

TB  
619

R. 6660



ANALISIS DE PROTEINAS, CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS EN  
CLADOCEROS Y ROTIFEROS

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología, por  
el Licenciado Cástor Guisande González



Sevilla, 10 de Octubre de 1989

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 84 número 85 del libro  
correspondiente.  
Sevilla, 10 OCT. 1989

El Jefe del Negociado de Tesis,

*Lucia Loffitte*

DIRECTORA

*[Signature]*  
Profesora Dra. Julia Toja  
Santillana

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en  
de la  
de esta Universidad desde el día  
hasta el día

Sevilla de de 19

EL DIRECTOR DE

ANALISIS DE PROTEINAS, CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS EN  
CLADOCEROS Y ROTIFEROS

Memoria que para optar al  
grado de DOCTOR EN BIOLOGIA,  
presenta y firma el Licenciado  
Cástor Guisande González



FACULTAD DE BIOLOGIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Sólo desespera, aquel que ve el fin  
más allá de toda duda.

J.R.R. TOLKIEN

¡LA ACABEEEEEE!

A toda mi familia

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Francisco García Novo, el haber permitido que trabajara en el Departamento, pero además quiero darle las gracias por el interés mostrado para la realización de la tesis y lo que es más importante, todo el apoyo y ayuda que me ha dado.

A la Dra. Julia Toja le agradezco profundamente la dirección de esta tesis. Me ha dado muchas facilidades para poder realizarla, ha sabido resolver muchos problemas que han ido surgiendo a lo largo del trabajo, pero sobre todo le doy las gracias por esa parte humana del trabajo, animandome en los momentos más difíciles.

A todo el equipo de Limnología, Adela, Juan, Tere, Laura, Néstor y el Bebe, que con su apoyo, sus comentarios, sus mates, el no llorar mucho y su paciencia al soportar un tesista, me han ayudado mucho para poder acabarla.

A Narcis y Laura por toda la ayuda prestada en el laboratorio y a todos aquellos que han tenido que sufrir alguna vez machacando a los bichos.

A Carlos Granado por su apoyo y consejos y, a todo el equipo de peces por toda la información y ayuda en el ordenador que me han dado y, con los que he pasado muy buenos ratos, perdonandoles, incluso lo del tabaco.

A todos los que alguna vez vinieron a muestrear conmigo, Inma, Pepe, Braulio, etc y que hicieron el trabajo mas agradable.

En general a todo el Departamento de Ecología que de una forma u otra también me han ayudado en la Tesis.

A todo el personal de los Departamentos de Ecología y Microbiología de la Universidad de Valencia y en especial a María Rosa Miracle, Manuel Serra, María Jose Carmona y Carmen Rojo, por la ayuda prestada en los comienzos de la Tesis.

A los Departamentos de Bioquímica y Fisiología Vegetal de esta Facultad, por permitirme el uso de algunos aparatos que me hicieron falta.

A todo el personal del Centro de Calculo de la Universidad de Sevilla.

A la Estación Biológica de Doñana y al personal de la Reserva, que me prestaron un ayuda inestimable para realizar los muestreos.

A la Central Nuclear de Almaraz, por la ayuda prestada en algunas fases del trabajo.

No me puedo olvidar del Land-Rover viejo, que se portó como un jabato hasta el final, no dejandome nunca tirado. Por supuesto tampoco me olvido del Apolo, al que siempre le funcionó el emisor.

A toda la familia de Tete, por todo el cariño que me han dado y esa fe que siempre han tenido en mi.

A mis padres y mis hermanos es muy difícil de expresarles todo lo que siento. Creo que ellos lo saben muy bien, pero de todas formas, GRACIAS por todo lo que habeis hecho por mi.

A Tete y Tere que puedo decirlos. Habeis sido las que mas sufristeis esta tesis y vosotras sabeis mas que nadie el trabajo que a costado sacarla. Quiero que sepais que sin vosotras y sobre todo sin ti Tete, nunca hubiese podido acabarla.

Todo aquel que ha acabado una tesis, sabe como me siento ahora mismo y lo difícil que es poder manifestar todo lo que quisiera decir. De verdad, muchas gracias a todos.

Este proyecto ha sido posible gracias a una subvención de la CAICYT, proyecto número 0940/87.

## INDICE

PROLOGO .....	1
<b><u>CAPITULO I. CLADOCEROS</u></b>	
INTRODUCCION .....	5
I. METODOLOGIA GENERAL EMPLEADA .....	7
I.1 Tratamiento aplicado a los cladóceros y a las muestras de agua antes de analizar las proteínas, carbohidratos y lípidos .....	7
I.2 Análisis de Proteínas .....	9
I.3 Análisis de Carbohidratos .....	11
I.4 Análisis de Lípidos .....	12
I.5 Tratamiento estadístico .....	13
II. EXPERIENCIAS EN EL LABORATORIO .....	15
II.1 Material y métodos .....	16
II.2 Resultados .....	18
II.3 Discusión .....	20
III. EXPERIENCIAS EN EL MEDIO NATURAL .....	26
III.1 Material y métodos .....	26
III.2 Valores obtenidos en las distintas lagunas ....	34
III.3 Estudio de las proteínas en individuos no grávidos de <i>Daphnia magna</i> .....	37
III.4 Variación de las proteínas en individuos no grávidos de otras especies de cladóceros .....	46
III.5 Carbohidratos y lípidos en individuos no grávidos .....	52
III.5.1 Parámetros poblacionales .....	52

III.5.2 Carbohidratos .....	55
III.5.3 Lípidos .....	58
III.6 Animales grávidos .....	63
III.6.1 Mantenimiento de la población a bajas concentraciones de alimento .....	82
III.7 Análisis de hembras con efipios .....	84
 <b><u>CAPITULO II. ROTIFEROS</u></b>	
INTRODUCCION .....	89
I. METODOLOGIA EMPLEADA PARA LOS ANALISIS BIOQUIMICOS .	92
I.1 Tratamiento aplicado a los rotíferos y a las muestras de agua antes de analizar las proteínas, carbohidratos y lípidos .....	92
II. EXPERIENCIAS EN EL MEDIO NATURAL .....	95
II.1 Material y métodos .....	95
II.2 Resultados .....	97
II.3 Discusión .....	101
III. EVOLUCION DE LAS SUSTANCIAS DE RESERVA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALIMENTO .....	105
III.1 Material y métodos .....	107
III.2 Resultados .....	109
III.3 Discusión .....	115
 <b><u>CAPITULO III. COMPARACIONES ENTRE CLADOCEROS Y ROTIFEROS</u></b>	
INTRODUCCION .....	121
I. PROTEINAS .....	125
II. CARBOHIDRATOS .....	136
III. LIPIDOS .....	144
IV. ESTUDIO CONJUNTO DE PROTEINA, CARBOHIDRATO Y LIPIDO	151

CONCLUSIONES ..... 171  
EPILOGO ..... 178  
BIBLIOGRAFIA ..... 179

## PROLOGO

Seguramente, el lector lo primero que se preguntará será: ¿por qué se ha realizado este estudio? y también es posible que se pregunte: ¿se puede hacer algo inédito sobre alimentación en zooplancton?

En 1986 estábamos estudiando dos tipos de ecosistemas fluctuantes y eutróficos del Bajo Guadalquivir; las lagunas peridunares de Doñana y el estuario del río. Los cladóceros y los rotíferos eran los grupos dominantes en la zona dulce del estuario y en las lagunas. En ambos sistemas observamos como estos grupos estaban afectados en mayor medida por dos factores, la salinidad y la temperatura. Su influencia se veía claramente ya que, todas las especies tenían unos umbrales máximos y mínimos de temperatura y salinidad. Ahora bien, los resultados indicaban la existencia de un tercer factor no menos importante: la alimentación, que tenía un efecto decisivo en la composición de las comunidades. Observamos también, que cambios en el estado trófico del medio, podían dar lugar a variaciones importantes en las poblaciones como por ejemplo: la sustitución de unas especies por otras; descenso en la densidad de la población de unas especies y aumento en las de otras, etc. Sin embargo, no

fue tan fácil de dilucidar, como en el caso de los otros parámetros, cuales eran exactamente los cambios que se estaban produciendo y como estaban afectando a las especies. Existen muchos trabajos que podrían ser usados para comprender estos fenómenos, pero la inmensa mayoría presentan el problema de que son estudios muy concretos y, además, realizados en condiciones fijadas en el laboratorio. Al llegar al convencimiento, de que este era un tema importante para poder llegar a conocer la dinámica de las especies en estos ecosistemas, decidimos comenzar su estudio.

Dentro de la alimentación, existen muchas posibles líneas de trabajo. La cuestión que se nos planteaba era encontrar una que fuera lo suficientemente general para poder ser usada con todas las especies, que pudiera aportar nuevos datos y, lo que es más importante, que pudiera servir para realizar los estudios en el medio natural. En primer lugar optamos por analizar el alimento teniendo en cuenta, principalmente, la cantidad sin entrar en detalles sobre la composición, calidad, etc; y centrar el estudio en como respondían las distintas especies a las variaciones en la cantidad de alimento disponible. Para ello era necesario estudiar parámetros que nos informaran sobre el estado nutritivo de las especies y, a la vez, sobre el alimento. A la vista de la bibliografía consultada, pensamos que lo más indicado para esto era centrar el trabajo en el estudio del contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos tanto de los individuos, como del medio.

El principal objetivo de esta tesis, era poner a punto todas las técnicas para poder aplicar los análisis de estos componentes celulares a las distintas especies de cladóceros y rotíferos, y comprobar su idoneidad para la aplicación en el medio natural. Una vez conseguido esto, lo que se pretendía era intentar resolver una serie de preguntas de temas de interés como por ejemplo:

¿Cual es la concentración óptima de alimento para las distintas especies?

¿Es la misma para cualquier población de una determinada especie, independientemente del ecosistema en que se desarrolle?

¿Por qué las especies grandes dominan sobre las más pequeñas en ecosistemas eutróficos?

¿En que medida el alimento disponible es determinante de las variaciones en el tiempo de las distintas especies?

¿Quién invierte más en sustancias de reservas, las especies grandes o las pequeñas?

¿La inversión es la misma independientemente de la concentración de alimento?

¿Las condiciones alimenticias en las que se desarrollan las especies son, generalmente las óptimas?

El conocer la respuesta a éstas y a otras cuestiones, puede ser de gran ayuda para poder comprender un poquito más esta apasionante y compleja dinámica de las especies del zooplancton.

# CAPITULO I

## CLADOCEROS

Los trabajos sobre alimentación en cladóceros son muy abundantes y se han enfocado de muy diversas formas. A modo de ejemplo se puede mencionar los estudios sobre la importancia del sedimento en la alimentación (Arruda et al., 1983); análisis de contenido estomacal (Murtaugh, 1983); estudios sobre la cantidad de alimento ingerido, basandose en los productos de degradación de la clorofila (Welschmeyer y Lorenzen, 1985; Bergquist et al., 1985); incidencia de la filtración en la composición del fitoplancton (McCauley y Briand, 1979); selección de alimento (Gilbert y Bogdan, 1984; Meise et al., 1985); estudios sobre biomasa (Geller y Müller, 1985); etc.

En los cladóceros, el estudio de los componentes celulares no es algo novedoso. Los lípidos han sido los mas estudiados (Goulden et al., 1982; Tessier y Goulden, 1982; Tessier et al., 1983; Goulden y Henry, 1984; Tessier y Goulden, 1987; Hoenicke y Goldman, 1987), ya que son la principal fuente de reserva en cladóceros y, por lo tanto; los cambios que se producen en el contenido en lípidos de los individuos dan una buena información

sobre la dinámica de la población.

En el caso de las proteínas, los estudios han sido también muy abundantes (Kokova et al., 1982; Dabrowski y Rusiechi, 1983; Cowgill et al., 1986). En este caso, la evolución del contenido proteínico de los animales da información sobre el alimento disponible.

Por el contrario, los estudios de carbohidratos han sido más escasos (Lemcke y Lampert, 1975) debido, tal vez, a su carácter intermedio, ya que pueden ser usados como sustancias de reserva al igual que los lípidos y, a su vez, como elementos estructurales como ocurre con las proteínas, por lo que también están influenciados por la cantidad de alimento. Esto hace que, al no tener un patrón bien definido, la información que se puede obtener de los carbohidratos es menor.

Ahora bien, todos estos trabajos se han realizado en laboratorio y los datos obtenidos en el campo son muy escasos. El principal objetivo del trabajo realizado aquí con los cladóceros, es ver la evolución de estos componentes celulares en comunidades naturales y determinar si hay pautas de comportamiento común a todas las especies.

## I. METODOLOGIA GENERAL EMPLEADA

### I.1 Tratamiento aplicado a los cladóceros y las muestras de agua antes de analizar las proteínas, carbohidratos y lípidos

Cada animal se mide en vivo, desde la cabeza hasta la base de la espina y posteriormente se introduce en un eppendorf donde se homogeneiza en 100  $\mu$ l de agua destilada. Es muy importante triturar bien al animal antes de los análisis, y esto se consigue usando una punta de pipeta automática (azul) previamente adaptada a la forma de un eppendorf. De un solo animal se puede hacer el análisis de proteínas y carbohidratos, o el de proteínas y lípidos. Para ello, de los 100  $\mu$ l se separan 75 para el análisis de lípidos o de carbohidratos. A los 25  $\mu$ l de muestra que quedan en el eppendorf, se añaden 175  $\mu$ l de agua destilada, para así tener un volumen de muestra de 200  $\mu$ l, necesario para el análisis de proteínas. Para el análisis de carbohidratos, los 75  $\mu$ l de cada individuo se introducen en un tubo y se completa con 325  $\mu$ l de agua destilada, para obtener el volumen necesario (400  $\mu$ l). En el caso del análisis de los lípidos se emplean 75  $\mu$ l de muestra y, por lo tanto, no es necesario añadir agua destilada.

Con las especies más grandes de cladóceros, como por ejemplo *Daphnia magna* y *Simocephalus exspinosus*, es posible realizar los tres análisis con un solo individuo, entonces lo que se hace es homogenizar a los animales con 120  $\mu$ l de agua

destilada, cogiendo 50  $\mu\text{l}$  para el análisis de carbohidratos, 50  $\mu\text{l}$  para el análisis de lípidos y con los 20  $\mu\text{l}$  que restan se realiza el análisis de proteínas.

Para tener una estima de la cantidad de alimento existente, paralelamente al análisis de los cladóceros, se realizan medidas de la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos existentes en el agua en que se encuentran los animales. Para ello el agua se filtra a través de una red de nyltal de 31  $\mu\text{m}$  de poro (Haney, 1985). De esta forma, solo queda en el agua el material que consumen preferentemente los cladóceros, ya que ingieren muy esporadicamente en sus dietas partículas superiores a 31  $\mu\text{m}$ . En este agua, que incluye la fracción particulada y la soluble, se mide la proteína, carbohidrato y lípido total. Para determinar la fracción soluble, se analiza el agua filtrada a través de filtro Whatman GF/C de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro. La fracción particulada, se calcula por diferencia entre la total y la soluble.

Para el análisis del agua, se usan muestras por cuatriplicado de 200  $\mu\text{l}$  cada una para el análisis de proteínas, de 400  $\mu\text{l}$  para el de carbohidratos y de 75  $\mu\text{l}$  para el de lípidos.

## 1.2 Análisis de Proteínas

El método empleado en este trabajo, fue descrito por Lowry et al. (1951) y modificado por Markwell et al. (1978). Este método emplea las siguientes soluciones:

Solución A :	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2	%
	NaOH	0.4	%
	NaK(COO) (CHOH) 4H <sub>2</sub> O	0.16	%
	SDS	1	%
Solución B :	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	4	%
Solución C :	100A:1B		

Para redissolver posibles precipitados de la solución A, se calienta a 30 °C antes de hacer el análisis.

A un volumen de 200  $\mu$ l de muestra, se añaden 50  $\mu$ l de NaOH 0.5 N, preparado poco antes de comenzar el análisis. Después se agregan 750  $\mu$ l de la solución C, que también se ha preparado momentos antes de comenzar el análisis. Las muestras entonces se agitan y, posteriormente, se introducen en un baño a 30 °C, con agitación, durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, a cada muestra se agregan 75  $\mu$ l de Folin-Ciocalteus diluido 1:1 y se agita vigorosamente. Posteriormente, las muestras se agitan en el baño a la misma temperatura durante 30 minutos. Por último se mide la absorbancia a 660 nm. El espectrofotómetro usado en este trabajo fue un HITACHI-U2000. Para la recta patrón se usó BSA, desde valores de 1  $\mu$ g hasta 22

$\mu\text{g}$  proteína/200  $\mu\text{l}$ .

Bâmstedt (1985) analizó las proteínas de varias especies de copépodos marinos, usando el método de Dorsey et al. (1977). La variante mas importante con respecto al método anterior, es que calienta las muestras a 100 °C durante una hora. Este método también se probó y se observó que era mas impreciso y a su vez mas tedioso, por lo que se desechó.

Los volúmenes usados en este análisis de proteínas, así como en el de carbohidratos y lípidos, son muy pequeños, para así poder aumentar la sensibilidad del método. Esto permite que se pueda trabajar con un solo individuo.

Es necesario mencionar, que el método de Lowry et al. (1951) empleado en este trabajo, planteó problemas al usarlo para analizar las proteínas en algunas lagunas de Doñana. Esto se debió a que, en estas lagunas, las fuertes lluvias de 1987 provocaron un importante aumento en el agua de compuestos fenólicos, que provenían del lavado de la vegetación que rodea a las lagunas. Entre estos compuestos destacan los taninos, los cuales se unen facilmente a las proteínas y las hacen precipitar (Amory y Schubert, 1987). Esta afinidad química, se traduce en que el método de detección de fenoles usa un reactivo en el que está incluido el Folin-Ciocalteus (APHA, 1971), que también se usa en el análisis de proteínas. Esto da lugar a que el análisis detecte, aparentemente, una concentración de proteínas mayor de la que en realidad existe. Para solucionar el

problema, se hizo una recta de calibración para el análisis de proteínas, pero usando Acido Tánico como patrón. Así, conociendo la cantidad de fenoles existentes en el agua, por medio de esta recta patrón era posible saber la densidad óptica que había que restar en el análisis de proteínas para conocer, exactamente, la cantidad de las mismas. El siguiente problema que se planteó fue que, al usar el método dado en APHA (1971), el Folin-Ciocalteus también revelaba proteínas además de los fenoles. Por ello fue necesario usar el método de Hagerman y Butler (1980), que es más específico para detectar fenoles.

### I.3 Análisis de carbohidratos

Los dos métodos mas usados para medir carbohidratos, son el descrito por Dubois et al. (1956) y el dado por Golterman et al. (1978). Ambos presentan ventajas y desventajas, pero el primero de ellos es mas sensible que el segundo (Pick, 1987) y, debido a esto, fue el elegido para este estudio.

El análisis consiste en lo siguiente: a un volumen de muestra de 400  $\mu$ l, se añaden 10  $\mu$ l de Fenol al 81%. Después de agitar, se agrega 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Una vez agitados los tubos, se espera 30 minutos a temperatura ambiente y se mide en el espectrofotómetro a 485 nm. Para la recta patrón se usa glucosa, desde una concentración de 1  $\mu$ g a 20  $\mu$ g/400  $\mu$ l.

En este análisis no pueden usarse eppendorfs, como en el caso de las proteínas, ya que hay interferencias con los carbohidratos incluidos en el plástico, por lo que es preciso usar tubos de cristal. Si las muestras de agua, no están congeladas, es conveniente realizar una sonicación a 75 W durante 45 segundos. Para medir los carbohidratos en los cladóceros no es necesario este tratamiento ya que, como se ha explicado anteriormente, los individuos se homogenizan.

#### I.4 Analisis de Lípidos

El método que ha sido más empleado anteriormente para medir lípidos en cladóceros es el descrito por Tessier et al. (1983). Este es un análisis muy complejo y que resulta muy tedioso cuando se pretende analizar muchos individuos. Por eso se provó el método descrito por Zöllner y Kirsch (1962), que es muy usado para determinar lípidos en algas, dando buenos resultados.

En este análisis se parte de 75  $\mu$ l de muestra que se introducen en un tubo de cristal. A este se le añaden 50  $\mu$ l de etanol absoluto. Se agita bien y se dejan las muestras en frío durante 2 horas como mínimo. El paso siguiente, es la adición de 375  $\mu$ l de ácido sulfúrico concentrado. A continuación, se homogenizan las muestras por agitación y se colocan los tubos a 100 °C durante 15 minutos. Después de esta hidrólisis, se dejan enfriar los tubos, y se añaden 2 ml del reactivo de Vainillina y, tras agitar, se dejan reposar 30 minutos a 30 °C.

Transcurrido ese tiempo, se lee la absorbancia a 530 nm frente a un blanco de 75  $\mu$ l de agua destilada, tratado de la misma forma que las muestras problema.

Reactivo de Vainillina : se mezcla 494 mg de vainillina con 200 ml de  $H_3PO_4$  al 85% y se añaden 50 ml de  $H_2O$  destilada. Se guarda en frío.

Como patrón se usa la solución "Standard de Boehringer". Se cogen 0.2 ml de esta solución y se lleva hasta 5 ml con etanol. La concentración final de lípidos en la solución patrón así obtenida es de 0.4 mg/ml. La recta patrón se realizó desde una concentración de 1 a 30  $\mu$ g/75  $\mu$ l. Los blancos usados en este caso eran de etanol, sin incluir agua destilada.

Para el análisis de lípidos en el agua, también es conveniente que se parta de muestras congeladas.

### I.5 Tratamiento estadístico

Las regresiones realizadas en este trabajo, se hicieron con el programa estadístico Statgraphics (1985). Cuando se hicieron regresiones múltiples se aplicó a las variables en algunos casos, la transformación logarítmico neperiana, para obtener un mejor ajuste en la ecuación. En otros casos, se sumó 1 a algunas variables en las que había muchos valores menores que 1, consiguiendo también una ecuación mas predictiva.

Se usó un análisis de la covarianza (ANCOVA), para comparar los coeficientes de regresión. Este mismo tratamiento, fue usado para determinar si las diferencias encontradas en las pendientes eran causadas por alguna variable en concreto (Sokal y Rohlf, 1979).

## II. EXPERIENCIAS EN LABORATORIO

Con estas primeras experiencias en laboratorio se perseguían dos objetivos:

- Poner a punto las técnicas para los distintos análisis, tanto para los cladóceros como para las muestras de agua.
- Determinar si había relación entre el alimento existente y el estado de nutrición de los animales.

