nombre elevat de mostres epilimnètiques del període amb estratificació podia ser deguda a la dominància en aquestes mostres d'espècies mixòtrofes del

gènere *Gymnodinium*. Les discrepàncies més grans trobades en cloròfits podien ser degudes al fet que els cloròfits es trobaven principalment representats per espècies de clorococals formadores de colònies (*Sphaerocystis Schroeteri* i *Dictyosphaerium cf. subsolitarium*). Encara que l'abundància de cèl·lules era alta al llarg del període d'estudi (Taula 3.2), el biovolum era sempre molt baix, degut a la mida cel·lular de les espècies en joc. La probabilitat de cometre errors en calcular el biovolum a partir de les mesures microscòpiques, augmenta quan les cèl·lules són petites, quan canvien de mida al llarg del seu cicle vital i quan formen colònies (Wilhelm *et al.*, 1991). Algunes de les mostres per sota la termoclina, amb valors més alts de Chl-a estimada amb el CHEMTAX en comparació amb els valors calculats de biovolum (Figura 3.5), presentaven una dominància de cloròfits unicel·lulars tant del grup de les clorococals (*Pseudoquadrigula* sp., *Monoraphidium* sp.) o d'espècies flagel·lades de volvocals (*Chlamydomonas* spp.). Es van observar pocs canvis en la composició d'espècies de criptòfits al llarg del període d'estudi, essent *Cryptomonas ovata* l'espècie que més contribuïa al total del biovolum del grup. En el període inicial amb coberta de gel, el canvi en la relació entre els dos estimadors de biomassa fou evident en la mostra més superficial en tots els grups flagel·lats excepte en cloròfits, i era detectable a llarg de tota la columna d'aigua en el cas de criptòfits. Les imatges microscòpiques indicaven que les poblacions de cloròfits consistien en cèl·lules senescentes mentre les de criptòfits estaven constituïdes per cèl·lules sanes amb cloroplasts grans i plenes de substàncies de reserva.

A partir d'aquesta comparació podem concloure que la Chl-a de grup estimada amb el CHEMTAX es troba estretament relacionada amb el biovolum cel·lular en crisòfits, dino-flagel·lades i criptòfits durant el període lliure de gel en estanys molt oligotròfics com el Redon. En canvi, el mètode podria estimar erròniament el biovolum de cloròfits quan els valors són baixos i les poblacions contenen espècies colonials. Durant el període lliure de gel i per mostres exposades a un règim de llum amb valors per sobre 1% de la irradiància de superfície, es podria utilitzar com a alternativa al CHEMTAX un quocient senzill i constant entre alguns pigments marcadors i el biovolum, el que seria de particular interès en el cas de cloròfits. Sota el gel, i probablement sota qualsevol situació amb baixa irradiància i nutrients suficients, la Chl-a estimada amb el CHEMTAX pot sobreestimar el biovolum si s'aplica la relació trobada pel període sense gel. Els resultats suggereixen que, considerant algunes restriccions, el CHEMTAX es podria utilitzar en aplicacions de monitoratge o estudis experimentals en estanys oligotròfics on calgui estimar el biovolum dels diferents grups algals en un nombre elevat de mostres.