Para esto se escogió el análisis de proteínas, en base a los resultados obtenidos por varios autores, que establecían una fuerte relación entre la composición de aminoácidos de varias especies de cladóceros y los aminoácidos presentes en el alimento (Kokova et al. 1982; Dabrowski y Rusiecki, 1983; Cowgill et al., 1986). Para cumplir el segundo objetivo, solamente se usaron individuos no grávidos para el análisis, es decir, que no tuviesen huevos, embriones o efipios. Si se incluyen los animales grávidos, la cantidad de proteínas de los individuos mayores podría incrementar mucho independientemente del alimento existente en el medio, simplemente debido a la presencia de embriones o proteínas acumuladas para la reproducción.

## II.1 Material y Métodos

*Daphnia magna* fue el cladóceros empleado en estos experimentos en laboratorio. Los individuos procedían de una población que se desarrolla en una cubeta de unos 3 m<sup>3</sup>, que se encuentra al aire libre. El agua del tanque se filtró a través de Whatman GF/C de 0.45  $\mu$ m de poro, y posteriormente se esterilizó. Como alimento se usó *Anacystis nidulans* cultivado en un medio BG11 (Rippka et al., 1979) y *Chlorogonium* sp. en el medio definido por Sueoka et al. (1967). Estas algas eran centrifugadas y posteriormente resuspendidas en el agua esterilizada. Se introdujeron aproximadamente 30 individuos en 250 ml de esta suspensión, que se renovaba cada 24 horas. Estos cultivos se mantenían en una cámara de crecimiento a 20°C con un fotoperíodo 14:10 luz-oscuridad y con una intensidad de 430 lux, provista por 2 fluorescentes blancos que no se calientan. Después de 5-6 días (tiempo establecido después de experiencias previas, como suficiente para que el contenido proteínico de los individuos se estabilizara para cada concentración de alimento), se seleccionaban varios animales procurando obtener el mayor rango posible de tamaño, y se medía, su contenido en proteínas. Esta experiencia se repitió varias veces, cambiando la concentración de algas, y por lo tanto el alimento disponible para los animales. También se realizó el análisis de la población de cladóceros que se desarrolla en el tanque, así como el de individuos mantenidos en agua destilada para ver, en este caso, el contenido en proteínas de los animales en condiciones

de hambre.

Como indicador de la cantidad de alimento existente, se ha usado la proteína total presente en el medio. Esta es mejor indicador de la cantidad de alimento que los carbohidratos o los lípidos ya que ambos, y sobre todo los lípidos, pueden variar en función del estado en que se encuentre el alimento (edad del cultivo, stress de nutrientes, etc).

Otra cuestión que puede plantearse es, ¿por qué se ha usado la proteína total y no la particulada? En el laboratorio, como se utiliza como alimento un cultivo monoespecífico, da igual usar una u otra, ya que la proteína soluble es siempre muy parecida y, por lo tanto, la proteína total y la particulada cambian de forma similar. Ahora bien, cuando se trabaja en el medio natural, la varianza encontrada en la proteína soluble es mucho mas importante y, por lo tanto, no es lo mismo usar la proteína total o la particulada. Como se verá mas adelante, cuando se estudien los resultados obtenidos en el medio natural, la proteína total parece ser mejor indicador de la cantidad de alimento que la particulada. Debido a esto y para poder comparar los resultados de los experimentos en el laboratorio con los obtenidos en el campo, se ha optado por usar la proteína total en todos los casos.

Tabla 1. Regresiones potenciales entre la cantidad de proteína/individuo ( $\mu\text{g}$ ) y la longitud ( $\mu\text{m}$ ) para *Daphnia magna*, a diferentes concentraciones de alimento en el laboratorio.

Medio	Proteína Total $\mu\text{g/ml}$	Constante A	Constante B	$r^2$	n
<i>Anacystis nidulans</i>	238.2	$3.08 \cdot 10^{-8}$	2.717	0.96	12
<i>Chlorogonium sp.</i>	87.2	$1.13 \cdot 10^{-7}$	2.556	0.96	12
<i>Anacystis nidulans</i>	72.8	$1.15 \cdot 10^{-6}$	2.236	0.79	12
Tanque de agua	17.9	$4.04 \cdot 10^{-5}$	1.784	0.88	14
<i>Chlorogonium sp.</i>	17.8	$2.67 \cdot 10^{-5}$	1.844	0.87	10
Tanque de agua	17.3	$8.44 \cdot 10^{-7}$	2.253	0.99	10
" "	16.5	$6.61 \cdot 10^{-6}$	2.020	0.95	10
" "	13.4	$3.18 \cdot 10^{-3}$	1.209	0.73	11
" "	12.1	$7.24 \cdot 10^{-6}$	1.92	0.88	9
Agua destilada	3.7	$7.11 \cdot 10^{-3}$	1.046	0.7	6
" "	3.4	$4.70 \cdot 10^{-4}$	1.408	0.9	12

## II.2 Resultados

Los resultados obtenidos en el laboratorio, se exponen en la Tabla 1 y Figura 1. Se ve que, lógicamente, existe una clara relación entre el tamaño de los animales y el contenido en proteínas de los individuos de *Daphnia magna*. Pero lo más importante es que, a medida que aumenta la concentración de alimento, aumenta el contenido proteínico de los animales. Las pendientes de las regresiones son significativamente diferentes (ANCOVA,  $p < 0.001$ ) y, además, la cantidad de alimento es el

causante de las variaciones observadas en las pendientes (ANCOVA,  $p < 0.001$ ). Similares resultados se obtuvieron por Lemcke y Lampert (1975) realizando estudios de biomasa y por Duncan et al. (1985) midiendo el contenido de carbono de los animales a diferentes concentraciones de alimento.

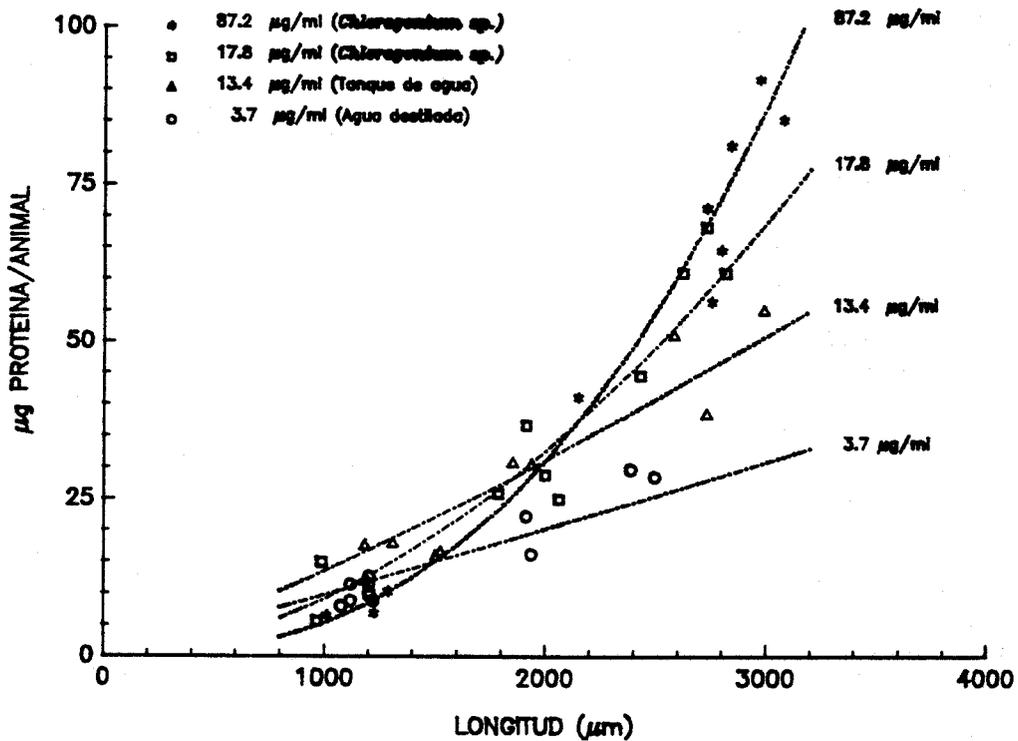


FIGURA 1. Relación entre la cantidad de proteína/individuo ( $\mu\text{g}$ ) y la longitud ( $\mu\text{m}$ ) en *Daphnia magna*, a cuatro concentraciones de proteína total. Datos obtenidos en el laboratorio.

La influencia del alimento a la hora de determinar el contenido proteínico de los animales queda de manifiesto por el hecho de que tanto la intercepción (A), como la pendiente (B), de las regresiones obtenidas (Tabla 1) están fuertemente

correlacionadas con el contenido en proteínas presente en el agua. Para la intercepción,  $r = 0.85$  ( $p < 0.001$ ); y en el caso de la pendiente,  $r = 0.87$  ( $p < 0.001$ ).

### II.3 Discusión

Geller y Müller (1985) realizaron un estudio sobre la variación de la biomasa en *Daphnia galeata* y *Daphnia hyalina* en el lago Constance, y observaron que la intercepción obtenida en la relación existente entre Biomasa y el  $\ln$  Longitud, variaba con respecto a la cantidad de materia orgánica particulada existente en el agua. Por el contrario no encontraron esta misma relación para la pendiente.

Estos resultados los explican los autores basandose en otros obtenidos por Lampert (1977), que estudió la relación entre longitud y tasa de asimilación en *Daphnia pulex*. Según ese autor, si el alimento es comestible para todos los tamaños, entonces solo  $\ln A$  varía con la concentración de alimento;  $B$  variaba solo, cuando el alimento era comestible para juveniles y adultos y no para neonatos. Según los datos obtenidos en el presente trabajo, tanto la intercepción como la pendiente varían con la concentración de alimento por lo tanto, según Lampert (1977), esto significa que los individuos mas pequeños (neonatos) de *Daphnia magna* no son capaces de utilizar el alimento usado en este trabajo. Esta interpretación no puede ser correcta, por lo que veremos a renglón seguido. Según

Lampert (1977), al variar sólo la constante A, lo que ocurre es que hay un aumento progresivo de la biomasa, tanto en los individuos mas pequeños como en los mas grandes; por el contrario, con los datos del presente trabajo, se observa como, a medida que aumenta el alimento, el incremento del contenido proteínico de los animales es mucho mayor en los individuos mayores, mientras que cuanto menores son los individuos este incremento es mucho menor (Figura 1). Esto implica, que cuanto mas pequeño es el animal, necesita menos alimento y, por lo tanto, llega un momento en que su contenido en proteínas no aumenta aunque incremente el alimento. Por el contrario, en los animales de mayor talla el umbral de alimento que necesitan es mayor y, por lo tanto, su contenido proteínico aumenta considerablemente al aumentar el alimento.

Esto puede verse mas claro realizando una regresión multiple, usando la cantidad de proteínas por individuo ( $\ln P$ , en  $\mu\text{g}/\text{individuo}$ ) como variable dependiente y la longitud del cuerpo ( $\ln L$ , en  $\mu\text{m}$ ) y la concentración de proteínas totales en el agua ( $\ln C$ , en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) como variables independientes:

$$(1) \ln P = -12.54 + 2.054 \cdot \ln L + 0.068 \cdot \ln C$$

$$(n=118, r^2= 0.85, MS= 0.087, F= 309.4, p < 0.001)$$

Con esta ecuación, representada en la Figura 2, se ve claramente como en los animales de mayor tamaño, el incremento del contenido proteínico es mayor a medida que aumenta el alimento. En apoyo de estos resultados están los trabajos de

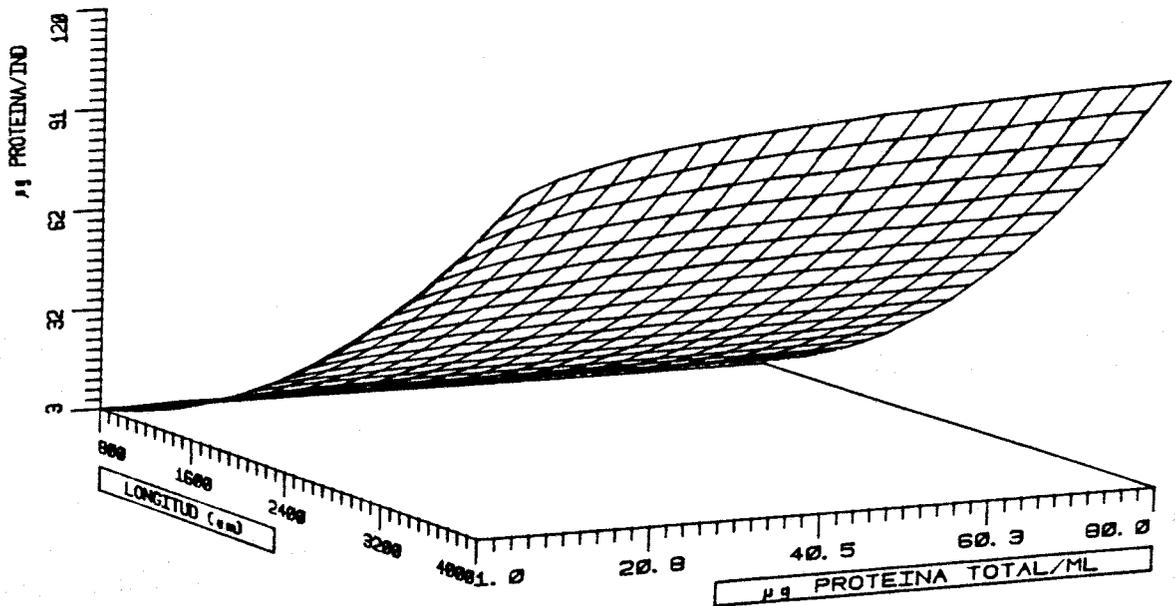


FIGURA 2. Cambios en el contenido en proteínas en *Daphnia magna* en relación al tamaño y a la concentración de proteínas totales del agua (ecuación 1). Datos obtenidos en el laboratorio.

Haney (1985) y Downing y Peters (1980). El primero trabajando con varias especies de *Daphnia* y los otros autores estudiando a *Sida crystallina*, encontraron que, conforme aumentaba el alimento, la tasa de filtración aumentaba en los animales hasta llegar a unos umbrales en los que la filtración disminuía. Este umbral aumentaba conforme los animales eran mayores, es decir, a medida que aumenta el alimento los animales de menor talla paran antes de filtrar que los mas grandes. Si la tasa de filtración se estabiliza, también lo hace el contenido en proteínas de los animales.

Una posible causa de por qué Geller y Müller (1985) no encontraron una variación en la pendiente (B) con respecto al alimento, puede ser el hecho que la fracción de materia orgánica comestible para los animales, puede variar muy poco a lo largo de un año y esto trae consigo que no se produzcan cambios importantes en la biomasa de los cladóceros en función del alimento, sino que los cambios mas importantes se deban a que la población entre en una etapa reproductiva y acumulen sustancias de reserva. Esto se verá, mas adelante, en los resultados obtenidos en los estudios hechos con los cladóceros en el medio natural.

Otro aspecto a destacar es que, en estas experiencias en el laboratorio, se han utilizado concentraciones de alimento muy altas, como por ejemplo la de 238.2  $\mu\text{g}$  de proteína total/ml. Estas concentraciones, son casi imposible que se den en el medio natural, de hecho el valor mas alto detectado en las lagunas muestreadas en este trabajo fue de 67.19  $\mu\text{g}$  de proteína total/ml. Estos cultivos de los animales en medios con tanto alimento, se hicieron para determinar cual era la concentración a la que los individuos alcanzaban su estado óptimo nutricional. Debido al amplio rango de tamaño que presenta *Daphnia magna*, los individuos mas pequeños alcanzan el estado óptimo mucho antes que los adultos y, por lo tanto, no se puede hablar de una sola concentración óptima para todos los individuos de la especie. Incluso con cultivos realizados en el laboratorio, se da el caso de que, cuando el alimento es el óptimo para los individuos de

mayor tamaño, resulta demasiado alto para los individuos más pequeños, produciendo una disminución en su contenido proteínico, debido a la saturación del aparato filtrador. A pesar de esto, es interesante conocer a qué concentración de alimento la mayoría de los individuos alcanza su óptimo nutritivo, para así poder determinar si en las lagunas los animales suelen alcanzar el contenido proteínico óptimo. Entre las concentraciones de 72.8 y 87.2  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 1), el contenido de proteínas de una hembra de 3500  $\mu\text{m}$  pasa de 96.6 a 129.3  $\mu\text{g/ind}$ . Por el contrario, entre las concentraciones de 87.2 y 238.2  $\mu\text{g/ml}$ , prácticamente no existe variación ya que, el contenido en proteínas para un individuo de 3500  $\mu\text{m}$ , en este último caso es de 131.1  $\mu\text{g/ind}$ . Esto nos indica que, los individuos más grandes parecen alcanzar su óptimo contenido en proteínas, a una concentración de alimento cercana a los 90  $\mu\text{g}$  de proteína total/ml.

De estas experiencias en laboratorio con *Daphnia magna*, se obtienen dos claras conclusiones:

- a) La cantidad de proteínas existente en el agua, es un buen indicador para calcular el contenido proteínico de los animales, de tal forma que, conociendo el tamaño del individuo y la concentración de proteínas en el agua, es posible conocer el estado de nutrición de la población.
- b) La cantidad de alimento, a partir de la que los animales no aumentan su contenido proteínico, es menor a medida que disminuye el tamaño. Es decir, los más beneficiados

con un aumento del alimento son los individuos de mayor talla.

### III. EXPERIENCIAS EN EL MEDIO NATURAL

Una vez puesta a punto la técnica y para ver si el patrón de comportamiento de los cladóceros en el laboratorio se mantenía en condiciones naturales, se estudiaron las poblaciones de cladóceros de varias lagunas ubicadas en el Parque Nacional de Doñana (Figura 3). En una ocasión también se analizó una laguna (Palos) que se encuentra en las proximidades del Parque.

*Daphnia magna* fue una de las especies estudiadas, no solo porque con ella se realizaron los análisis en el laboratorio, sino porque es una de las especies más importantes de las lagunas estudiadas. Para determinar si los resultados obtenidos con *D. magna* se mantenían en otras especies, se analizaron otras dos que tienen también hábitos planctónicos, aunque con un tamaño diferente: *Ceriodaphnia reticulata* (300-1200  $\mu\text{m}$ ) y *Daphnia longispina* (600-2700  $\mu\text{m}$ ). También se estudió otra especie, *Simocephalus exspinosus*, que presenta un rango de tamaño muy similar al de *Daphnia magna* (700-4000  $\mu\text{m}$ ), pero que tiene unos hábitos preferentemente bentónicos.

#### III.1 Material y Métodos

En este trabajo, se han analizado tanto animales grávidos como no grávidos, pero ambos grupos se han estudiado por separado. Esto se debe a que, los factores que están influyendo en los cambios en el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos de los animales no grávidos son distintos o varían en su

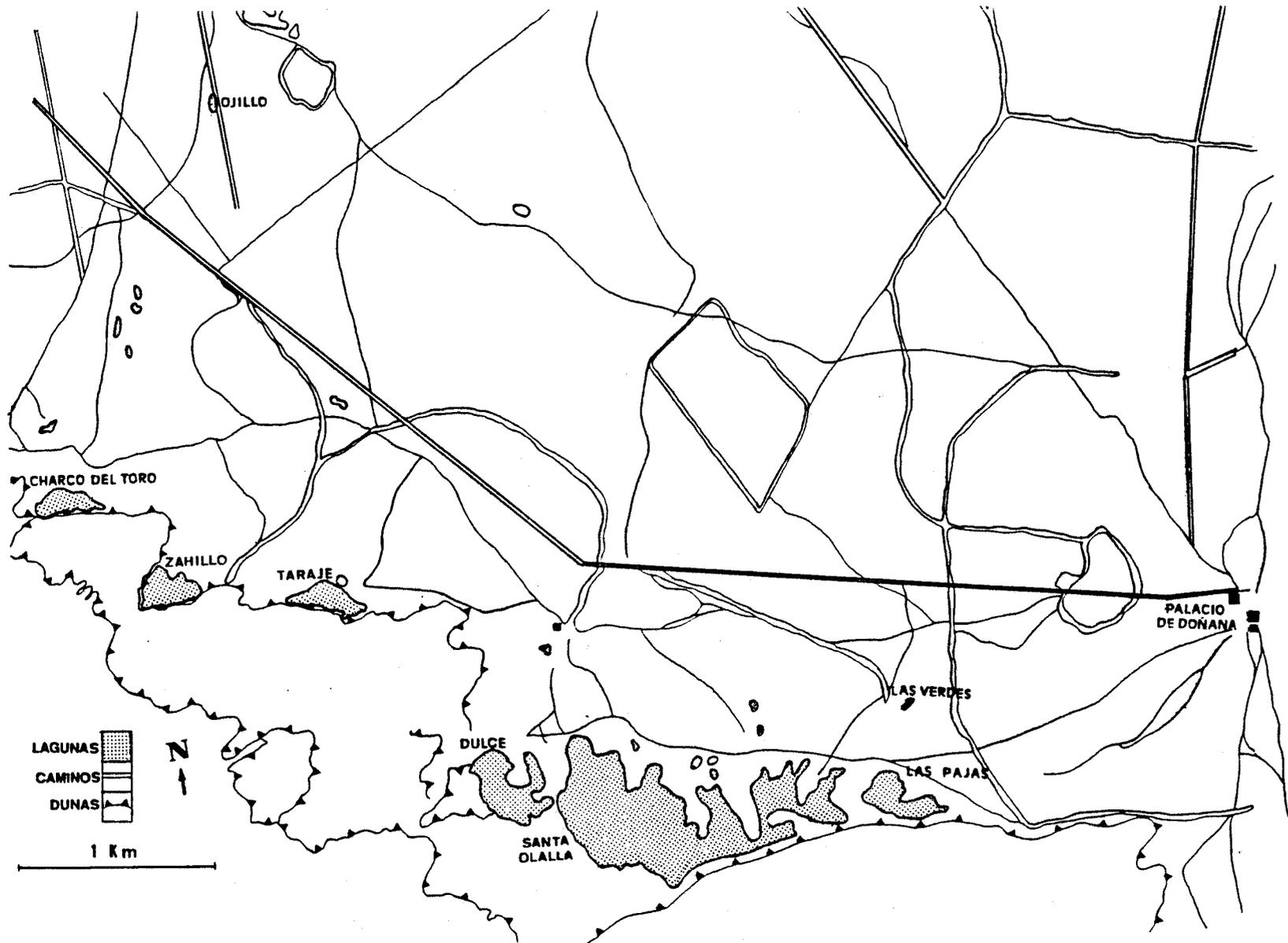


FIGURA 3. Mapa de una parte de la Reserva Biológica de Doñana, en el que se resaltan mediante sombreado algunas de las lagunas estudiadas para este trabajo.

importancia, de los que están afectando en el caso de los animales grávidos. Por lo tanto, a pesar de estar estudiando individuos de una misma especie, las diferencias existentes entre ambos grupos, aconsejan el subdividir al total de individuos de cada una de las especies en estas dos clases: grávidos y no grávidos.

En el estudio de los animales no grávidos, se incluyen todos los individuos que no tienen huevos ni embriones, independientemente de su tamaño. En el estudio de los animales grávidos, se incluyen todos los individuos con huevos o embriones y además todos los animales hasta un cierto tamaño determinado, que varía en función de las especies. Para *Daphnia magna*, no se incluyen dentro de los animales grávidos, todos los individuos con un tamaño superior a 2000  $\mu\text{m}$  y que no tengan huevos o embriones. En el caso de *Daphnia longispina* el umbral está en 1600  $\mu\text{m}$  y para *Ceriodaphnia reticulata* es de 650  $\mu\text{m}$ . Este umbral es el tamaño mínimo con el que una hembra ya puede tener huevos, y se ha calculado en función de las observaciones realizadas con los animales obtenidos en el campo. De esta forma, para poder calcular la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos que le corresponden a un animal grávido de un cierto tamaño, es necesario excluir a individuos que, en función de su tamaño, podrían tener embriones o huevos pero, como no los presentan, su contenido en componentes celulares es muy distinto de un individuo que si los tiene.

Los muestreos se realizaron en las lagunas en dos fases distintas. La primera fase consistió en el muestreo de varias lagunas, en un intervalo de tiempo de 2 ó 3 días, tratando de abarcar la mayor variación posible en la cantidad de alimento existente. Se hicieron 3 campañas en el año 1988; del 28 de Febrero al 2 de Marzo; del 28 al 31 de Octubre y del 4 al 5 de Diciembre.

La segunda fase consistió en un muestreo periódico en dos lagunas, Santa Olalla y Dulce, que están muy proximas, pero cuyas características limnológicas son muy distintas (Toja et al. en prensa). Se estudió a *Daphnia magna* en las dos lagunas, en el periodo comprendido entre el 4-12-1988 y el 17-3-1989. También se analizó a *Daphnia longispina* y *Ceriodaphnia reticulata*, pero solo en la laguna Dulce y desde Febrero a Marzo de 1989. El objetivo de este segundo tipo de muestreo, era determinar las variaciones en las distintas especies originadas por los cambios en el estado reproductivo de las poblaciones.

De cada laguna, el proceso de muestreo realizado en la zona litoral fue el siguiente:

- Toma de temperatura
- Para tener una estima cuantitativa del zooplancton existente, se filtraron tres litros de agua a través de una red de 31  $\mu\text{m}$  de poro, y posteriormente se conservaron en formol al 4%.
- Se midió la concentración de clorofila a. Para poder relacionarla con las medidas de proteínas, carbohidratos

y lípidos realizadas en el agua, 250 ml de agua eran previamente filtrados a través de un filtro de  $31 \mu\text{m}$ , analizando así sólo el fitoplancton que podía ser utilizado como alimento por los animales. Posteriormente esta agua se pasaba a través de un filtro Whatman GF/C de  $0.45 \mu\text{m}$  de poro y, usando metanol como disolvente, la extracción se realizó en frío, en la oscuridad, durante 24 horas. Para el cálculo de la concentración se empleó la fórmula dada por Talling y Driver (Vollenweider, 1969).

- Cuando se encontraba en la laguna a alguna de las especies elegidas para este trabajo, se cogían entre 10 y 24 individuos. Los animales se seleccionaban atendiendo a dos criterios: A) obtener un amplio rango de tamaño, y B) disponer de individuos tanto no grávidos como grávidos, así como de hembras con epípios. Inmediatamente, en el propio campo, se homogeneizaban y a renglón seguido se congelaban con nieve carbonica.
- También se tomaba una muestra de agua de 200 ml que se dividía en dos submuestras: una se filtraba a través de una red de  $31 \mu\text{m}$  y otra por un filtro de  $0.45 \mu\text{m}$ . Estas muestras se utilizaban para estimar la cantidad de proteína, carbohidrato y lípido, tanto particulado ( $31 \mu\text{m}$ ) como soluble ( $0.45 \mu\text{m}$ ) existente en la laguna. Estas muestras también se congelaban inmediatamente.

Una vez en el laboratorio, se realizaron los análisis de proteínas, carbohidratos y lípidos, tanto de los individuos de las distintas especies como de las muestras de agua.

Con las muestras fijadas en formol se realizó el recuento del número de individuos de las especies presentes, así como la cantidad de huevos y embriones de cada una de ellas. Con esto se obtuvo el índice HE, que es la cantidad de hembras/n° de huevos y embriones. Además se midieron todos los individuos presentes, dato necesario para calcular, en cada laguna por medio de la regresión obtenida entre tamaño-cantidad de proteínas por individuo, la cantidad de proteína total de la población (PTP). Se obtuvo así, una estima de la cantidad de proteínas/litro de cada una de las especies. Este parámetro es mejor indicador de la densidad de la población que el número total de individuos, ya que la talla media de las poblaciones, así como el estado reproductivo de los individuos, varía mucho. También se calculó la cantidad carbohidrato total de la población (CTP), así como la de los lípidos totales de la población (LTP), por medio de las regresiones entre tamaño-cantidad de carbohidrato por individuo y tamaño-cantidad de lípidos por individuo, obtenidas en cada laguna. Tanto el CTP como el LTP, no fueron usados como indicadores de la densidad de la población, como en el caso del PTP. Fueron calculados para poder determinar la fiabilidad de una serie de regresiones que se exponen en el capítulo final y por las que se puede calcular el PTP, CTP y LTP de las distintas especies.

En el último capítulo, en que se comparan los cladóceros con los rotíferos, se usó el volumen del cuerpo en vez de la longitud, debido a que se comparan distintas especies cuyas formas del cuerpo varían y, por lo tanto, la longitud puede ser menos real a la hora de comparar unas con otras.

El volumen de cada una de las distintas especies de cladóceros, se calculó a partir de las medidas expresadas en la Figura 4. Las fórmulas empleadas para el cálculo del volumen, estaban en función de la forma de cada una de las partes del cuerpo, y fueron sacadas de las fórmulas dadas por Ruttner-Kolisko (1977).

Cuerpo	Primer artejo de la 2 antena	Resto de artejos de la 2 antena	Espina caudal
$A=0.52 \cdot a \cdot b \cdot c$	$B= 0.4 \cdot a \cdot b \cdot c$	$C= 0.4 \cdot a \cdot b \cdot c$	$D= 0.26 \cdot a \cdot b^2$

El volumen total del cuerpo se obtiene sumando  $A+2B+4C+D$ . Anteriormente ya se habían realizado calculos de volúmenes en cladóceros (Lawrence et al., 1987) y estos autores usaron esta misma fórmula para el cuerpo, pero sin incluir en el cálculo las antenas y las espinas caudales.

A lo largo del trabajo, la suma de proteínas, carbohidratos y lípidos, se tomó como una estima de la biomasa. Logicamente, lo que se calcula de esta forma no es exactamente la biomasa, ya que se está considerando solo la parte orgánica. A pesar todo, como se verá mas adelante estos datos, aún siendo calculados de

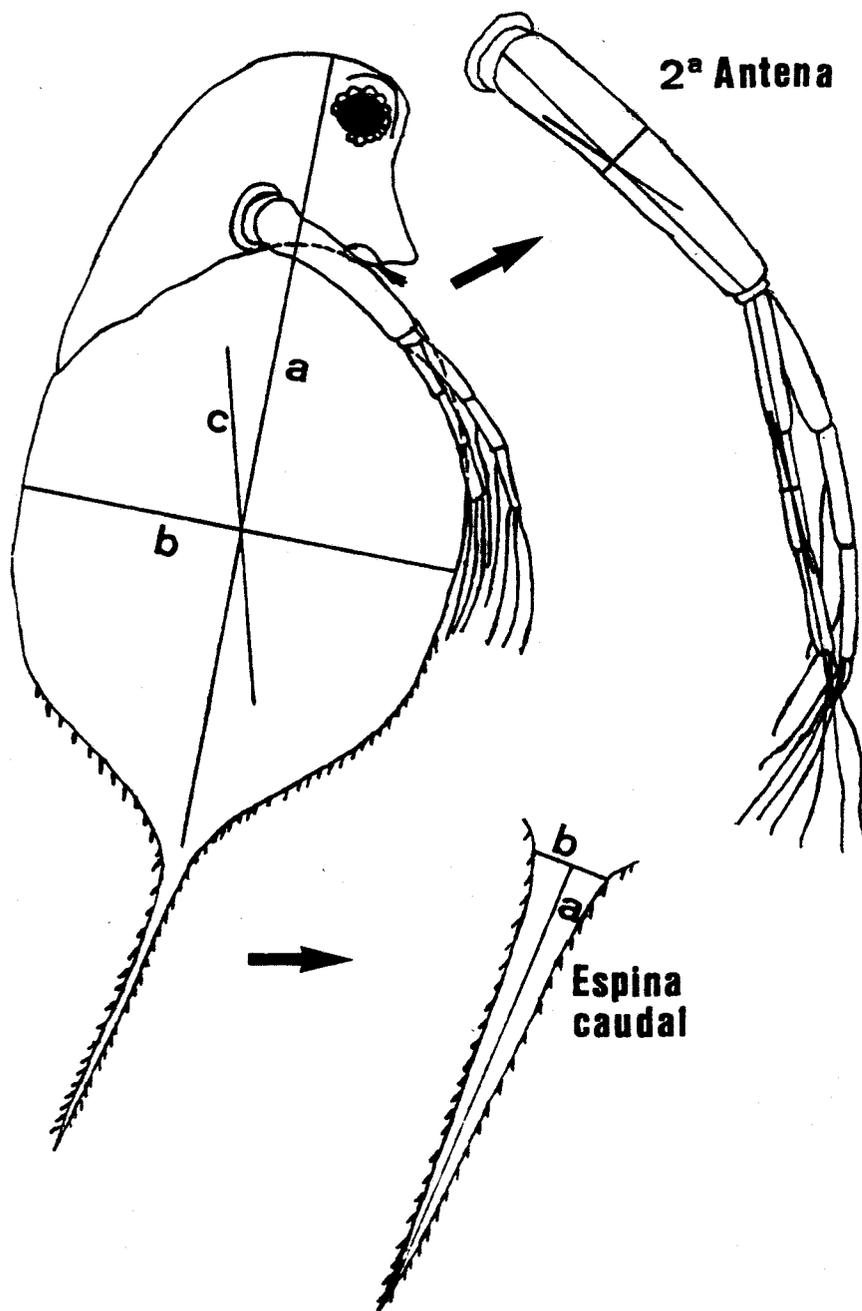


FIGURA 4. Dibujo esquemático de un cladócero, en el que se resaltan las medidas realizadas en el cuerpo, espina caudal y 2ª antena, para el cálculo del volumen total. En el caso de la 2ª antena, no se han representado los valores a, b y c, ya que es el mismo patrón, que en el caso del cuerpo.

este modo pueden tener alguna utilidad.

### III.2 Valores obtenidos en las distintas lagunas

En la Tabla 2 se representan los resultados obtenidos en las muestras de agua de todas las lagunas en todos los muestreos realizados. De estos datos se destacan dos puntos, que tendrán importancia a la hora de estudiar el comportamiento de los cladóceros.

En primer lugar, se observa como la mayor variación de las concentraciones se da entre distintas lagunas. Por ejemplo, los valores de proteína total presentan un rango que va desde 7.93 a 67.19  $\mu\text{g/ml}$ , los carbohidratos oscilan entre 2.58 a 113.2  $\mu\text{g/ml}$ , y los lípidos van desde 0 a 20.64  $\mu\text{g/ml}$ . Por el contrario, las variaciones en una misma laguna en el tiempo son mucho menos importantes. Por ejemplo en la Dulce, en el período que va desde el 4-12-88 a 17-3-89, la proteína total varió entre 8.07 a 16.33  $\mu\text{g/ml}$ , los carbohidratos desde 4.2 a 11.12  $\mu\text{g/ml}$  y los lípidos desde 0 a 15.96  $\mu\text{g/ml}$ . Este hecho es importante, ya que da lugar a que la influencia del alimento se detecte cuando se estudien diferentes lagunas, mientras que deja de ser tan importante si el estudio se centra en una laguna en concreto, ya que no se dan cambios importantes.

Tabla 2. Temperatura, clorofila y concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos, medidos en varias lagunas en distintas épocas del año.

FECHA	LAGUNA	TEMPERATURA °C	CLOROFILA a µg/L	PROTEINA			CARBOHIDRATO			LÍPIDO		
				Total µg/ml	Soluble µg/ml	Particulada µg/ml	Total µg/ml	Soluble µg/ml	Particulado µg/ml	Total µg/ml	Soluble µg/ml	Particulado µg/ml
28- 2-88	Santa Olalla	13	54.71	31.40	-	-	7.57	-	-	0.00	-	-
28- 2	Taraje	8	2.70	54.16	-	-	13.02	-	-	0.29	-	-
29- 2	Toro	8	25.83	42.90	-	-	16.50	-	-	7.19	-	-
29- 2	Ojillo	13	11.67	49.00	-	-	11.31	-	-	0.03	-	-
2- 3	Dulce	9	31.40	30.47	-	-	10.32	-	-	0.34	-	-
29-10	Palos	20	105.00	36.34	16.08	20.26	13.40	6.40	7.00	0.00	-	-
31-10	Taraje	25	319.70	67.19	22.72	44.47	113.20	25.87	87.33	7.27	1.21	6.06
4-12	Dulce	13	73.40	16.33	12.02	4.31	11.12	5.44	5.68	15.96	6.12	9.84
4-12	Santa Olalla	12	57.82	19.34	10.37	8.97	11.57	4.62	6.95	20.40	18.07	2.33
4-12	Taraje	15	2.22	22.54	20.85	1.69	12.85	-	-	20.64	16.34	4.30
5-12	Jiménez	8	6.67	11.69	11.42	.27	5.52	5.40	0.12	17.24	3.47	13.77
5-12	Navazo del Toro	16	1.00	7.93	6.05	1.88	2.58	-	-	15.01	11.66	3.35
20-12	Dulce	12	16.68	13.45	10.92	2.53	6.84	4.86	1.98	0.00	0.00	4.86
20-12	Santa Olalla	10	25.71	15.98	13.31	2.67	11.08	6.97	4.11	6.82	1.21	5.61
16- 1-89	Dulce	10	9.00	12.68	8.76	3.92	6.40	5.66	0.74	2.00	1.21	0.79
16- 1	Santa Olalla	10.5	19.70	15.91	12.75	3.16	9.38	8.57	0.81	6.10	1.86	4.24
6- 2	Dulce	10.5	9.73	8.07	6.95	1.12	7.01	5.72	1.29	6.93	2.14	4.79
6- 2	Santa Olalla	10	11.12	11.98	7.93	4.05	10.60	7.36	3.24	8.06	3.02	5.04
13- 2	Dulce	-	9.03	11.90	5.15	6.75	5.74	4.63	1.11	8.24	4.97	3.27
13- 2	Santa Olalla	-	6.25	17.88	13.38	4.50	9.89	7.22	2.67	7.51	2.14	5.37
20- 2	Dulce	-	6.25	11.97	9.53	2.44	5.26	4.39	0.87	3.89	0.84	3.05
20- 2	Santa Olalla	-	7.64	16.26	10.36	5.90	7.64	7.63	0.01	2.57	0.00	2.57
27- 2	Dulce	15	2.78	8.55	8.20	0.35	4.20	3.76	0.44	1.86	1.33	0.53
27- 2	Santa Olalla	15	9.03	10.92	9.11	1.81	7.15	5.58	1.57	3.32	1.86	1.46
9- 3	Dulce	17.5	4.17	9.32	3.50	5.82	7.77	6.62	1.15	6.44	4.53	1.91
9- 3	Santa Olalla	17	9.73	13.45	11.48	1.97	13.59	10.40	3.19	5.19	4.53	0.66
17- 3	Dulce	17	2.08	12.4	11.48	0.92	7.41	7.22	0.19	3.94	0.00	3.94
17- 3	Santa Olalla	17	9.73	15.42	15.00	0.42	10.41	8.89	1.52	8.42	8.05	0.37

El segundo factor a destacar, es que se observa una clara relación entre la cantidad de proteína particulada y la clorofila ( $r= 0.96$ ,  $p< 0.001$ ), entre clorofila y el carbohidrato particulado ( $r=0.96$ ,  $p< 0.001$ ) y, lógicamente, entre proteína particulada y carbohidrato particulado ( $r=0.92$ ,  $p< 0.001$ ). Por el contrario, no se encontró una relación entre clorofila y lípido particulado, lo que se debe a que este componente no aumenta en relación directa al incremento del fitoplancton, como ocurría con proteínas y carbohidratos sino, como es bien sabido, varía mucho en función de las condiciones externas siendo, por ejemplo, muy abundante en condiciones de stress por falta de nutrientes (Darley, 1982; Pick, 1987).

Por lo tanto de aquí se pueden extraer dos conclusiones importantes

- La fuerte relación entre la clorofila a con las proteínas y carbohidratos particulados del medio (la clorofila explica una gran proporción de la varianza encontrada en las proteínas y carbohidratos particulados), hace pensar que el alimento que existe en estas lagunas se debe principalmente al fitoplancton, y en menor grado a bacterias o detritos.
- Otro hecho importante es que a mayor cantidad de fitoplancton, mayor cantidad de proteínas y carbohidratos. Por lo tanto estos componentes nos informan sobre la cantidad de alimento, cosa que no ocurre con los lípidos. Esto puede ser importante, ya

que los organismos pueden responder solo a la cantidad de alimento y/o, además, a las características del mismo.

Por último hay que mencionar que la relación de la clorofila con la proteína y carbohidrato particulado, es muy semejante a la encontrada por Pick (1987) y, Cuhel y Lean (1987) en varios lagos de Canada.

### III.3 Estudio de las proteínas en individuos no grávidos de Daphnia magna.

En las experiencias en laboratorio, se observó que el contenido proteínico de *Daphnia magna* está relacionado con el tamaño y la cantidad de proteínas existentes en el medio. Del estudio realizado con los individuos no grávidos de *Daphnia magna* en las diferentes lagunas, se observa un patrón muy semejante al obtenido en el laboratorio (Tabla 3, Figura 5), las pendientes son significativamente distintas (ANCOVA,  $p < 0.001$ ) y la cantidad de alimento es la causante de las variaciones en las pendientes (ANCOVA,  $p < 0.001$ ).

A pesar de la semejanza de los resultados obtenidos en el campo y en el laboratorio, la ecuación desarrollada en el laboratorio para *Daphnia magna* (Ecuación 1), predice mal la cantidad de proteínas de los animales en el medio natural. Esto puede observarse en la Figura 6, donde se ve como, en la mayoría de los casos, para un mismo tamaño, los cladóceros de las

Tabla 3. Regresiones potenciales entre la cantidad de proteína/individuo ( $\mu\text{g}$ ) y la longitud ( $\mu\text{m}$ ) para *Daphnia magna*, a diferentes concentraciones de alimento en el campo.

Laguna	Proteína Total $\mu\text{g/ml}$	Constante A	Constante B	$r^2$	n
Taraje (P.N.D)	67.19	$5.35 \cdot 10^{-6}$	2.1	0.89	15
Arroyo Salado (SEVILLA)	46.08	$7.42 \cdot 10^{-6}$	2.03	0.96	11
Palos (HUELVA)	36.34	$3.93 \cdot 10^{-5}$	1.862	0.9	16
Santa Olalla (P.N.D)	31.4	$3.27 \cdot 10^{-5}$	1.858	0.96	11
Taraje (P.N.D)	22.54	$3.24 \cdot 10^{-5}$	1.8	0.97	15
Santa Olalla (P.N.D)	19.34	$1.37 \cdot 10^{-4}$	1.66	0.78	13
Dulce (P.N.D)	16.33	$5.82 \cdot 10^{-4}$	1.471	0.9	15
Santa Olalla (P.N.D)	15.98	$7.32 \cdot 10^{-5}$	1.41	0.86	16
Santa Olalla (P.N.D)	15.91	$1.22 \cdot 10^{-4}$	1.65	0.93	13
Dulce (P.N.D)	13.45	$9.94 \cdot 10^{-5}$	1.64	0.89	13
Dulce (P.N.D)	12.68	$4.18 \cdot 10^{-4}$	1.481	0.95	12

lagunas presentan mas proteínas que los analizados en el laboratorio. Las pendientes eran significativamente diferentes (ANCOVA  $p < 0.001$ ).

Las causas que dan lugar a esta situación pueden ser varias:

- a) Por un lado podría ser que la calidad del alimento sea mas completa en el medio natural.
- b) Otro hecho que podría influir es la presencia de peces. Es bien conocido que los peces consumen preferentemente los individuos de mayor talla (Hrbáček, 1958, visto en

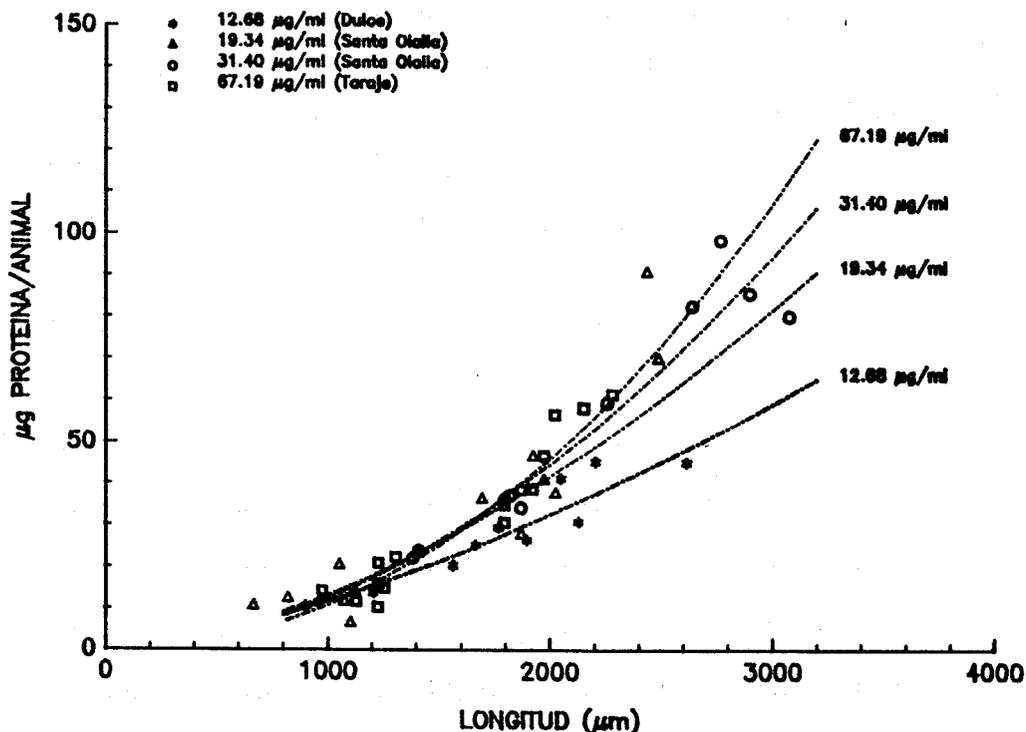


FIGURA 5. Relación entre la cantidad de proteína/individuo ( $\mu\text{g}$ ) y la longitud ( $\mu\text{m}$ ) en *Daphnia magna*, a cuatro concentraciones de proteína total en el agua. Datos obtenidos en el campo.

Wetzel, 1981; O'Brien et al., 1976; Wright y O'Brien, 1982). Esto da lugar a que los cladóceros presenten la estrategia de reducir el tamaño de la población, para así intentar evitar la depredación (Vanni, 1987). Esto origina que los animales maduren antes y, por lo tanto, alcanzan con un tamaño menor la misma cantidad de proteínas que antes le correspondía a un tamaño mayor.

c) Otra alternativa, sería que los animales en el medio natural son capaces de acceder a recursos que no tienen

en los cultivos.

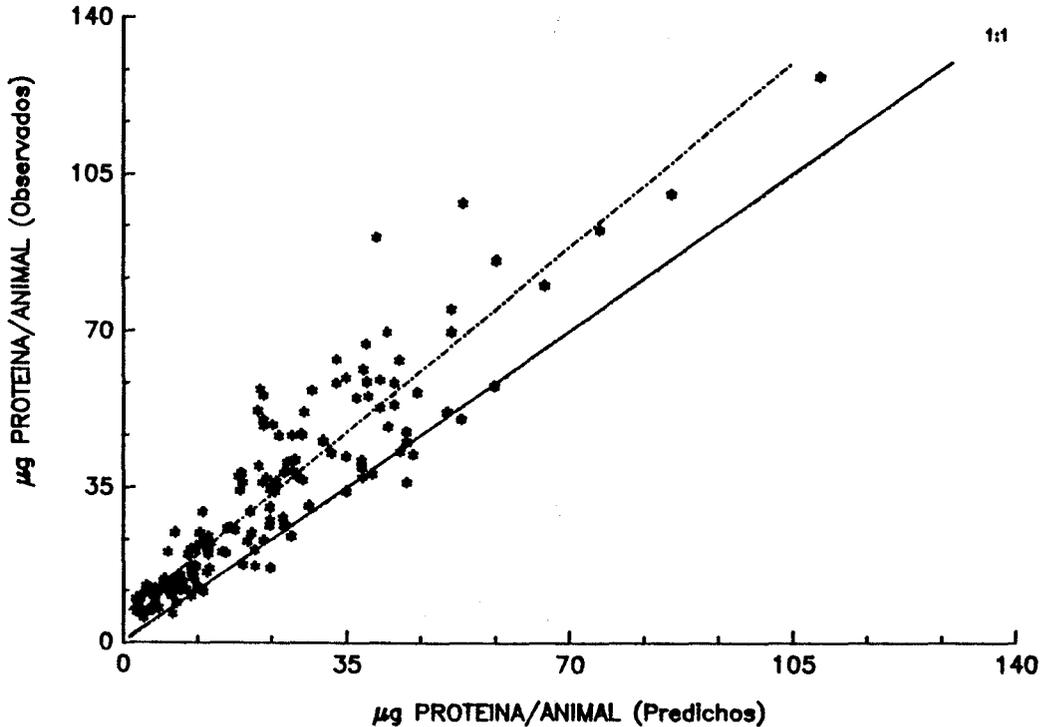


FIGURA 6. Comparación del contenido en proteínas en *Daphnia magna* en las lagunas muestreadas, con los predichos por la ecuación 1 (datos obtenidos en el laboratorio). Se indica la relación 1:1.

La primera opción es poco probable ya que, como se verá mas adelante, los animales parecen responder basicamente a la cantidad del alimento.

La segunda alternativa tampoco parece ser la causante ya que las poblaciones de cladóceros que se encuentran en las lagunas, no parecen estar afectadas por una fuerte depredación, como lo demuestra el hecho de que no exista una sustitución de

especies grandes, como *Daphnia magna* y *Daphnia longispina*, por otras mas pequeñas, como *Ceriodaphnia reticulata*, situación característica cuando el factor depredación esta jugando un papel importante (Langeland, 1982).

La tercera opción parece ser la mas verosimil. Se ha observado que *Daphnia magna* puede alimentarse de perifiton o detritos que se encuentran en el sedimento o sujetos a diferentes superficies. Este fenómeno fue llamado "browsing" por McMahon y Regler (1963). Horton et al. (1979) destacaron la ventaja competitiva de algunas especies de *Daphnia*, entre las cuales se encontraba *D. magna*, al poder explotar estos recursos.

Debido a esto se desarrolló un nuevo modelo con los datos obtenidos en el campo (Figura 7)

$$(2) \ln P = -9.52 + 1.622 \cdot \ln L + 0.247 \cdot \ln C$$

(n=246, r<sup>2</sup>= 0.86, MS= 0.076, F= 734, p< 0.001)

Donde P =  $\mu\text{g}$  proteína/individuo, L = longitud en  $\mu\text{m}$ , y C =  $\mu\text{g}$  proteína total/ml.

Aquí es necesario hacer un inciso, para comentar el por qué en la regresión anterior (ecuación 2), se han usado las proteínas totales como variable independiente. Esto se debe a que, como ya se comentó anteriormente, la ecuación es mas predictiva que si se utiliza la proteína particulada:

$$\ln P = -8.88 + 1.61 \cdot \ln L + 0.093 \cdot \ln Ct$$

(n=246, r<sup>2</sup>= 0.84, MS= 0.083, F= 598, p< 0.001)

Ct =  $\mu\text{g}$  de proteína particulada/ml.

Este hecho se repite con las otras especies estudiadas, y, a su vez, también ocurre cuando se estudian los carbohidratos y los lípidos. Debido a esto, a lo largo del trabajo se ha optado por utilizar las proteínas, carbohidratos y lípidos totales en vez de los particulados.

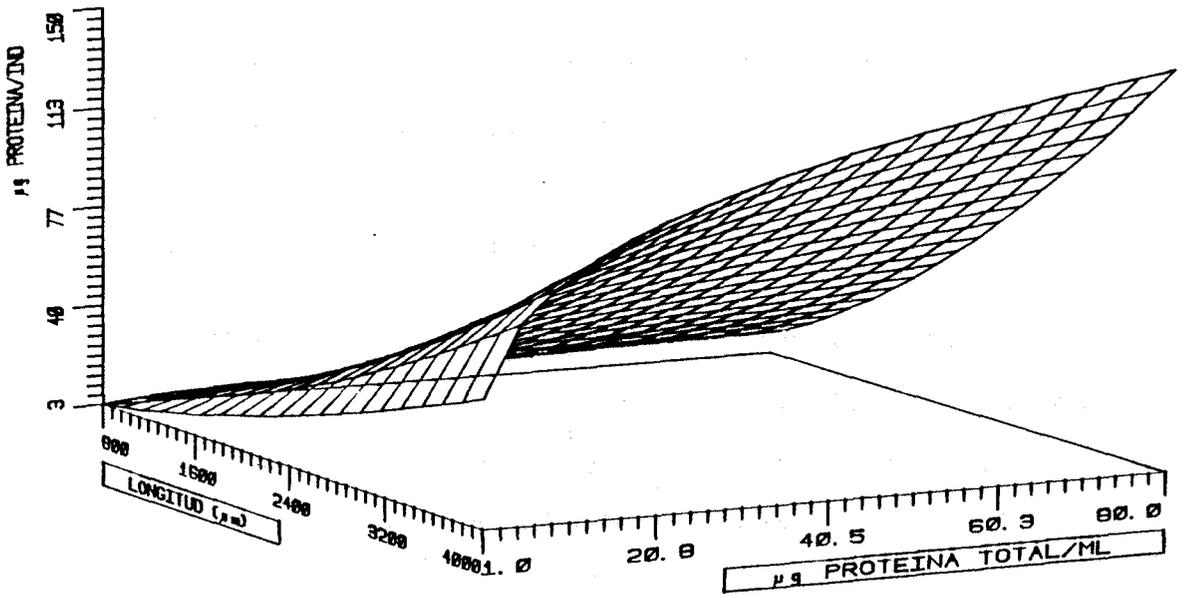


FIGURA 7. Cambios en el contenido en proteínas de *Daphnia magna* en relación con la longitud y con la concentración de proteínas totales del agua (ecuación 2), observados en las experiencias de campo.

Una pregunta que puede surgir aquí es, ¿por qué la fracción total es mejor indicador del alimento disponible, que la fracción particulada? Esto puede deberse a que los animales son capaces de utilizar bacterias o partículas de detritus, que pasan a través del filtro de  $0.45 \mu\text{m}$ . Esto daría lugar a que la fracción considerada como soluble no sería del todo correcta, ya que podría estar incluyendo algunas partículas. Por otro lado, está el hecho de que la fracción total está compuesta por una gran proporción de soluble, que los cladóceros no son capaces de utilizar. Por lo tanto, al considerar en este trabajo la proteína total como indicador del alimento, se está sobreestimando el alimento de que disponen los animales. Esto no es un problema en sí, ya que el objetivo prioritario de este trabajo es estimar el contenido en proteínas en los animales, y no determinar el alimento de que disponen. Como se vió anteriormente, el alimento que los animales son capaces de usar es muy difícil de cuantificar, ya que parecen que pueden explotar recursos como por ejemplo el bentos que no son fáciles de medir.

A pesar de que, no se pueden hacer comparaciones entre el alimento de que disponen en los cultivos y en el medio natural, si es posible determinar si los animales en las lagunas, alcanzaron su máximo contenido en proteínas. Se puede concluir que, los individuos en las lagunas no están en condiciones óptimas de alimento, ya que tan sólo en Taraje cuando la concentración de proteínas totales en el medio era de 67.19

$\mu\text{g/ml}$ , los individuos tenían un contenido en proteínas similar al óptimo que se observó en los animales cultivados en el laboratorio.

Para ver, si la cantidad de carbohidrato total o los lípidos totales, también estaban relacionados con las proteínas de los individuos, se hicieron nuevas regresiones que están expresadas en la Tabla 4. Se observa que tanto el carbohidrato como los lípidos del medio, están relacionados con las proteínas de los individuos, aunque son peores predictores (MS mayor) que la cantidad de proteínas totales (ecuación 2).

TABLA 4.- Regresiones obtenidas para *Daphnia magna* entre Ln P ( $\mu\text{g}$  proteína/individuo), con el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) y con las proteínas, carbohidratos (Ch) y lípidos totales ( $\mu\text{g/ml}$ ) existentes en el agua.

Cte	Variables				r <sup>2</sup>	MS	F	
	ln Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido				
-9.137	*** 1.628	***		*** 0.122	0.84	0.087	626	
-8.815	*** 1.626	***			** -0.022	0.83	0.09	597
-9.52	*** 1.618	*** 0.319	***	-0.074	0.86	0.075	494	
-9.498	*** 1.624	*** 0.237	***		-0.008	0.86	0.076	490
-9.52	*** 1.618	*** 0.32	***	-0.074	0.0002	0.86	0.076	369

\* p < 0.05  
 \*\* p < 0.01  
 \*\*\* p < 0.001

Es importante resaltar, que los lípidos están relacionados de forma inversa con las proteínas de los individuos en el caso de *D. magna*. Esto puede ser debido, a que los lípidos son mas abundantes cuando las condiciones para el fitoplancton no son idóneas y, por lo tanto, existe menor cantidad de algas aunque, en proporción, aumentan los lípidos.

Otra prueba de que la cantidad de proteínas es mejor indicador, son las ecuaciones en las que se incluye a los carbohidratos o los lípidos, junto a las proteínas (Tabla 4). En ellas se ve que, cuando se incluye a las proteínas en la ecuación, tanto los carbohidratos como los lípidos dejan de ser significativos.

Por lo tanto, el contenido proteínico en los animales no grávidos de *D. magna*, viene determinado preferentemente por la cantidad de alimento, y no por la calidad del mismo. Es necesario recordar que, logicamente, *D. magna* sí está influenciada por el tipo de alimento, en lo que se refiere al tamaño del mismo, pero este efecto se corrige por el propio método, ya que solo se mide la proteína que pasa a través de 31  $\mu\text{m}$  de poro, y por lo tanto es alimento que es disponible para los animales.

En resumen, el contenido en proteína de los animales no grávidos en *D. magna*, puede ser facilmente calculado en el campo. Además, es proporcionalmente mayor que el de los animales cultivados en laboratorio, posiblemente por la mayor

cantidad de recursos que pueden explotar en una laguna. La cantidad y no la calidad del alimento disponible, es el factor determinante en el contenido proteínico de los animales. Por último, en la mayoría de las lagunas muestreadas *Daphnia magna*, no suele presentar un óptimo contenido en proteínas.

#### III.4 Variación de las proteínas en individuos no grávidos de otras especies de cladóceros.

Como ya se mencionó, para comprobar si los resultados obtenidos con *Daphnia magna* no eran un caso aislado, se analizaron otras especies de cladóceros. Para *Daphnia longispina*, se observa que el contenido en proteínas de los animales, también está fuertemente relacionado con el tamaño y la cantidad de proteínas totales del agua.

$$(3) \ln P = -9.801 + 1.614 \cdot \ln L + 0.445 \cdot \ln C$$

(n= 32, r<sup>2</sup>= 0.75, MS= 0.045, F= 48.8, p< 0.001)

A su vez los resultados obtenidos con los carbohidratos y los lípidos, sigue un patrón muy parecido al obtenido con *Daphnia magna* (Tabla 5).

Para *Ceriodaphnia reticulata* el contenido en proteínas de los individuos, también se puede predecir en función del tamaño y las proteínas totales del medio.

$$(4) \ln P = -12.378 + 1.839 \cdot \ln L + 0.872 \cdot \ln C$$

(n= 73, r<sup>2</sup>= 0.85, MS= 0.06, F= 204, p< 0.001)

TABLA 5.- Regresiones obtenidas para *Daphnia longispina* entre Ln P ( $\mu\text{g}$  proteína/individuo), con el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) y con las proteínas, carbohidratos (Ch) y lípidos totales ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) existentes en el agua.

Cte	Variables				$r^2$	MS	F
	ln Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido			
-8.301	1.424		0.514*		0.54	0.084	19
-8.91	1.649			-0.078***	0.7	0.054	37
-9.807	1.594	0.428	0.102		0.75	0.046	31
-10.017	1.595	0.581*		0.028	0.75	0.046	31
-10.03	1.574	0.567*	0.106	0.029	0.74	0.047	23

\*  $p < 0.05$   
 \*\*  $p < 0.01$   
 \*\*\*  $p < 0.001$

La cantidad de carbohidratos y lípidos totales también están relacionados, pero no aportan nada a la predicción de la variable dependiente (P), cuando en la ecuación se incluye a las proteínas del agua (Tabla 6).

Por lo tanto, todo lo discutido anteriormente para *Daphnia magna*, también puede ser aplicado a estas especies. En definitiva, la cantidad de proteína de los cladóceros planctónicos puede ser fácilmente estimada a partir de la concentración de proteínas en el agua, y además depende de la cantidad de alimento y no de la calidad del mismo.

TABLA 6.- Regresiones obtenidas para *Ceriodaphnia reticulata* entre Ln P ( $\mu\text{g}$  proteína/individuo), con el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) y con las proteínas, carbohidratos (Ch) y lípidos totales ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) existentes en el agua.

Cte	Variables				$r^2$	MS	F	
	ln Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido				
-9.913	*** 1.572	***		*** 0.856	0.67	0.13	75	
-8.778	*** 1.673	***			*** -0.167	0.33	0.27	18
-12.28	*** 1.827	*** 0.82	***	0.069	0.84	0.061	135	
-12.37	*** 1.828	*** 0.891	***		0.013	0.85	0.061	135
-12.289	*** 1.818	*** 0.841	***	0.063	0.011	0.85	0.062	100

\*  $p < 0.05$   
 \*\*  $p < 0.01$   
 \*\*\*  $p < 0.001$

Ahora bien ¿qué ocurrirá cuando se estudie una especie bentónica como *Simocephalus exspinosus*? La respuesta está en la siguiente relación, ilustrada en la Figura 8:

$$(5) \ln P = -4.783 + 1.355 \cdot \ln L - 0.391 \cdot \ln C$$

( $n = 41$ ,  $r^2 = 0.85$ ,  $MS = 0.038$ ,  $F = 117$ ,  $p < 0.001$ )

El resultado que se obtiene es interesante. Al contrario de lo que ocurría con las especies planctónicas, los individuos de *Simocephalus exspinosus*, disminuyen su contenido en proteínas cuando incrementa la concentración de proteínas en el agua. Naturalmente, en este caso las proteínas existentes en el

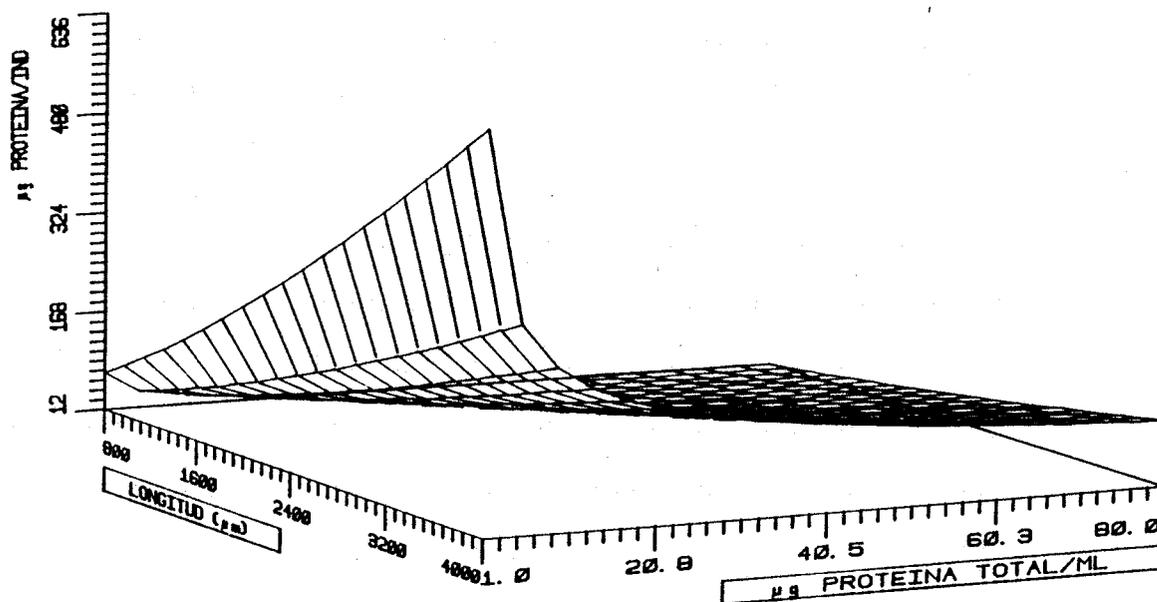


FIGURA 8. Cambios en el contenido en proteínas en *Simocephalus exspinosus* en relación con la longitud y con la concentración de proteínas totales del agua (ecuación 5), observados en las experiencias de campo.

plancton, no se corresponden con el alimento disponible para *Simocephalus exspinosus*, pero si son un buen indicador de la cantidad de fitoplancton, detritus, bacterias, etc. Una explicación a este hecho, es que el plancton puede ejercer un efecto pantalla sobre el fitobentos. Otro factor que puede estar influyendo es que, cuando el plancton disminuye, puede haber un incremento de la deposición de partículas en el bentos, aumentando así las disponibilidades de alimento para los cladóceros bentónicos.

Otros parámetros podrían estar interfiriendo esta relación, pero lo interesante es observar la divergencia exhibida por *Simocephalus exspinosus* frente a los cladóceros planctónicos. Al haber estudiado una especie bentónica solamente (ya que era la única que presentaba efectivos suficientes en las lagunas estudiadas), estas conclusiones no se pueden generalizar a los demás cladóceros bentónicos.

Con estos datos, también se puede hacer una serie de comparaciones interesantes. como *D. magna* presenta un rango de tamaño similar al de *Simocephalus exspinosus*, el modelo desarrollado para *D. magna* (ecuación 2) se aplicó a los individuos de *S. exspinosus* con el fin de ver si su contenido en proteínas era equivalente al observado en *D. magna*. En la Figura 9 se observa como *S. exspinosus* a igualdad de tamaño tiende a presentar una mayor cantidad de proteínas que *D. magna*. Esto puede deberse a que en el bentos existe mas alimento que el plancton y *S. exspinosus* está especializado en una alimentación bentónica y aunque, *D. magna* es capaz de explotar estos recursos, está mucho menos especializado. Por lo tanto a pesar de que las condiciones se le hagan desfavorables a *S. exspinosus* (que el plancton sea muy abundante), siempre parece tener mas alimento disponible que *D. magna*.

Un argumento que podría hacerse en contra, a la hora de poder hacer comparaciones entre *S. exspinosus* y *D. magna*, es que el primero tiene una duración de vida mas larga. Este factor podría no estar afectando, ya que se ha demostrado por

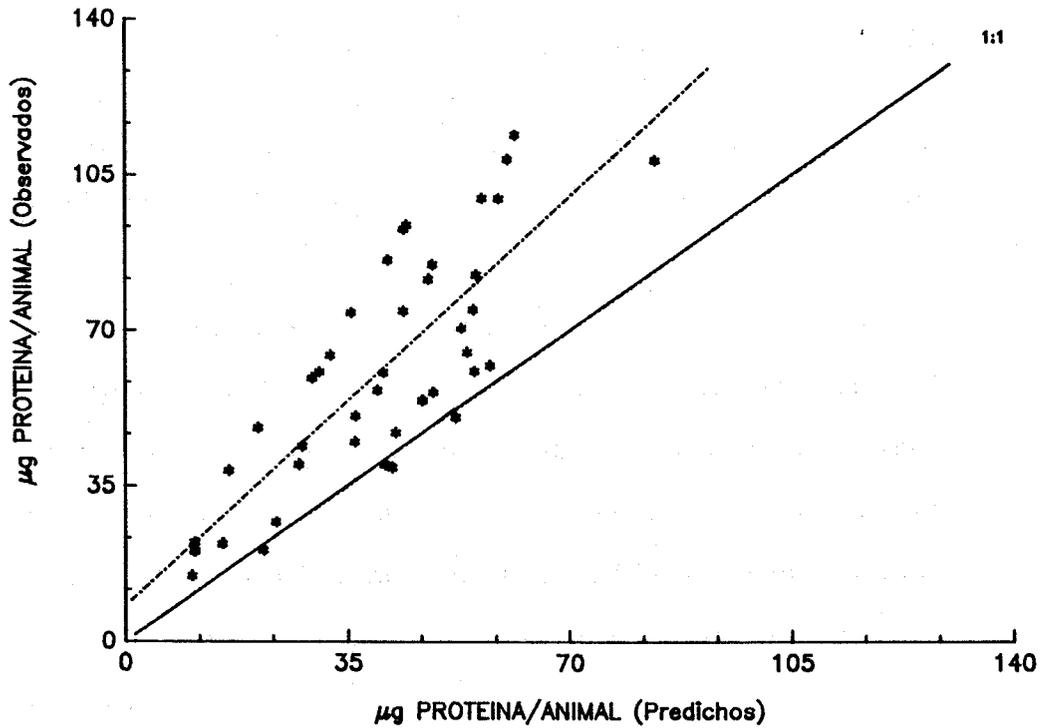


FIGURA 9. Comparación del contenido en proteínas medidas en *Simocephalus exspinosus* en las lagunas muestreadas, con los predichos a partir del modelo desarrollado con los datos de campo de *Daphnia magna* (ecuación 2). Se indica la relación 1:1.

medio de experiencias en el laboratorio que, el desarrollo en varias especies de cladóceros, está en función directa del tamaño y no de la edad (Taylor, 1985). Demostrar este hecho en el medio natural es mucho mas difícil, y por lo tanto no se puede descartar la idea de que las diferencias encontradas se deban a las diferencias en la longitud del ciclo de vida de ambas especies.

### III.5 Carbohidratos y Lípidos en individuos no grávidos

Las variaciones en carbohidratos y lípidos en los animales no grávidos, lógicamente, no son tan importantes como en los individuos que llevan huevos y embriones. Se ha realizado su estudio con el objetivo principal de obtener ecuaciones para poder predecir el contenido en carbohidratos y lípidos de los animales. A pesar de esto, su análisis ya revela algunas indicaciones importantes de como utilizan los cladóceros las sustancias de reserva en función de las condiciones ambientales, lo que se verá mas claro cuando se analicen los animales grávidos.

#### III.5.1 Parámetros poblacionales.

Para poder entender bien como cambian las sustancias de reserva en los cladóceros, es necesario fijarse en parámetros poblacionales como la relación número de hembras/huevos o embriones (HE), y la cantidad de proteínas totales de la población (PTP), ya que la dinámica de estos compuestos no viene determinada sólo por el alimento, como ocurría con las proteínas.

En las Tablas 7, 8 y 9 se dan los valores de HE y PTP (incluyendo animales grávidos y no grávidos) encontrados para las tres especies de cladóceros planctónicos estudiadas en las distintas lagunas. Estos valores se analizarán con mayor detalle al considerar individuos grávidos.

TABLA 7.- Valores obtenidos para *Daphnia magna* de la relación número de hembras/huevos y embriones (HE) y la proteína total de la población (PTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año.

Fecha	Laguna	Proteína Total $\mu\text{g/ml}$	HE	PTP $\mu\text{g/l}$
28- 2-88	Taraje	54.16	10	931
4-12-88	Taraje	22.54	117	556.3
4-12-88	Dulce	16.33	9	286.9
20-12-88	Dulce	13.45	1	1030.5
16- 1-89	Dulce	12.68	10	349
6- 2-89	Dulce	8.07	17.4	834
13- 2-89	Dulce	11.9	36	161.9
20- 2-89	Dulce	11.97	1.35	336.3
27- 2-89	Dulce	8.55	311	1194.2
9- 3-89	Dulce	9.32	104	658.3
17- 3-89	Dulce	12.4	44.3	971.2
28- 2-88	Santa Olalla	31.4	2.9	470
4-12-88	Santa Olalla	19.34	19.5	338.1
20-12-88	Santa Olalla	15.98	9	430.4
16- 1-89	Santa Olalla	15.91	10.5	223.4
6- 2-89	Santa Olalla	11.98	13.1	371.4
13- 2-89	Santa Olalla	17.88	31.5	631.3
20- 2-89	Santa Olalla	16.26	9.5	2060.1
27- 2-89	Santa Olalla	10.92	30.3	3176.5
9- 3-89	Santa Olalla	13.45	30.6	2049.4
17- 3-89	Santa Olalla	15.42	42	400.6

TABLA 8.- Valores obtenidos para *Daphnia longispina* de la relación número de hembras/huevos y embriones (HE) y la proteína total de la población (PTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año.

Fecha	Laguna	Proteína Total $\mu\text{g/ml}$	HE	PTP $\mu\text{g/l}$
28- 2-88	Santa Olalla	31.4	3.7	1948
6- 2-89	Dulce	8.07	4.5	1526.7
13- 2-89	Dulce	11.9	3.0	567.1
20- 2-89	Dulce	11.97	6.3	439.6
27- 2-89	Dulce	8.55	3.7	1144.9
9- 3-89	Dulce	9.32	6.8	196.1

TABLA 9.- Valores obtenidos para *Ceriodaphnia reticulata* de la relación número de hembras/huevos y embriones (HE) y la proteína total de la población (PTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año.

Fecha	Laguna	Proteína Total $\mu\text{g/ml}$	HE	PTP $\mu\text{g/l}$
29- 2-88	Ojillo	49	2.3	1142
29- 2-88	Toro	42.9	4.1	7279.9
2- 3-88	Dulce	30.47	3	28.7
20- 2-89	Dulce	11.97	1	12.8
27- 2-89	Dulce	8.55	1.4	37.2
9- 3-89	Dulce	9.32	1	31.7
17- 3-89	Dulce	12.4	22	30.4

### III.5.2 Carbohidratos.

La variación en los carbohidratos en *D. magna*, pone de manifiesto lo mencionado en el apartado anterior, ya que la ecuación que mejor predice la cantidad de carbohidrato de los animales, es aquella en la que se incluye el HE:

$$(6) \ln (C+1) = -0.407 + 0.00086 \cdot L - 0.0019 \cdot HE$$

(n= 137, r<sup>2</sup>= 0.75, MS= 0.13, F= 205, p< 0.001)

TABLA 10.- Coeficientes de las regresiones múltiples realizadas para predecir el Ln Carbohidrato en *Daphnia magna*, n=137.

Cte	Variables						r <sup>2</sup>	MS	F	
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	HE	ln PTP				
-0.71	**	***	0.116				0.65	0.19	141	
-0.76	***	***		0.159	*		0.66	0.18	146	
-0.347	***	***			-0.035	*	0.65	0.19	141	
-1.106	***	***				0.096	0.74	0.14	193	
-1.01	***	***			-0.02	***	0.095	0.76	0.13	144

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

Se observa, como a mayor número de huevos o embriones por hembra, el contenido en carbohidratos es mayor. Se pueden resaltar otras características cuando se observa la influencia del resto de parámetros (Tabla 10). Se ve como la cantidad de alimento ya no es tan importante como ocurría con las proteínas,

teniendo ahora también relevancia la calidad del mismo. Al igual que ocurría con las proteínas, los carbohidratos están relacionados positivamente con las proteínas y carbohidratos del medio, y negativamente con los lípidos.

TABLA 11.- Coeficientes de las regresiones múltiples realizadas para predecir el Ln (Carbohidrato + 1) en *Daphnia longispina*, n= 33.

Cte	Variables						r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE	ln PTP			
-0.772 *	0.0005 **	0.24 *					0.32	0.05	8
0.581	0.0004 **		0.37				0.21	0.06	5
-0.12	0.0005 **			-0.061 *			0.28	0.06	7
0.415	0.0006 ***				-0.492 ***		0.46	0.04	15
-1.87 **	0.0007 ***					0.211 ***	0.41	0.05	12

\* p < 0.05  
 \*\* p < 0.01  
 \*\*\* p < 0.001

Para *D. longispina* se obtienen unos resultados muy semejantes a los de *D. magna* (Tabla 11). Los parámetros poblacionales son los que mejor explican la variación en el contenido de carbohidratos y, en este caso, la inclusión en la ecuación del PTP, mejora el nivel predictivo de la misma:

$$(7) \ln (C+1) = -0.954 + 0.00081 \cdot L - 0.385 \cdot \ln HE + 0.149 \cdot \ln PTP$$

(n= 33, r<sup>2</sup>= 0.56, MS= 0.036, F= 14, p < 0.001)

En el caso de *C. reticulata*, la situación cambia un poco, ya que la ecuación mas predictiva es la que incluye a la cantidad de carbohidratos y lípidos totales del medio (Tabla 12):

$$(8) \ln (C+1) = -0.383 + 0.001 \cdot L - 0.103 \cdot \ln CH - 0.04 \cdot \ln LP$$

(n= 29, r<sup>2</sup>= 0.62, MS= 0.01, F= 16, p< 0.001)

CH = cantidad de carbohidratos totales en el medio (μg/ml)

LP = cantidad de lípidos totales en el medio (μg/ml)

TABLA 12.- Coeficientes de las regresiones múltiples realizadas para predecir el Ln (Carbohidrato + 1) en *Ceriodaphnia reticulata*, n 29.

Cte	Variables						r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE	ln PTP			
-0.4	*	0.0009	***	0.087	*		0.5	0.01	15
-0.364	*	0.0008	***	0.128	**		0.56	0.01	19
-0.192		0.001	***		**	-0.053	0.54	0.01	17
-0.084		0.0007	***			0.029	0.44	0.01	12
-0.166		0.0008	***			0.014	0.44	0.01	12

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

En resumen, la evolución de los carbohidratos en los animales no grávidos, es muy semejante a la de las proteínas; aumentan cuando el alimento se incrementa y disminuyen cuando

las condiciones son menos favorables. Sin embargo, la cantidad de alimento, ya no es el factor determinante, sino que también influye la calidad del mismo (proporción de proteínas, carbohidratos y lípidos). Por otro lado, presentan una diferencia con respecto a las proteínas, ya que, como los cladóceros pueden usar los carbohidratos como sustancias de reserva, estos están influenciados por parámetros como el número de huevos o embriones y la densidad de población.

### III.5.3 Lípidos.

Los lípidos son la principal sustancia de reserva en cladóceros (Tessier y Goulden, 1982; 1987; Tessier et al., 1983; Hoenicke y Goldman, 1987). Aunque el uso de los lípidos por parte de los cladóceros, se verá mas claro cuando se estudien los animales grávidos, con los no grávidos ya se pueden adelantar algunas conclusiones importantes.

La ecuación que mejor explica la variación de los lípidos en *D. magna* es la que incluye a las proteínas existentes en el agua (C) y al HE:

$$(9) \ln (T+1) = 0.127 + 0.001 \cdot L - 0.017 \cdot C - 0.116 \cdot \ln HE$$

$$(n= 135, r^2= 0.76, MS= 0.2, F= 141, p < 0.001)$$

T= contenido en lípidos en los animales ( $\mu\text{g}/\text{individuo}$ )

Vemos como, logicamente, al igual que ocurría con los carbohidratos, una mayor presencia de huevos y embriones va asociada a un mayor contenido en lípidos en los animales. Pero lo mas interesante, es que los lípidos aumentan a medida que la disponibilidad de alimento (expresada por la concentración de proteínas totales en el agua) es menor. Esto como se verá mas adelante, también ocurre con los animales grávidos y, por lo tanto, *D. magna* acumula mas lípidos para su descendencia cuando las condiciones externas de alimento no son tan favorables.

TABLA 13.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Lípidos en *Daphnia magna*, n= 135.

Cte	Variables						r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	Proteína	Ch	ln Lípido	ln HE	ln PTP			
* -0.282	*** 0.001	*** -0.013					0.73	0.23	183
* -0.392	*** 0.001		-0.008				0.7	0.24	164
*** -0.475	*** 0.001			0.007			0.7	0.24	163
-0.211	0.001	***			** -0.083		0.72	0.23	177
-0.319	0.001	***				-0.023	0.7	0.24	163

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

Según esto, usan los lípidos de forma inversa a como utilizan las proteínas y los carbohidratos. En la Tabla 13 se ve como el contenido en lípidos/individuo está relacionado negativamente con la cantidad de carbohidratos y proteínas del

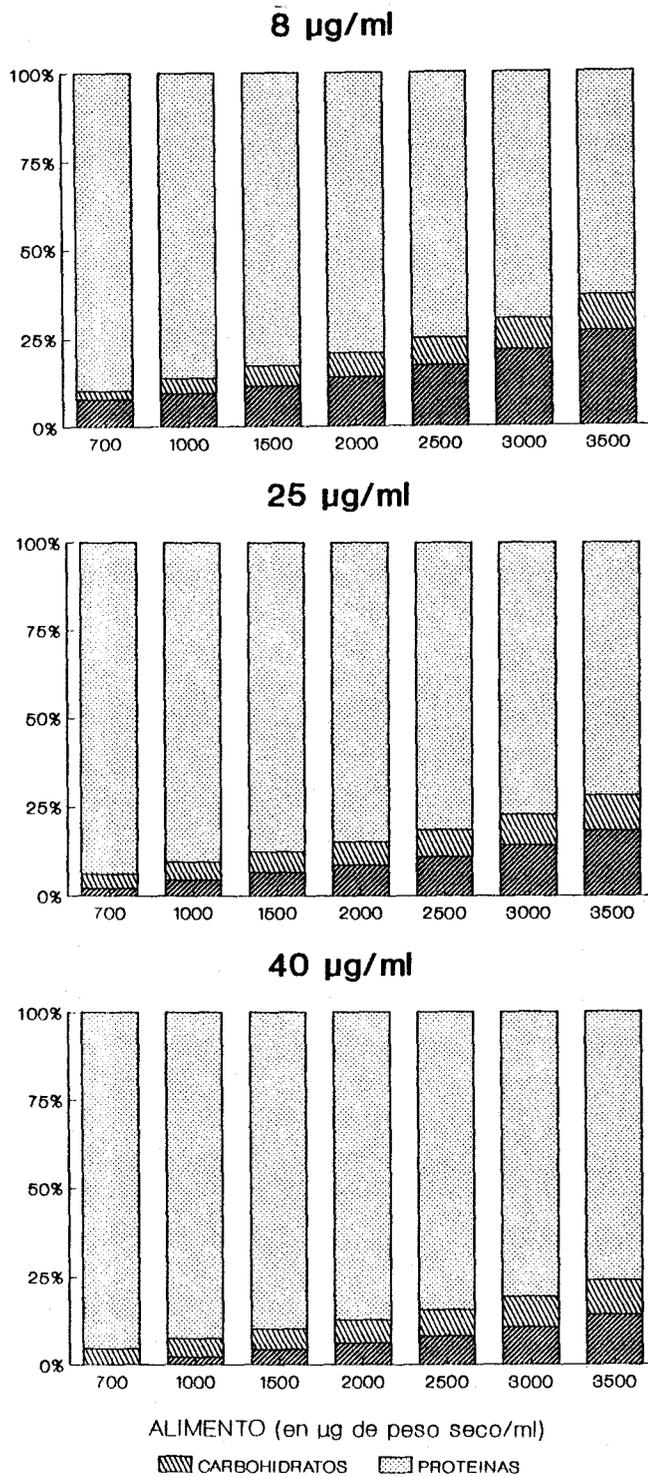


FIGURA 10. Proporción (en %) de proteínas, carbohidratos y lípidos en individuos de distinto tamaño de *Daphnia magna* desarrollados en diferentes concentraciones de alimento (expresado por la concentración de proteínas totales en el medio).

medio y, por el contrario, de forma positiva con los lípidos del medio. Como ya se dijo anteriormente, los carbohidratos y las proteínas del agua aumentan al aumentar la cantidad de alimento en el agua, mientras que un aumento de los lípidos va relacionado con un descenso del alimento. Por lo tanto, la relación positiva encontrada con el contenido en lípidos/individuo y los lípidos existentes en el medio, se debe mas a que es un indicador de falta de alimento, que a que aprovechen los lípidos existentes.

TABLA 14.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Lípidos en *Daphnia longispina*, n= 32.

Cte	Variables						r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	Proteína	Ch	ln Lípido	HE	ln PTP			
0.293	0.0005 <sup>**</sup>	-0.02					0.21	0.11	6
0.428	0.0006 <sup>**</sup>		-0.068				0.15	0.12	4
-0.198	0.0006 <sup>**</sup>			0.129 <sup>**</sup>			0.27	0.1	8
0.328	0.0005 <sup>*</sup>				-0.052		0.16	0.14	4
-0.49	0.0007 <sup>**</sup>					0.0002	0.19	0.14	4

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

La relación entre el alimento y las proteínas, carbohidratos y lípidos en los animales no grávidos de *D. magna* queda bien resumida en la Figura 10. Se ve claramente como, al disminuir el alimento, la estrategia de *D. magna* es acumular

mas lípidos.

D. longispina presenta de nuevo un comportamiento muy semejante al de D. magna (Tabla 14). Aunque en este caso, los lípidos existentes en el agua son mejores predictores que las proteínas:

$$(10) \ln (T+1) = -0.852 + 0.0008 \cdot L + 0.15 \cdot \ln LP + 0.0003 \cdot \ln PTP$$

$$(n= 32, r^2= 0.38, MS= 0.1, F= 7, p < 0.001)$$

TABLA 15.- Coeficientes de las regresiones múltiples realizadas para predecir el Ln (Lípidos + 1) en Ceriodaphnia reticulata, n= 30.

Cte	Variables						r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	Proteína	Ch	ln Lípido	ln HE	ln PTP			
-0.265	0.001 *	-0.0013					0.1	0.08	2
-0.169	0.0009		-0.008				0.11	0.08	3
-0.319	0.001 *			-0.013			0.1	0.08	2
-0.036	0.0008				-0.026		0.15	0.08	3

\* p < 0.05  
 \*\* p < 0.01  
 \*\*\* p < 0.001

C. reticulata debido a su pequeño tamaño, tiene un bajo contenido en lípidos, y esto hace que los errores sean mayores y las ecuaciones no sean tan predictivas (Tabla 15). La ecuación que incluye al HE, es la que explica una mayor varianza de los resultados obtenidos:

$$(11) \ln (T+1) = -0.036 + 0.0008 \cdot L - 0.14 \cdot \ln HE$$

(n= 30,  $r^2= 0.33$ , MS= 0.06, F= 8,  $p < 0.001$ )

Estas tendencias encontradas, que se han expuesto resumidamente a modo de adelanto, se analizan con mas detalle en el siguiente apartado.

### III.6 Animales grávidos

En el apartado anterior, se ha observado como la variación en el contenido en proteínas de los animales no grávidos, está basicamente influenciada por la disponibilidad de alimento, mientras que los carbohidratos y los lípidos de los individuos no estaban tan influenciados. En el caso de los animales grávidos, la situación cambia y el alimento no es tan importante, incluso, para el contenido de proteínas de los individuos. En la Figura 11, se observa como el contenido en proteínas de los animales grávidos, varía mucho de unas lagunas a otras (ANCOVA,  $p < 0.001$ ), pero el alimento ya no es el factor principal que está provocando estas diferencias (ANCOVA,  $p > 0.1$ ). Por lo tanto, deben estar interviniendo otros factores y, debido a la gran importancia que tiene la evolución de los individuos grávidos en la dinámica de la población, es de gran interés poder determinar cuales son estos factores.

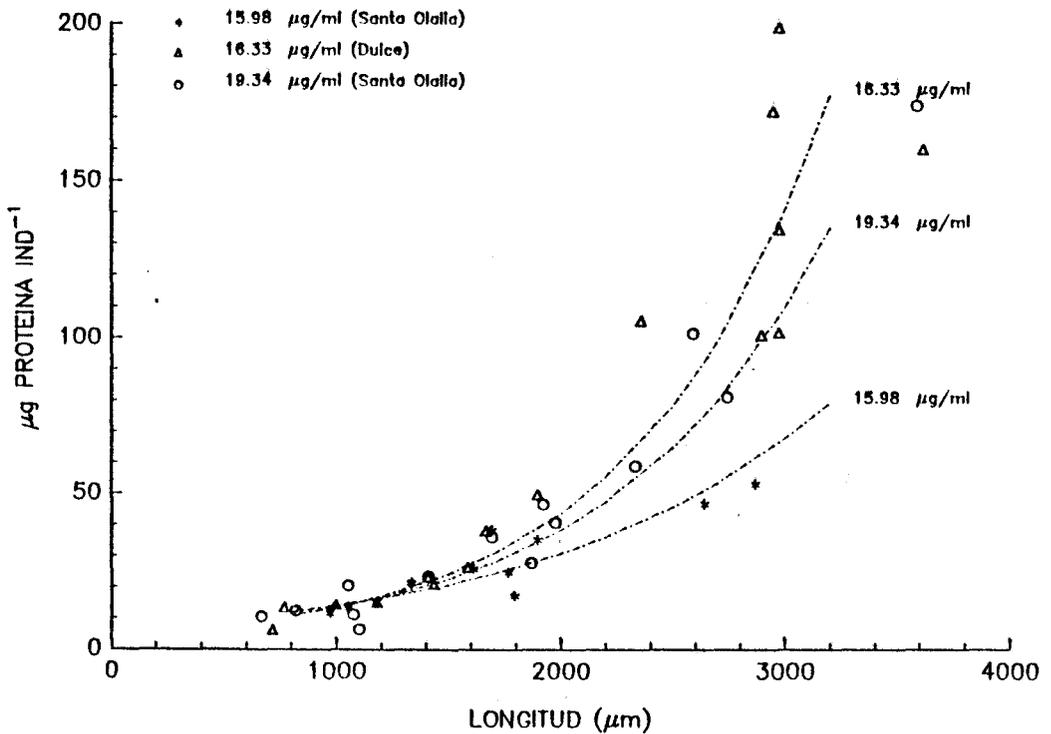


FIGURA 11. Relación entre la cantidad de proteína/individuo ( $\mu\text{g}$ ) y la longitud ( $\mu\text{m}$ ) en individuos grávidos de *Daphnia magna*, a cuatro concentraciones de proteína total. Datos obtenidos en el campo.

En primer lugar hay que, mencionar que para poder comprender los cambios en el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos en animales grávidos, es necesario estudiar la evolución que se produce en una población en una misma laguna a lo largo del tiempo. Debido a esto, se siguió la dinámica de *Daphnia magna* en las lagunas de Santa Olalla y la Dulce durante un periodo de 4 meses y también se siguió el ciclo de *Daphnia longispina* y *Ceriodaphnia reticulata* en la laguna Dulce pero por un periodo tan solo de aproximadamente 1 mes.

Esto se debe a que, las poblaciones de estas dos últimas especies no fueron tan abundantes, como para poder obtener suficientes individuos para los análisis durante un periodo tan largo como en el caso de *Daphnia magna*.

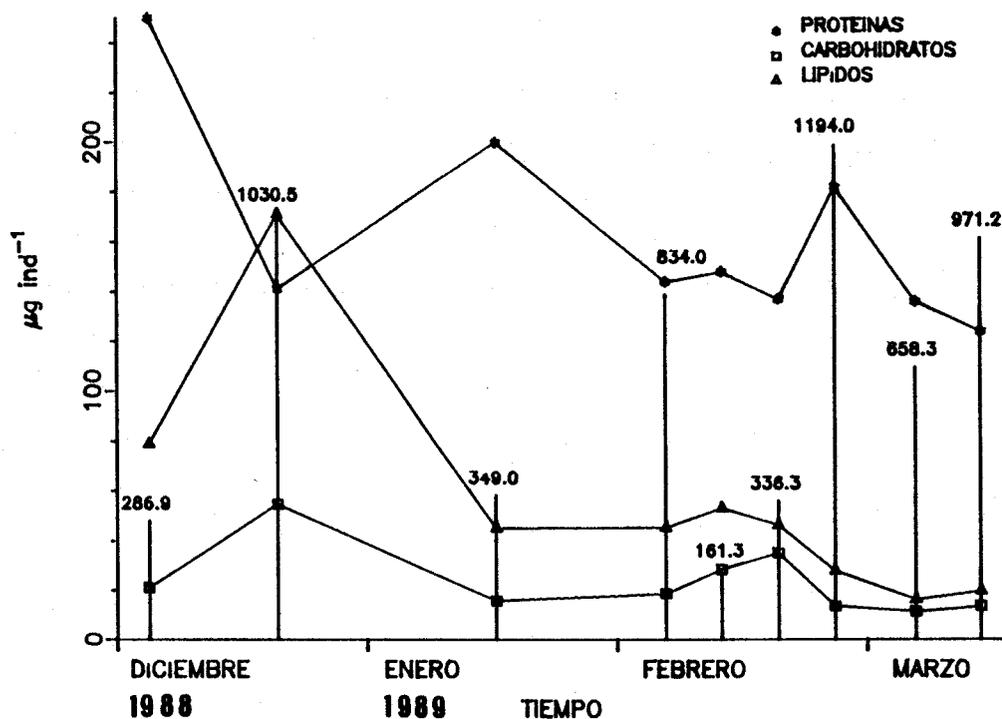


FIGURA 12. Evolución a lo largo del tiempo del contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos de un animal grávido de 3500 µm de la especie *Daphnia magna*, en la laguna Dulce. También se representan las proteínas totales de la población (PTP, mediante líneas verticales) halladas para cada día de muestreo.

En las Figuras 12 y 13, se observa la evolución de *D. magna* en las dos lagunas estudiadas. En primer lugar, se destaca que aproximadamente en Noviembre comienza el crecimiento de la población, después del periodo de verano en que los individuos de *D. magna* eran muy escasos y la población se mantenía en un estado de resistencia en forma de efipios. En el primer muestreo realizado en Diciembre, la población en ambas lagunas era muy joven ya que el tamaño medio de la población era muy pequeño, 864  $\mu\text{m}$  (n=63) en la Dulce y 908.4  $\mu\text{m}$  (n=78) en Santa Olalla, lo que indica que la eclosión de los efipios era reciente y, por lo tanto, confirma que el inicio del ciclo anual de *D. magna* es en Noviembre. En esta primera fase, el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos en los individuos adultos es alto (Figuras 12 y 13), lo que indica que existe una fuerte inversión por parte de los animales para aumentar la población. A lo largo del año, esta inversión disminuye mucho, sobre todo en lo que se refiere a las sustancias de reserva ya que, como ya existe un stock de animales adultos, no es necesario hacer un gasto tan grande como el realizado al comienzo del ciclo, donde se partía de un población recién eclosionada y, por lo tanto donde los adultos eran escasos. Estas diferencias en la cantidad invertida en reproducción, quedan de manifiesto cuando se estudia la biomasa (Tabla 16). Por ejemplo en la laguna Dulce, en los muestreos de Diciembre de 1988, la biomasa de una hembra de 3500  $\mu\text{m}$  oscilaba entre 351 y 367  $\mu\text{g}$ , mientras que en Marzo de 1989 la biomasa no fue superior a 170  $\mu\text{g}$ .

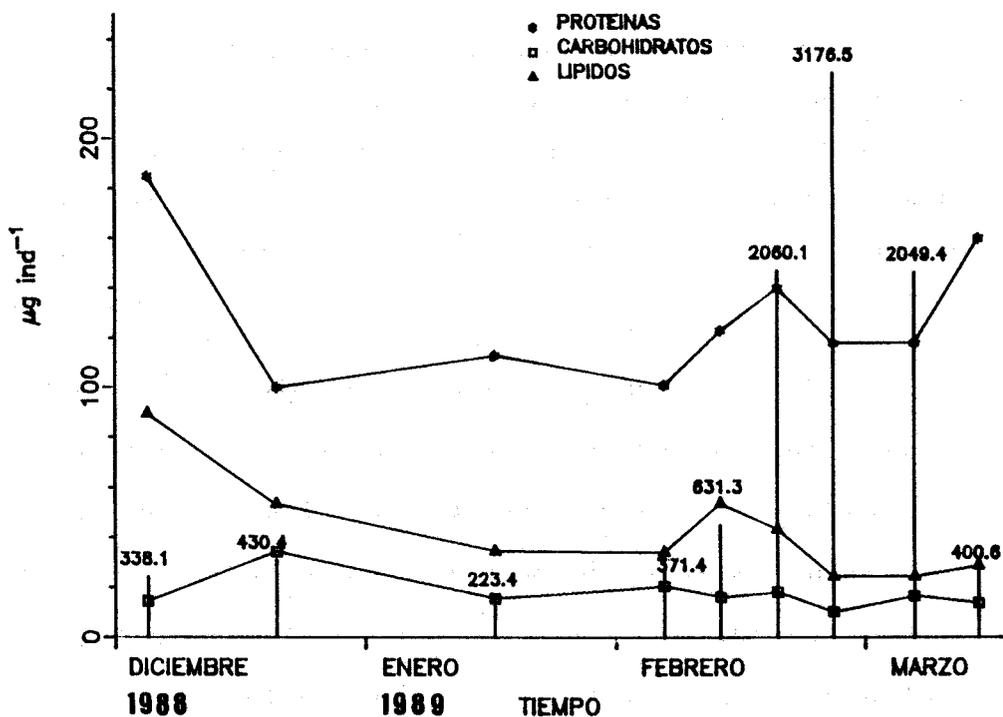


FIGURA 13. Evolución a lo largo del tiempo del contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos de un animal grávido de 3500  $\mu\text{m}$  de la especie *Daphnia magna*, en la laguna Santa Olalla. También se representan las proteínas totales de la población (PTP, mediante líneas verticales) halladas para cada día de muestreo.

En relación con esto, está el segundo hecho importante a destacar, que es la fuerte variación existente en la biomasa de los individuos a lo largo del año. Para una hembra de 3500  $\mu\text{m}$ , en el ciclo estudiado, el máximo de biomasa en la Dulce fue de 367.04  $\mu\text{g}$  y el mínimo de 157.92  $\mu\text{g}$ , mientras que en Santa Olalla osciló entre 288.5 y 152.31  $\mu\text{g}$  (Tabla 16). Por el contrario, las variaciones en el alimento son muy pequeñas; la

cantidad de proteínas totales osciló entre 8.07 y 16.33  $\mu\text{g/ml}$  en la Dulce, y entre 11.98 y 19.34 en Santa Olalla (Tabla 2). Es decir, las variaciones observadas en la biomasa se deben, en su mayor, parte a cambios en el estado reproductivo de la población, no influyendo el alimento. Esto puede ser la causa de que Geller y Müller (1985) no encontraran una buena relación entre los cambios en la biomasa de varias especies de *Daphnia* y el alimento existente a lo largo del tiempo.

TABLA 16.- Variación en la biomasa (considerando las proteínas, más los carbohidratos y los lípidos) en un individuo de 3500  $\mu\text{m}$  de *Daphnia magna*, en las lagunas de Santa Olalla y Dulce, a lo largo del tiempo.

	Fecha								
	4-12-88	20-12	16-1	6-2	13-2	20-2	27-2	9-3	17-3
Dulce	351.9	367.0	274.7	185.4	229.9	218.3	223.8	164.3	157.9
Santa Olalla	288.5	187.4	162.8	155.4	192.7	202.0	152.3	159.1	202.8

El tercer aspecto a destacar, tal vez es el más importante en la dinámica poblacional de una especie, es el siguiente; ¿Cual es el factor mas determinante para que se produzca un aumento de la población? es decir, ¿Cual es el agente que utilizan los animales como referencia para saber cuando deben aumentar la población?. Después de la fase de resistencia del verano, los cambios en el fotociclo, así como de la temperatura, son los causantes de la eclosión de los efipios y, por lo tanto, del inicio en el aumento de la población. Ahora bien, a lo largo del año otro factor parece ser el causante de que *Daphnia*

magna aumente su población. Esto se puede observar cuando se analiza la evolución de los contenidos en proteínas, carbohidratos y lípidos en individuos de 3500  $\mu\text{m}$  de esta especie en ambas lagunas (Figuras 12 y 13) en los meses de Febrero y Marzo, en los cuales el muestreo se hizo con una frecuencia casi semanal. Se observa como después de un periodo en el que las sustancias de reserva aumentan, se da un incremento importante de la población. Es decir, los individuos en primer lugar acumulan sustancias reserva que son posteriormente utilizadas por sus embriones. Cuando estos embriones nacen dan lugar a un aumento de la población y a su vez a un descenso en la cantidad de sustancias de reserva de las hembras. Esto origina que el pico máximo de la población, coincida con un descenso importante en el contenido en carbohidratos y lípidos en los individuos, lo que ya había sido mencionado anteriormente por Tessier y Goulden (1982).

El pico de población detectado el 20 de Diciembre en la Dulce (Figura 12), parece contradecir lo dicho anteriormente, ya que coincide con un aumento de las sustancias de reserva. Esta aparente contradicción se puede explicar si en realidad, este no fue el máximo de la población de este periodo, sino que la población creció mucho más posteriormente, muy posiblemente a la vez que se producía un descenso de las sustancias de reserva. En apoyo de esto, está el hecho de que en ese día de muestreo el número de embriones y huevos por litro era muy alto (9 embriones y 40 huevos/litro), y logicamente una gran proporción de ellos,

se convertirían posteriormente en adultos. La situación hallada este día es comparable a la encontrada en el tercer muestreo realizado en Febrero en la Dulce, donde la PTP era de 336.3  $\mu\text{g}/\text{l}$ , y las sustancias de reserva eran altas. Por lo tanto según esto, una semana después del 20 de Diciembre la PTP debió rondar los 4000  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Las proteínas, también aumentan pero debido, principalmente, a los embriones presentes en las hembras y no por que sean usadas como una sustancia de reserva. Por ello el contenido en proteínas en los animales se mantiene alto durante mas tiempo que las sustancias de reserva (Figuras 12 y 13, meses de Febrero y Marzo), ya que los lípidos y carbohidratos se han utilizado para formar embriones y estos son los que dan lugar a que el contenido en proteínas de las hembras adultas sea grande.

Ahora bien, los animales adultos comienzan a acumular sustancias de reserva, cuando el número de individuos de la población es escasa, esto parece indicar que una densidad de población baja, es el factor desencadenante para que los animales comiencen a sintetizar carbohidratos y lípidos. Esto se puede comprobar en las Tablas 17, 18 y 19. Se ve como el contenido en proteínas está mas influenciado por el alimento existente, ya que está mas relacionado con la cantidad de proteínas y carbohidratos del medio que por los parámetros poblacionales. Por el contrario, se observa como los carbohidratos y los lípidos están mas determinados por estos últimos. En estas tablas se observa como los tres componentes están relacionados

TABLA 17.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Proteínas, en animales grávidos de Daphnia magna. n= 283.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE			
0.83	*** 0.001	*** 0.206				0.91	0.08	1524
1.14	*** 0.001			*** 0.122		0.9	0.08	1423
1.45	*** 0.001			-0.008		0.9	0.09	1319
1.32	*** 0.001				0.023	0.92	0.08	1400
1.71	*** 0.001				-0.053*	0.92	0.08	1409

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

TABLA 18.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln (Carbohidrato + 1), en animales grávidos de Daphnia magna. n= 164.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE			
-0.61	*** 0.001	*** -0.047				0.85	0.16	481
-0.53	*** 0.001		-0.090			0.85	0.16	482
-0.66	*** 0.001			*** -0.053		0.86	0.15	534
-0.27	** 0.001	***			*** -0.163	0.9	0.11	723
-0.14	*** 0.001	***			* -0.096	0.86	0.16	500

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

TABLA 19.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln (Lípidos + 1), en animales grávidos de *Daphnia magna*. n= 163.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	ln Proteína	Ch	ln Lípido	ln HE			
-0.14	0.001	*** -0.195				0.83	0.27	413
-0.58	0.001	***	-0.008			0.83	0.27	402
-0.61	0.001	***		-0.051	**	0.84	0.26	421
-0.23	0.001	***			-0.146	0.87	0.23	482
0.38	0.001	***			-0.169	0.84	0.26	432

\* p < 0.05  
 \*\* p < 0.01  
 \*\*\* p < 0.001

negativamente con el PTP, lo que indica que conforme la población es mas escasa el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos en los animales es mayor. Logicamente, también existe una buena relación entre las sustancias de reserva y el HE, ya que a mayor número de huevos y embriones el contenido en lípidos y carbohidratos aumentan. Yan y Mackie (1987) trabajando con *Holopedium gibberum* ya observaron que los mejores predictores para calcular la biomasa de esta especie eran el tamaño de los individuos, el HE y un índice llamado BIF que nos da idea de la cantidad de lípidos del individuo. Por lo tanto, ellos también observaron que las mayores variaciones en la biomasa se debían a cambios en el estado reproductivo. Cuando ellos incluían en su ecuación al fósforo total, que puede dar una idea del alimento

existente, la ecuación se hacía mas predictiva. Ahora bien, la varianza explicada aumentaba poco, lo que confirma que, aunque logicamente el alimento influye, las variaciones mas importantes en la biomasa se deben a los cambios originados por las distintas fases reproductivas en las que entran los animales.

En las tablas anteriores, también se observa, que las proteínas de los individuos están relacionadas positivamente con el alimento disponible, mientras que los lípidos no. Esto confirma lo mencionado en el apartado anterior, sobre que los animales acumulan mas sustancias de reserva cuando el alimento es mas escaso.

El cuarto y último aspecto a destacar es que, a pesar de ser dos lagunas diferentes, *Daphnia magna* aumenta su población al mismo tiempo en ambos cuerpos de agua (Figuras 12 y 13). Ahora bien, a pesar de que existe una sincronización en el tiempo, la densidad de la población no es la misma en las dos lagunas. Al comienzo del ciclo, *Daphnia magna* alcanza densidades mucho mas altas en la Dulce que en Santa Olalla. Por el contrario, en el aumento de población que se da en Febrero, *Daphnia magna* alcanza una densidad casi tres veces mayor en Santa Olalla que en Dulce. Esto indica claramente que están interfiriendo otros factores distintos de los ya mencionados. Los parámetros químicos medidos en ambas lagunas en esas fechas (nitrato, nitrito, amonio, fósforo, oxígeno disuelto, reserva alcalina, calcio, magnesio, cloruros y conductividad), no revelan diferencias importantes que puedan explicar este hecho

(Toja et al., en prensa). Las divergencias mas importantes, se daban en la conductividad. En Diciembre de 1988, en la Dulce la conductividad oscilaba alrededor de 0.9 mS/cm y en Santa Olalla rondaba los 2 mS/cm. Pero este hecho no puede ser el causante de que en Santa Olalla el crecimiento de la población sea menor, ya que en Febrero de 1989, cuando se dió un aumento importante de la población en Santa Olalla, la conductividad también rondaba los 2 mS/cm. El tipo de alimento tampoco puede ser el causante de estas diferencias e incluso es contradictorio con los resultados obtenidos. En un muestreo de fitoplancton realizado el 17-12-88 en ambas lagunas (López, comunicación personal), la especie dominante en la Dulce era *Microcystis aeruginosa* que, en teoría, puede tener efectos negativos sobre los cladoceros de mayor talla como *Daphnia magna* (Fulton y Paerl, 1987), mientras que en Santa Olalla dominaba *Chroococcus dispersus*, un alga que puede ser utilizada como alimento por *Daphnia magna*. Por lo tanto, el factor o factores que impidieron un crecimiento normal de *Daphnia magna* en Santa Olalla, son todavía desconocidos.

En el caso de *Daphnia longispina* al haber muestreado durante un periodo mas corto (Figura 14), no se ve la evolución de una forma tan clara como en el caso de *Daphnia magna*. De todas formas, la relación de las proteínas, carbohidratos y lípidos con los demás parámetros (Tablas 20, 21 y 22) revela que parece seguir una dinámica muy semejante a *D. magna*.

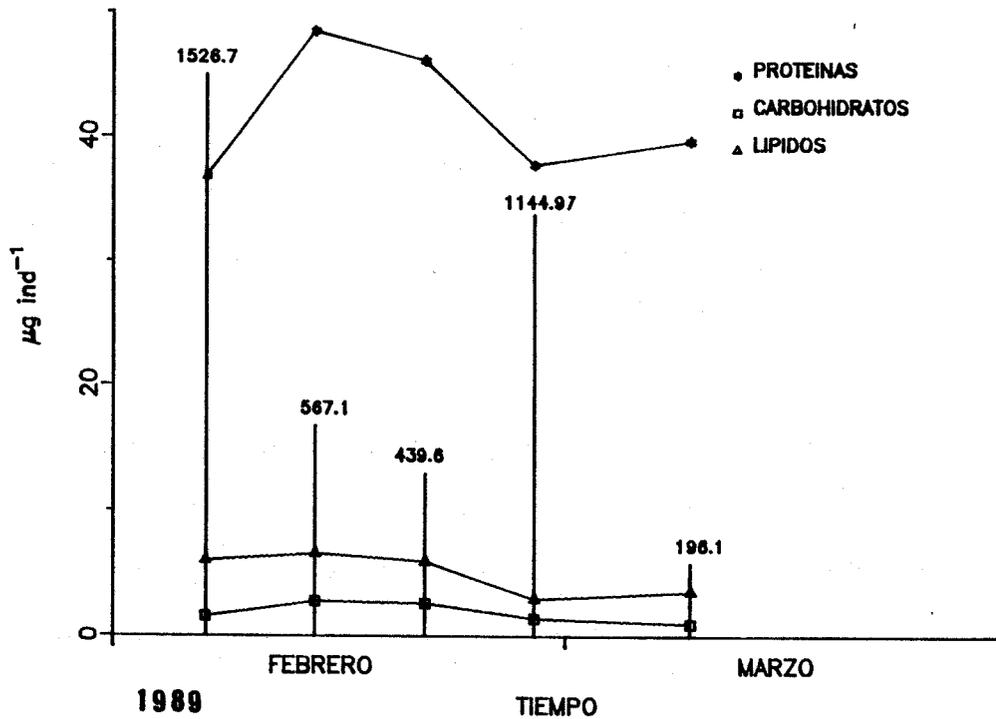


FIGURA 14. Evolución a lo largo del tiempo del contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos de un animal grávido de 2000  $\mu\text{m}$  de la especie *Daphnia longispina*, en la laguna Dulce. También se representan las proteínas totales de la población (PTP, mediante líneas verticales) halladas para cada día de muestreo.

El contenido en proteínas y carbohidratos de los animales aumenta a medida que el alimento es mayor, mientras que los lípidos disminuyen. Por lo tanto, esta especie también acumula mas lípidos cuando el alimento escasea.

TABLA 20.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Proteínas, en animales grávidos de *Daphnia longispina*. n= 50.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F	
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE PTP				
0.61	** 0.001	*** 0.267				0.84	0.05	133	
0.45	0.001	***	0.413	*		0.81	0.06	108	
1.31	*** 0.001	***		-0.024	*	0.80	0.06	104	
1.74	*** 0.001	***			-0.073	***	0.84	0.05	127
1.43	*** 0.001	***				-0.0001	0.81	0.06	103

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

TABLA 21.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Carbohidrato, en animales grávidos de *Daphnia longispina*. n= 51.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F	
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE ln PTP				
-3.99	*** 0.001	*** 0.453	**			0.69	0.24	56	
-3.79	*** 0.001	***	0.486			0.64	0.27	46	
-2.78	*** 0.001	***		-0.041		0.65	0.27	47	
-1.91	*** 0.001	***			-0.529	*	0.66	0.26	49
-3.27	*** 0.001	***				0.08	0.63	0.28	44

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

TABLA 22.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln (Lípidos + 1), en animales grávidos de *Daphnia longispina*. n= 55.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F	
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE				ln PTP
-0.02	0.001	*** -0.460				0.61	0.26	43	
-0.65	0.001	***	-0.293			0.55	0.31	34	
-1.08	0.001	***		0.095	***	0.64	0.25	49	
-1.26	0.001	**			-0.012	0.54	0.31	33	
-2.32	0.001	**				0.146	0.56	0.3	35

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

En el caso de *D. magna* los carbohidratos aumentaban cuando había poco alimento, y estaban muy relacionados con el HE y el PTP (Tabla 18), pareciendo tener por lo tanto una función de reserva principalmente. En *D. longispina* no ocurre esto, sino que aumentan a medida que hay más alimento y no están tan relacionados con el HE y el PTP (Tabla 21), teniendo así una función preferentemente estructural, al igual que ocurría con las proteínas.

Otro hecho importante, es que no se ha encontrado una relación con el PTP, es decir, el aumento de las proteínas, carbohidratos y lípidos no están en relación con que la densidad de la población sea baja. En *Ceriodaphnia reticulata*, sí se

observa que la densidad de población parece influir, lo que parece indicar que este patrón de comportamiento es general en los cladóceros planctónicos, aunque no se haya podido demostrar en *Daphnia longispina*, posiblemente debido a disponer de pocos datos.

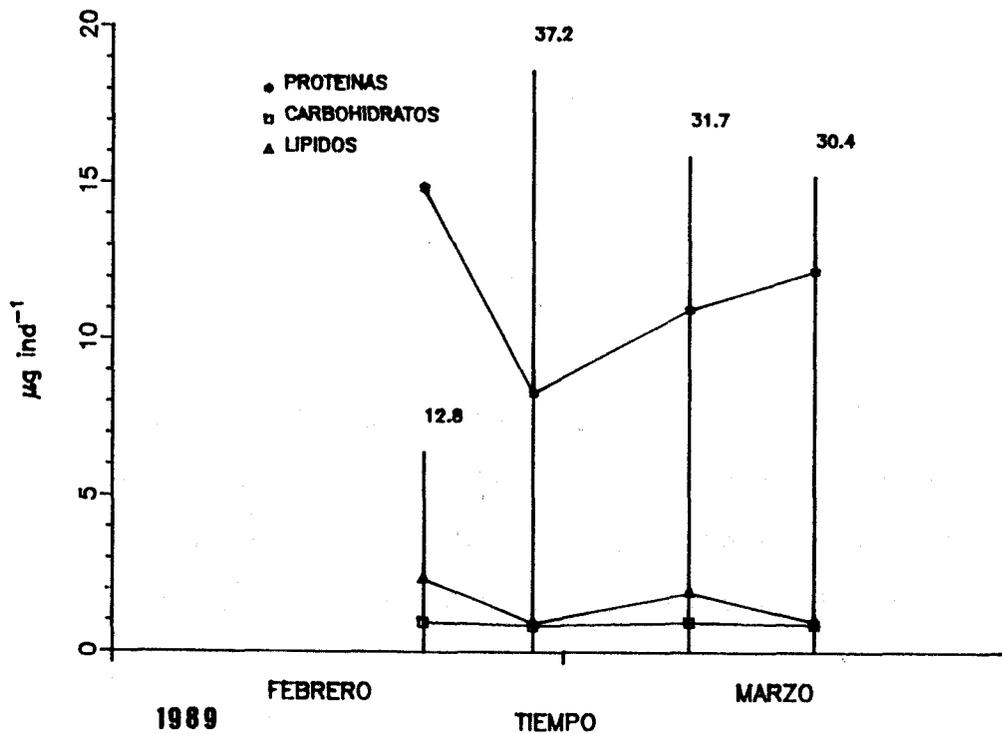


FIGURA 15. Evolución a lo largo del tiempo del contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos de un animal grávido de 900 µm de la especie *Ceriodaphnia reticulata*, en la laguna Dulce. También se representan las proteínas totales de la población (PTP, mediante líneas verticales) halladas para cada día de muestreo.

*Ceriodaphnia reticulata* también se ha muestreado durante un corto periodo de tiempo (Figura 15), por lo que tampoco se pueden sacar unas conclusiones claras. De todas formas, se han obtenido unos resultados muy parecidos a los de *D. magna* (Tablas 23, 24 y 25).

TABLA 23.- Coeficientes de las regresiones múltiples realizadas para predecir el Ln Proteínas, en animales grávidos de *Ceriodaphnia reticulata*. n= 62.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE			
-2.76	***	***	***			0.8	0.05	126
-2.02	***	***		***		0.62	0.11	51
0.76	*	***		*		0.29	0.21	13
0.41		***			0.104	0.27	0.22	12
0.13		***			0.0001	0.4	0.18	21

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

El contenido en proteínas en los animales aumenta cuando hay más alimento (Tabla 23) y, por el contrario, los lípidos son mas abundantes cuando el alimento escasea (Tabla 25). También los lípidos, al igual que en el caso de *D. magna*, están relacionados negativamente con la densidad de población.

TABLA 24.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Carbohidrato, en animales grávidos de Ceriodaphnia reticulata. n= 28.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F	
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE				ln PTP
-3.36	***	***	*				0.33	0.27	7
-3.39	***	***		*			0.34	0.27	8
-1.82	***	**			-0.157		0.26	0.3	6
-2.13	**	**				0.061	0.21	0.32	5
-2.3	***	***				0.05	0.23	0.23	5

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

TABLA 25.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Lípidos, en animales grávidos de Ceriodaphnia reticulata. n= 37.

Cte	Variables					r <sup>2</sup>	MS	F	
	Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE				ln PTP
-5.83	*	***					0.38	2.25	12
-5.86	*	***		-0.253			0.38	2.25	12
-6.49	***	***			-0.182		0.38	2.29	12
-6.44	***	***				-0.075	0.38	2.25	12
-4.30	*	**				-0.246*	0.43	2.05	15

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

Se ve como los carbohidratos no son usados tan claramente como sustancias de reserva (Tabla 24), ya que están mas influenciados por el alimento que por parámetros poblacionales. Como ya se vió en el caso de *D. magna*, había una relación inversa entre el contenido en carbohidratos de los animales y el alimento (aunque no significativa), mientras que esto no ocurría para *Daphnia longispina*. Por lo tanto, en el caso de los carbohidratos el patrón mostrado por *Ceriodaphnia reticulata* es muy similar al de *D. longispina*.

En resumen del estudio de los animales grávidos de estas tres especies de cladóceros, se pueden sacar algunas conclusiones:

- La principal sustancia que utilizan como reserva los cladóceros son los lípidos, teniendo un papel mas secundario los carbohidratos.
- Las proteínas, al igual que sucedía con los individuos no grávidos, están mas influenciadas por el alimento que por parámetros poblacionales, ya que no son usadas de una forma clara como sustancias de reserva.
- Las variaciones mas importantes en la biomasa de los individuos grávidos, se deben a cambios en el estado reproductivo y no al alimento existente.
- Existe una tendencia a acumular mas sustancias de reserva a medida que el alimento disminuye, seguramente con el fin de aumentar la viabilidad de los neonatos.
- Una densidad de población baja, es uno de los detonantes

para que los individuos comiencen acumular sustancias de reserva.

- En la dinámica de la población de una especie están interfiriendo, otros factores además del alimento y la densidad de población, que hacen que existan diferencias importantes entre las lagunas.

### III.6.1 Mantenimiento de la población a bajas concentraciones de alimento.

Un tema importante y sobre el cual se ha trabajado mucho, es la cuestión de qué especies dominan según la concentración de alimento, si las más grandes o las pequeñas. En primer lugar, hay que mencionar que, para las tres especies estudiadas en este trabajo, se ha observado que a medida que el alimento era menos abundante, había una mayor proporción de lípidos en las hembras adultas, probablemente con el fin de aumentar la viabilidad de sus neonatos. Ahora bien, este aumento de los lípidos no puede ser indefinido ya que, por lógica, debe llegar un momento en el que el alimento no sea suficiente. En estos casos con el fin de ahorrar energía, uno de los primeros gastos que los animales reducen es la reproducción. El hecho de no haber detectado este fenómeno en los análisis en el campo, se debe a que los ecosistemas estudiados tienen recursos tróficos abundantes, no siendo el alimento suficientemente pobre en ningún momento. Este problema también se pone de manifiesto en los estudios realizados con rotíferos, que se presentan en el próximo

capítulo. Para poder comprobar, si efectivamente hay una reducción de las sustancias de reserva en situaciones limitantes de alimento, sería necesario realizar cultivos en el laboratorio, para así forzar a los animales a desarrollarse en un ambiente pobre. Por medio de este tipo de experimentos, Tessier y Goulden (1982), observaron que había una reducción en el contenido en lípidos de los animales a bajas concentraciones de alimento. En el grado de disminución de las sustancias de reserva, parece estar la clave para que unas especies dominen sobre otras. Goulden et al. (1982) trabajando con *Daphnia magna*, *Daphnia galeata* y *Bosmina longirostris*, observaron que, conforme la especie era mas pequeña, estaba mas afectada por las bajas concentraciones de alimento. Según ellos ésto se debía a que la tasa de reproducción en *D. magna* practicamente no disminuía cuando el alimento escaseaba mientras que, en el caso de las otras dos especies, esta reducción era mucho mas aparente. Este hecho no se ha podido comprobar con los resultados obtenidos en este trabajo. Lo que si se ha podido confirmar es lo que observaron posteriormente Goulden y Henry (1984) y Goulden et al. (1987). Según estos autores la proporción de lípidos en los individuos adultos es similar en varias especies de cladóceros, es decir, al aumentar el tamaño aumentan los lípidos en la misma proporción. Sin embargo, esta relación no se mantiene en los neonatos ya que, en las especies mas pequeñas, la proporción de lípidos en los neonatos es inferior en comparación con las especies mayores. Esto quiere decir que los embriones de las especies mas pequeñas consumen

mas lípidos en proporción a su tamaño, que los de las especies mayores. Esto lógicamente es una desventaja cuando el alimento escasea. De los datos obtenidos en este trabajo, se saca la misma conclusión. Cuando se desarrollan las ecuaciones en las que están el tamaño y las proteínas totales como variables independientes, para calcular tanto las proteínas, como los carbohidratos y los lípidos en las tres especies se observa que, en el caso de *D. magna*, de una hembra de 3500  $\mu\text{m}$  (adulto reproductor) a un individuo de 700  $\mu\text{m}$  (recien nacido) la proporción de lípidos se reduce 2.64 veces. Por el contrario para *D. longispina* entre una hembra de 2000  $\mu\text{m}$  y un individuo de 600  $\mu\text{m}$  los lípidos se reducen 16.7 veces y en el caso de *Ceriodaphnia reticulata* entre una hembra de 900  $\mu\text{m}$  y un individuo de 200  $\mu\text{m}$  la reducción es de 15.4 veces. Por lo tanto, esto podría ser una de las causas de por qué las especies mas pequeñas sobreviven peor que las grandes cuando hay poco alimento.

### III.7 Análisis de hembras con efipios

Tan sólo de la especie *Daphnia magna* se encontró suficiente número de hembras con efipios, como para poder hacer análisis significativos. A la hora de hacer las regresiones múltiples, se hizo lo mismo que con los individuos grávidos, es decir, se incluyeron los individuos menores de 2000  $\mu\text{m}$  y los que pasaban este tamaño, sólo los que tenían efipios.

TABLA 26.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Proteínas, en hembras con epipios de Daphnia magna. n= 78.

Variables									
Cte	ln Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	HE	ln PTP	r <sup>2</sup>	MS	F
-11.2	*** 1.895	*** 0.121					0.89	0.07	327
-10.7	*** 1.900		-0.092				0.89	0.07	314
-10.4	*** 1.866			-0.129	***		0.91	0.06	390
-10.9	*** 1.892				0.001	*	0.89	0.07	336
-11.4	*** 1.897					0.075	0.89	0.07	321

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

TABLA 27.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Carbohidratos, en hembras con epipios de Daphnia magna. n= 78.

Variables									
Cte	ln Tamaño	ln Proteína	ln Ch	Lípido	ln HE	ln PTP	r <sup>2</sup>	MS	F
-20.5	*** 2.767	*** 0.189					0.77	0.36	98
-21.2	*** 2.792		0.446				0.78	0.35	102
-20.4	*** 2.797			0.018			0.77	0.37	96
-19.9	*** 2.848					-0.219	0.8	0.31	117
-19.7	*** 2.786					-0.080	0.77	0.37	96

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

TABLA 28.- Coeficientes de las regresiones multiples realizadas para predecir el Ln Lípidos, en hembras con efipios de *Daphnia magna*. n= 78.

Variables							r <sup>2</sup>	MS	F
Cte	ln Tamaño	ln Proteína	ln Ch	ln Lípido	ln HE	ln PTP			
-18.5	*** 2.743	*** -0.382					0.76	0.39	90
-18.5	*** 2.738			-0.459			0.75	0.41	83
-19.6	*** 2.733			0.129			0.75	0.42	83
-19.1	*** 2.714				-0.060		0.74	0.43	79
-19.2	*** 2.713					-0.012	0.73	0.43	78

\* p< 0.05  
 \*\* p< 0.01  
 \*\*\* p< 0.001

En las Tablas 26, 27 y 28, se exponen las regresiones multiples obtenidas entre el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos de los individuos con respecto el resto de parámetros. Comparando con los resultados obtenidos con los animales grávidos, se observan algunas diferencias dignas de ser destacadas. En primer lugar, el contenido en proteínas en las hembras efipiales (Tabla 26), está más relacionado con la cantidad de lípidos existentes en el medio que en el caso de los animales grávidos (Tabla 17). También el contenido en proteínas de los animales está relacionado con las proteínas del medio, pero este parámetro no influye tanto como en el caso de los animales grávidos. También es interesante resaltar la relación positiva con el HE (Tabla 26), que ya se observó en los

individuos grávidos (Tabla 17) aunque, no fue significativa en este caso. Todo esto parece indicar que el contenido en proteínas en los animales con efipios, aumenta cuando las condiciones son desfavorables, viniendo éstas indicadas por un incremento de los lípidos en el medio y cuando el HE de la población es muy alto. El contenido en carbohidratos (Tabla 27) y lípidos (Tabla 28) de las hembras con efipios, presentan en general una dinámica similar a la de las hembras grávidas (Tablas 18 y 19), pero con la diferencia de que las sustancias de reserva en los efipios no parecen estar influidas por el PTP de la población.

En lo que se refiere a diferencias cuantitativas en el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos entre las hembras grávidas y las efipiales, en la Tabla 29 se exponen, a modo de ejemplo, los valores obtenidos de estos componentes, para una hembra de 3500  $\mu\text{m}$  a una concentración de 8  $\mu\text{g}$  de proteína total/ml. Se observa como el contenido en proteínas y en carbohidratos en los animales grávidos, es superior al de las hembras efipiales. Esto posiblemente se deba al componente estructural que presentan los embriones. Por el contrario, la cantidad de lípidos es sensiblemente mayor en las hembras con efipios, aunque en proporción son mucho más importantes debido a que el contenido en proteínas y carbohidratos es menor. Este patrón también se observa cuando la concentración de alimento es mayor.

TABLA 29.- Comparación entre el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos en *Daphnia magna* entre una hembra grávida y una efipial, de un tamaño de 3500  $\mu\text{m}$  a una concentración de 8  $\mu\text{g}$  de proteína total/ml. Las ecuaciones usadas para los cálculos son las que, tienen como variables independientes el tamaño y la concentración de proteína total. En el caso de los individuos grávidos las ecuaciones están representadas en las Tablas 17, 18 y 19. Para los individuos con efipios las ecuaciones están representadas en las Tablas 26, 27 y 28.

	Grávidos		Efipiales	
	$\mu\text{g}/\text{ind}$	%	$\mu\text{g}/\text{ind}$	%
PROTEINAS	116.55	77.67	91.25	73.49
CARBOHIDRATOS	15.31	10.2	10.94	8.81
LIPIDOS	18.19	12.12	21.97	17.69

En resumen, los componentes celulares en las hembras con efipios, tienen una dinámica semejante a la observada en las hembras grávidas aunque, con la diferencia de que la densidad de la población no parece estar influyendo en la formación de los efipios y que la cantidad acumulada de lípidos es mayor. Teniendo en cuenta que la producción de efipios es un mecanismo de resistencia de la población frente a condiciones desfavorables, es lógico el hecho de que la cantidad de lípidos en el medio, tenga mayor influencia que en el caso de las hembras grávidas ya que, como se ha mencionado anteriormente, un aumento de los lípidos en el medio indica condiciones desfavorables de alimento.

# CAPITULO II

## ROTI FEROS

Los rotíferos, constituyen otro de los grupos importantes del zooplancton. En él, la alimentación juega un papel más importante que en el caso de los cladóceros, ya que existen muchas especies y, debido a esto, la competencia puede ser en algunos casos importante. El principal factor que ayuda a evitar la competencia, es la temperatura, ya que juega un importante papel a la hora de separar las especies en el tiempo. Ahora bien, cuando varias especies aparecen en la misma época del año, la alimentación es el otro factor según el que se diferencian las especies, distribuyendose en función de sus requerimientos alimenticio (Bogdan y Gilbert, 1987).

Debido a esta importancia decisiva de la alimentación, los estudios sobre este tema han sido muy abundantes. Las líneas de investigación mas desarrolladas han sido: los trabajos sobre filtración (Starkweather y Gilbert, 1977; Starkweather, 1980; Bogdan y Gilbert, 1982; entre otros) y los trabajos sobre selección de alimento (Dumont, 1977; Pourriot, 1977; Gilbert y Bogdan, 1984).

Una línea importante desarrollada mas recientemente, es la que tiene en cuenta los requerimientos alimenticios de las distintas especies (Stemberger y Gilbert, 1985a; 1985b; 1987), enfocada en el sentido de cuál es la cantidad de alimento que necesitan para poder aumentar la población.

En relación con ésto, está el tema de como invierten en reproducción la energía de que disponen. A pesar de que los rotíferos son considerados como estrategias de la *r*, cuando se comparan con otros grupos zoológicos, dentro del conjunto de especies parece existir un gradiente entre las que siguen mas una estrategia *k* y las que siguen una estrategia *r* (Walz, 1983). Incluso, la estrategia reproductiva puede variar dentro de una misma especie, según las disponibilidades de alimento.

Debido al interés que tienen los estudios de alimentación, así como el tema de la inversión de la energía en reproducción por parte de las especies, este trabajo intenta aportar nuevos datos a partir del estudio de las proteínas, carbohidratos y lípidos de los individuos. Esta línea de investigación es mas novedosa en este grupo que en el de los cladóceros, ya que el pequeño tamaño de los rotíferos hace mucho mas tedioso los análisis. Por otro lado, la inmensa mayoría de los trabajos de alimentación realizados con rotíferos, se han hecho en el laboratorio. Por ello, el objetivo principal planteado en este estudio, es realizar gran parte del mismo con individuos desarrollados en el medio natural. Todo esto, hace que los resultados obtenidos con este grupo, tengan un mayor interés que

los obtenidos con los cladóceros.

## I. METODOLOGIA EMPLEADA PARA LOS ANALISIS BIOQUIMICOS

### I.1 Tratamiento aplicado a los rotíferos y las muestras de agua antes de analizar las proteínas, carbohidratos y lípidos

Los animales obtenidos en el medio natural o los cultivados en el laboratorio, se seleccionan en una lupa y se transfieren a agua destilada para así evitar posibles errores debidos a las proteínas, carbohidratos y lípidos presentes en el agua. Después bajo observación con un microscopio invertido, cada individuo de rotífero se extrae del agua destilada con una micropipeta automática, cogiendo siempre un volumen de 10  $\mu$ l por cada individuo empleado en el análisis de proteínas y carbohidratos, y 5  $\mu$ l en el análisis de lípidos. La razón de coger menos volumen en el caso del análisis de lípidos, se debe a que es necesario emplear bastantes individuos a la vez, para poder detectar algo. Al coger solo 5  $\mu$ l se evita que el volumen final sea superior al volumen de muestra usado en este análisis.

Los rotíferos se agrupan por especies y en diferentes categorías dependiendo de su estado reproductivo; C0 (hembras sin huevos), C1 (hembras con un huevo), C2 (hembras con dos huevos), etc. Nunca se han analizado machos ni hembras con huevos micticos. En el caso de *Asplanchna brightwelli*, solo se hacen tres categorías C0 (hembras sin embrión), C1 (hembras con un embrión) y C2 (hembras con huevo de resistencia). Debido al pequeño tamaño de los rotíferos, no es posible analizar las

proteínas, carbohidratos y lípidos de un solo individuo, como ocurre con los cladóceros. A pesar de esto, la sensibilidad de los análisis permite el uso de pocos individuos para cada muestra: en el análisis de proteínas se usan entre 1-5 individuos; entre 2-7 para los carbohidratos y entre 15-20 para los lípidos. Esto da lugar a que no se pueda obtener una relación entre tamaño y cantidad de los distintos componentes celulares, sino que se obtiene un valor medio por individuo para cada concentración de alimento.

Los análisis de proteínas carbohidratos y lípidos, se realizan con las técnicas explicadas en el capítulo anterior. Simplemente, hay que tener en cuenta que el volumen de muestra obtenido después de la adición de los rotíferos, se completa con agua destilada hasta 200  $\mu$ l para el análisis de proteínas, hasta 400  $\mu$ l para los carbohidratos y 75  $\mu$ l en el caso del análisis de lípidos.

Para estimar la cantidad de alimento disponible, se midió la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos presentes en el agua. El agua era filtrada a través de un filtro de nylal de 10  $\mu$ m de diámetro, obteniendo de esta forma una estima, del alimento que consumen preferentemente los rotíferos. La fracción soluble también fue medida en el agua filtrada a través de Watman GF/C. La metodología empleada para estos análisis es la misma que se describió en el capítulo anterior.

También se realizaron medidas del cuerpo de animales vivos, con el fin de calcular el volumen de los individuos. Para ello se usaron las fórmulas dadas por Ruttner-Kolisko (1977).

## II. EXPERIENCIAS EN EL MEDIO NATURAL

El estudio de los cladóceros, demostró que los resultados obtenidos en el laboratorio pueden ser algo distintos de los observados en el medio natural. Este hecho, junto con la dificultad que entraña el cultivo de algunas especies de rotíferos que se desarrollan en los ecosistemas estudiados, aconsejó centrar las investigaciones en el estudio de poblaciones del medio natural. Esto es posible, gracias a la sensibilidad de los métodos empleados que permiten poder trabajar con pocos animales y, por lo tanto, no ser necesario el uso de cultivos de laboratorio.

### II.1 Material y Métodos

Las muestras se obtuvieron tanto en lagunas del Parque Nacional de Doñana, así como en fuentes de la ciudad de Sevilla. Una vez obtenidas las muestras, estas se llevaban inmediatamente al laboratorio para su análisis. En el caso de las muestras realizadas en Doñana, los animales eran seleccionados en el propio parque, congelando inmediatamente las muestras, de la misma forma que se hacía para el análisis de cladóceros.

Tabla 30. Mínimo y máximo valor del contenido de proteínas y la media de este rango, para diferentes especies de rotíferos, medidas a varias concentraciones de alimento.

ESPECIES	CONCENTRACION DE ALIMENTO		RANGO PROTEINAS	VALOR MEDIO DEL RANGO	N
	(µg proteina/ml)		(µg/ind)	(µg/ind)	
Volumen (µm³)					
Longitud (µm)	<10µm	<0.2µm			
<i>Asplanchna brightwelli</i>	27.25	26.94	0.40-0.82	0.61	10
7	22.45	19.94	0.28-1.40	0.84	12
$\bar{V}$ - 1.725*10	15.95	-	0.26-2.55	1.40	10
	12.86	9.66	0.85-1.25	1.05	8
$\bar{L}$ - 491.41	9.09	-	0.45-1.47	0.96	13
	8.78	8.06	0.11-0.36	0.24	21
<i>Hexarthra fennica</i>	7.25	-	0.09-0.24	0.16	14
5					
$\bar{V}$ - 7.63*10					
$\bar{L}$ - 156					
<i>Brachionus urceolaris</i>	25.57	-	0.16-0.51	0.33	25
5					
$\bar{V}$ - 6.99*10					
$\bar{L}$ - 171.1					
<i>Brachionus calyciflorus</i>					
f. anuraeiformis	27.25	26.94	0.38-0.45	0.41	7
5	22.23	11.5	0.21-0.60	0.40	17
$\bar{V}$ - 4.68*10	18.06	-	0.33-0.55	0.44	18
	15.95	-	0.13-0.54	0.34	26
$\bar{L}$ -150.35	12.90	-	0.04-0.63	0.33	32
	12.86	9.66	0.17-0.58	0.37	20
	8.78	8.06	0.06	0.06	4
	7.28	7.85	0.04-0.18	0.10	15
<i>Keratella tropica</i>	27.25	26.94	0.26-0.44	0.35	10
5	22.45	19.94	0.29-0.49	0.39	14
$\bar{V}$ - 2.57*10	22.23	11.5	0.43-0.46	0.44	8
	18.06	5.3	0.20	0.20	3
$\bar{L}$ - 103.31	15.95	-	0.10-0.27	0.18	18
	14.56	10.94	0.12-0.41	0.26	14
<i>Filinia terminalis</i>	22.23	11.5	0.08-0.17	0.12	15
-	18.06	5.3	0.02-0.18	0.10	18
5	15.95	-	0.05-0.21	0.13	8
$\bar{V}$ - 1.72*10					
$\bar{L}$ - 102.43					
<i>Trichocerca</i> sp.	27.25	26.94	0.17-0.18	0.17	9
4	22.45	19.94	0.15-0.35	0.25	8
$\bar{V}$ - 9.47*10					
$\bar{L}$ - 105.86					

## II.2 Resultados

En la Tabla 30, se presentan los valores de proteínas obtenidos para cada una de las especies analizadas. En los ecosistemas estudiados se desarrollaban otras especies como *Brachionus angularis*, *B. budapestinensis*, *Polyarthra major* y *Synchaeta pectinata*, pero sus poblaciones no fueron suficientemente importantes en número, como para poder realizar los análisis.

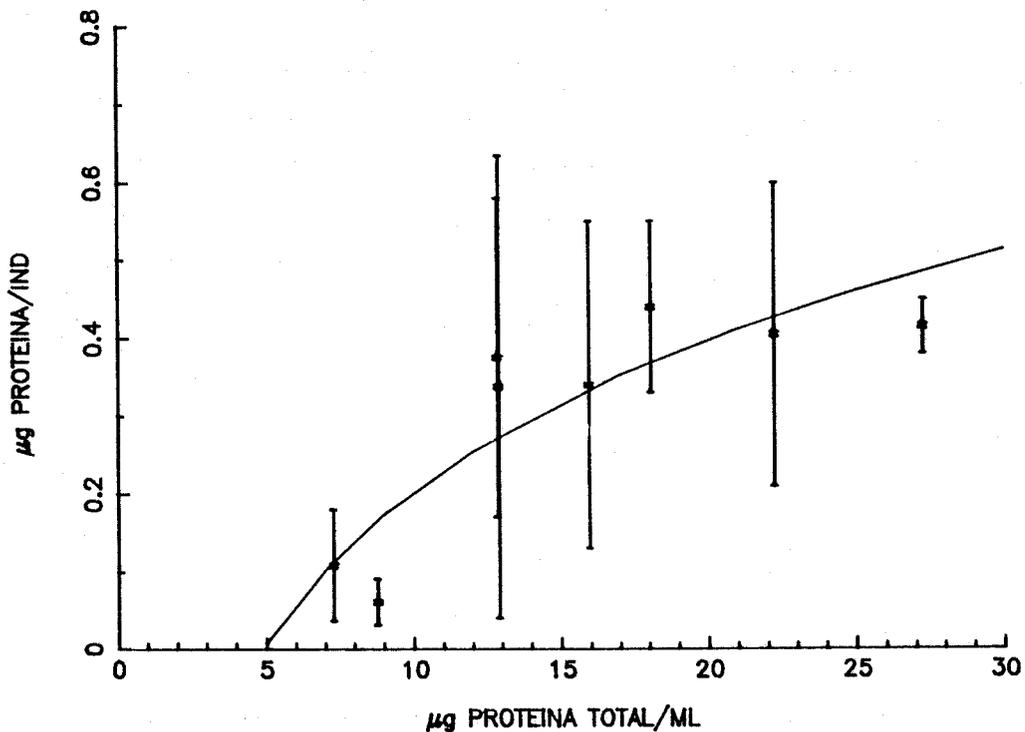


FIGURA 16. Relación entre la concentración de alimento (C) y el valor medio del rango de proteínas (P) para *Brachionus calyciflorus*. Las líneas verticales representan el rango en el contenido en proteínas entre el mínimo y el máximo valor encontrado para cada concentración de alimento. La ecuación representada es:  $P = -0.446 + 0.282 \cdot \ln (C)$ .

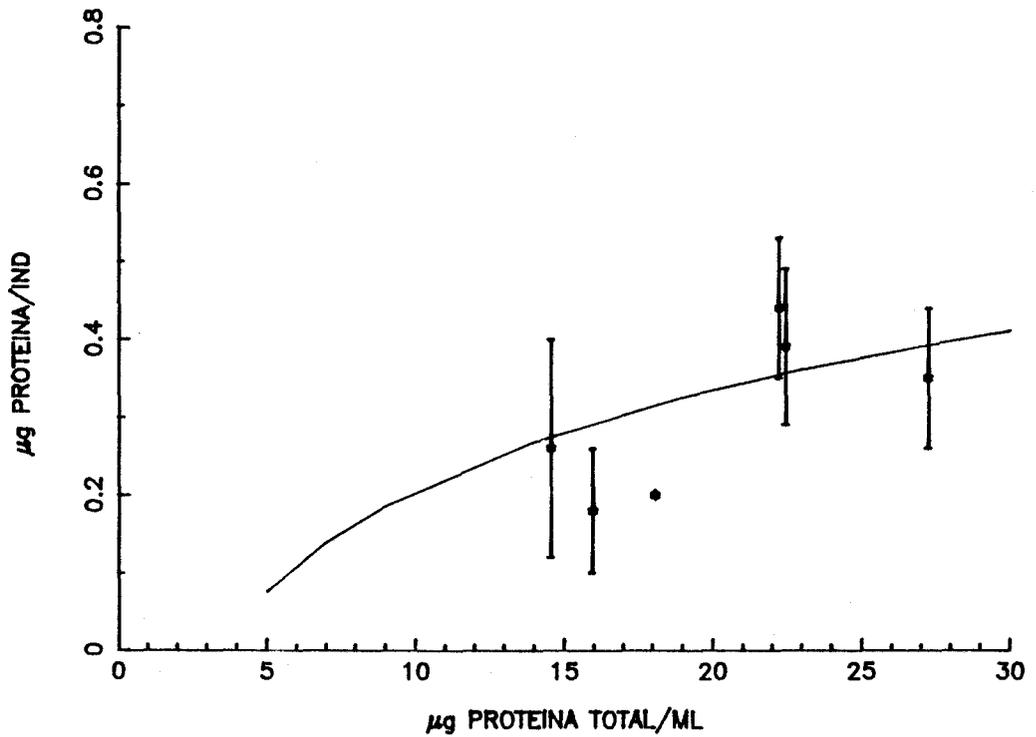


FIGURA 17. Relación entre la concentración de alimento (C) y el valor medio del rango de proteínas (P) para *Keratella tropica*. Las líneas verticales representan el rango en el contenido en proteínas entre el mínimo y el máximo valor encontrado para cada concentración de alimento. La ecuación representada es:  $P = -0.225 + 0.187 \cdot \ln(C)$ .

*Brachionus calyciflorus* ha sido la especie mas ampliamente representada en las lagunas muestreadas. En la Figura 16 se muestra la variación en el contenido proteínico de *B. calyciflorus* para varias concentraciones de alimento. Se encontró una buena relación entre el contenido proteínico por animal (P) y las proteínas totales existentes en el medio(C):

$$(12) P = -0.446 + 0.282 \cdot \ln C \quad (r^2 = 0.76, p < 0.001)$$

Una relación similar se encontró para *Keratella tropica* (Figura 17), que seguía la ecuación:

$$(13) P = -0.255 + 0.187 \cdot \ln C \quad (r^2 = 0.66, p < 0.001)$$

Por el contrario, en el caso de *Asplanchna brightwelli* no se encontró esta relación. Esto sin duda es debido al tipo de alimentación, que en el caso de esta especie es carnívoro.

En lo que se refiere a las sustancias de reserva, en la Tabla 31 se muestran los contenidos en carbohidratos de las distintas especies a distintas concentraciones de alimento y su relación con el contenido en proteínas. Esta parece ser la principal reserva que acumulan, ya que los rotíferos no parecen acumular lípidos como sustancias de reserva. La cantidad de lípidos en el caso de *B. calyciflorus* era prácticamente la misma, en presencia o ausencia de huevos, y esto se cumplía también en el caso de *A. brightwelli* (Tabla 32). Los lípidos representaban aproximadamente el 1.06% de la biomasa total en el caso *B. calyciflorus* y 1.5% para *A. brightwelli*.

Tabla 31. Relación entre el contenido en proteínas/carbohidratos (ch) a varias concentraciones de alimento para diferentes rotíferos. La concentración de alimento mencionada aquí, es la medida en el agua filtrada a través de 10  $\mu$ m. C0: rotíferos sin huevos; C1: rotíferos con 1 huevo; C2: rotíferos con dos huevos; etc. N= número de individuos testados.

ESPECIES	CONCENTRACION DE ALIMENTO		CONTENIDO MEDIO EN PROTEINAS		CONTENIDO MEDIO EN CH		CH (%)
	( $\mu$ g proteina/ml)	( $\mu$ g ch/ml)	( $\mu$ g/ind)	N	( $\mu$ g/ind)	N	
<i>Asplanchna brightwelli</i>	15.95	13.00	C0: 1.173	8	0.059	5	4.7
			C1: 0.768	2	0.116	2	13.1
	12.86	7.33	C0: 0.850	4	0.056	5	6.2
			C1: 1.190	4	0.167	9	12.3
<i>Hexarthra fennica</i>	7.25	8.46	C0: 0.166	10	0.029	22	15.1
<i>Brachionus calyciflorus f. anuraeiformis</i>	26.38	23.28	C0: -	-	0.027	17	-
			C1: -	-	0.052	16	-
			C2: -	-	0.123	3	-
	22.23	10.01	C0: 0.260	8	0.018	7	6.5
			C3: 0.600	4	0.062	8	9.4
	15.95	13.00	C0: 0.275	12	0.028	16	9.2
			C1: 0.380	14	0.066	24	14.8
	12.90	11.46	C0: 0.108	20	0.039	30	26.5
C1: 0.191			11	0.045	24	19.1	
C2: 0.631			1	0.113	2	15.1	
12.86	7.33	C0: 0.230	8	0.022	13	8.7	
		C1: 0.405	8	0.047	6	10.4	
<i>Filinia terminalis</i>	22.23	10.01	C0: 0.086	9	0.002	8	2.3
			C1: 0.170	8	0.020	6	10.5

Tabla 32. Valor medio del rango de lípidos, para dos especies de rotíferos. N = número de individuos analizados.

ESPECIES -----	VALOR MEDIO DEL RANGO ----- ( $\mu\text{g}/\text{ind}$ )	N -----
<i>Asplanchna brightwelli</i>	C0: 0.025	15
	C1: 0.019	15
	C0: 0.023	15
	C2: 0.010	15
<i>Brachionus calyciflorus</i> <i>f. anuraeiformis</i>	C0: 0.009	25
	C1: 0.003	17
	C2: 0.008	15

### II.3 Discusión

Los resultados del análisis de proteínas en *B. calyciflorus*, sugieren que un incremento de la concentración de alimento, da lugar a un aumento en el contenido de proteínas de los animales (Figura 16). Este incremento, como es lógico, es menos pronunciado a medida que hay mas alimento. Esto se debe a que al llegar a una cierta concentración de alimento, por mucho que éste aumente los individuos ya no incrementan su contenido en proteínas. Pourriot y LeBorgue (1970), aplicando este mismo método encontraron un rango de proteínas en *B. calyciflorus*, que iba de 0.1 a 0.38  $\mu\text{g}/\text{individuo}$ , muy semejante al obtenido en este trabajo. La temperatura en las lagunas muestreadas osciló entre 15 a 23 °C, aunque no se ha mostrado como un factor muy importante. Sin embargo, Galkovskaya et al. (1987) observaron en *B. calyciflorus*, un descenso importante en el contenido en

proteínas a medida que se incrementaba la temperatura. A partir de 20 °C hasta los 35 °C, había un descenso de 0.22 a 0.08  $\mu\text{g}/\text{individuo}$ .

*Keratella tropica* muestra un patrón similar al de *B. calyciflorus* (Figura 17). Aunque no existen datos suficientes de otras especies, se puede esperar un comportamiento similar.

Los resultados obtenidos indican que la concentración de alimento necesaria para que los animales lleguen al máximo contenido proteínico, es menor conforme más pequeñas son las especies. Al observar la Tabla 30, se ve como el rango de proteínas en *Filinia terminalis*, no cambia entre la concentración de alimento que va de 15.95 a 22.23  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Sin embargo, *Keratella tropica* varía de 0.293 a 0.355 y *B. calyciflorus* todavía presenta un rango mayor que va de 0.335 a 0.428, entre esas dos concentraciones de alimento. Por lo tanto, parece ser que las especies más grandes requieren más alimento para llegar a su óptimo nutritivo y su contenido en proteínas cambia dentro de un mayor rango de alimento que en el caso de las especies más pequeñas. Esto ya fue encontrado por Stemberger y Gilbert (1985b; 1987), los cuales mostraron que el alimento requerido para aumentar la población era menor conforme más pequeña era la especie.

Dentro de las especies del zooplancton, solamente en el caso de los copépodos y los cladóceros, se conoce que acumulen lípidos como sustancias de reserva (Goulden y Henry, 1984).

Wurdak et al. (1978) encontraron gotas de lípidos en los huevos de las especies *B. calyciflorus* y *Asplanchna sielbodi*, y sugirieron la posibilidad de que estos componentes podían ser usados como sustancias de reserva. De los resultados obtenidos en este trabajo, se deduce que los carbohidratos parecen ser la principal fuente de reserva en rotíferos. El contenido en carbohidratos en *B. calyciflorus* en las hembras sin huevos, es  $0.027 \pm 0.003 \mu\text{g}/\text{individuo}$ ; para las hembras con un huevo es de  $0.052 \pm 0.0004 \mu\text{g}/\text{individuo}$  y  $0.118 \pm 0.025 \mu\text{g}/\text{individuo}$  para hembras que transportan dos huevos. El contenido medio en carbohidratos para *Asplanchna brightwelli* es de  $0.057 \pm 0.001 \mu\text{g}/\text{individuo}$  para hembras sin embrión, y  $0.141 \pm 0.025 \mu\text{g}/\text{individuo}$  para hembras con embrión.

A pesar de que *Asplanchna brightwelli* presenta una mayor cantidad de carbohidratos que *B. calyciflorus*, esto puede deberse simplemente al tamaño, ya que la relación proteína/carbohidrato, es similar en ambas especies (Tabla 31). De las otras especies, no existe información suficiente disponible sobre la inversión en sustancias de reserva.

El contenido en carbohidratos de las especies estudiadas solo se ha podido medir a concentraciones de alimento por encima de  $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ . A niveles de alimento menores, los individuos eran escasos y además había pocos individuos con huevos. Por lo tanto, de los datos obtenidos en el campo no es posible determinar qué sucede con las sustancias de reserva cuando el alimento escasea. Esto es un tema muy importante, ya que sería

muy interesante conocer si existe un descenso en la cantidad de carbohidrato que los rotíferos invierten en reproducción a bajas concentraciones de alimento o si, por el contrario, la cantidad de carbohidrato permanece constante y lo que se da simplemente es una reducción en el número de huevos. Como en condiciones naturales es difícil encontrar poblaciones estables con el número suficiente de individuos y huevos para poder hacer los análisis, fue necesario realizar cultivos en el laboratorio, en los que se pudiera tener el suficiente número de animales a bajos niveles de alimento.

### III. EVOLUCION DE LAS SUSTANCIAS DE RESERVA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALIMENTO

Hutchinson (1967) vió como el tamaño de los huevos en diaptómidos era menor en primavera cuando tenían sacos con muchos huevos, mientras que, en verano, los animales tenían menor número de huevos por hembra pero de mayor tamaño. Según él, estas diferencias estaban relacionadas con los cambios en el alimento. En un trabajo posterior, Burns (1988) trabajando también con copépodos, encontró que, en el caso de la especie *Boeckella humata*, a mayor tamaño de los huevos la supervivencia de los nauplios era mayor. Esto se debe a que, los nauplios en las primeras fases larvarias, no se alimentan y viven de las sustancias de reserva que tenían acumuladas en los huevos. La relación tamaño de los huevos/ supervivencia de los nauplios, no era igual para todas las especies.

En el presente estudio, en los cladóceros se ha visto como, al disminuir el alimento, las hembras acumulan mas lípidos para aumentar la viabilidad de su descendencia, aunque esta tendencia en teoría no se mantendría a concentraciones muy bajas de alimento.

En el caso de los rotíferos, la situación es diferente. El desarrollo de los rotíferos es directo, no existe una larva genuina (Ruttner-Kolisko, 1974), es decir, el animal al nacer ya tiene todas las características del adulto. Durante la primera fase después de la emergencia, el tamaño del cuerpo no cambia,

ya que las sustancias de reserva que tenían acumuladas en el huevo ya han sido consumidas. Solamente cuando el alimento que ingiere el neonato sea metabolizado, entonces podrá comenzar la siguiente fase en la cual se produce el crecimiento hasta llegar a adulto (Ruttner-Kolisko, 1974). De todas formas, en el caso de los rotíferos, un aumento en el volumen del huevo también puede tener importantes consecuencias. A mayor volumen de huevo, el neonato después del nacimiento necesitará solamente un pequeño crecimiento para llegar a adulto. Walz (1983) observó que el volumen del huevo podía variar de unas especies a otras considerablemente. En el caso de *Keratella cochlearis*, el volumen del huevo, era aproximadamente el 65% del volumen del adulto, y en el caso de *Brachionus angularis* era de un 17%. Por lo tanto, ambas especies parecen seguir estrategias muy distintas, *K. cochlearis* optimiza la energía destinada para la reproducción, mientras que *B. angularis* la invierte en aumentar el número de descendientes (Walz, 1983).

A parte de estas diferencias existentes entre las especies, se plantea otra cuestión importante y es que, cuando consideramos una sola especie, ¿cual es la estrategia reproductiva que sigue a diferentes concentraciones de alimento?; ¿aumenta el volumen de los huevos y, por consiguiente, las sustancias de reserva, a bajas concentraciones de alimento?; de existir un aumento en el volumen de los huevos, ¿éste va asociado a una disminución del número de los mismos?. Para poder responder a éstas, y otras cuestiones, se planteó un

estudio en el laboratorio con la especie *Brachionus calyciflorus* f. *typica*, cultivandola a diferentes concentraciones de alimento.

### III.1 Material y Métodos

El diseño del experimento está tomado de un trabajo realizado anteriormente por Stemberger y Gilbert (1985a; 1985b; 1987). *Brachionus calyciflorus* fue aislado de una fuente en Sevilla, y se establecieron clones a partir de varias hembras. El agua de la laguna fue filtrada a través de filtros Whatman GF/C de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro, y posteriormente fue esterilizada. como alimento se utilizó *Chlorogonium* sp. ( $270 \mu\text{m}^3$ ,  $3.54 \cdot 10^{-4}$   $\mu\text{g}$  peso seco/célula) cultivada en un medio según Sueoka's et al. (1967). Estas algas en su fase exponencial de crecimiento, se concentraban por centrifugación y se resuspendían en el agua de la laguna que previamente se había esterilizado. Las concentraciones de alimento se determinaron contando las algas en un microscopio invertido Nikon, diluyendose posteriormente hasta alcanzar el nivel de alimento deseado.

Para el experimento, los rotíferos fueron cultivados en tubos en un volumen de 8 ml de la concentración de algas. Los animales se mantenían en el medio durante dos días antes de comenzar el experimento, para que se aclimataran a la concentración de alimento. Después de este periodo se introducían en cada tubo 5 animales, haciendo cinco replicas por

cada concentración de alimento. Cada día se contaban los rotíferos y el número de huevos, y se transferían todos los animales a un nuevo tubo conteniendo medio fresco a la concentración experimental deseada. Estos cultivos, se mantenían en una cámara de crecimiento a 20 °C con un fotociclo de 14 : 10 luz/oscuridad y una intensidad de 430 lux dada por dos tubos fluorescentes blancos. El cultivo se mantenía en estas condiciones durante 3 a 4 días, dependiendo del tamaño de la población, para que el alimento no se hiciese limitante.

Una vez alcanzada la cantidad de rotíferos necesaria, los animales se cambiaban a medio fresco y al cabo de tres horas comenzaba el proceso para el análisis de proteínas y carbohidratos de los animales. Este proceso es el que se explicó anteriormente (página 92).

El alimento suministrado en el último día, también fue analizado, para determinar la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos que estaban disponibles para los animales. Se hicieron dos tipos de análisis: en el primero se medían las proteínas, carbohidratos y lípidos totales; en el segundo se centrifugaba el medio, para retirar las algas, analizando así las proteínas, carbohidratos y lípidos solubles. La fracción particulada se obtenía restando las dos medidas anteriores. La técnicas empleadas son las que se explicaron en el capítulo anterior.

Se hicieron medidas del tamaño del cuerpo y de los huevos en hembras ovígeras adultas. Los volúmenes de los cuerpos y del huevo, se calcularon usando en ambos casos, la fórmula de un elipsoide general:  $0.52 \cdot \text{longitud} \cdot \text{ancho} \cdot \text{alto}$  dada por Ruttner-Kolisko (1977).

A la hora de hacer comparaciones entre el volumen de los huevos y el contenido en carbohidratos de los individuos, cultivados en distintas concentraciones de alimento, se usó la clase 1, ya que en todos los casos, se encontraron animales que llevaban un huevo.

### III.2 Resultados

En la Figura 18, se observa el crecimiento de *B. calyciflorus* a distintas concentraciones de alimento. Se ve un crecimiento exponencial semejante al obtenido por Stemberger and Gilbert (1985b). En esta Figura, se ve que se ha utilizado la biomasa como indicador del alimento disponible. Esto se debe a que la tasa de crecimiento de la población, así como la cantidad de carbohidratos de los individuos, están más relacionados con la biomasa que con la concentración de proteínas totales en el agua (Tabla 33). Ahora bien, al igual que sucedía con los datos obtenidos en el medio natural, el contenido en proteínas de los individuos, está más relacionado a las proteínas totales del agua (Figura 23). Es decir, las variaciones en la densidad de la población y en las sustancias de reserva, están más

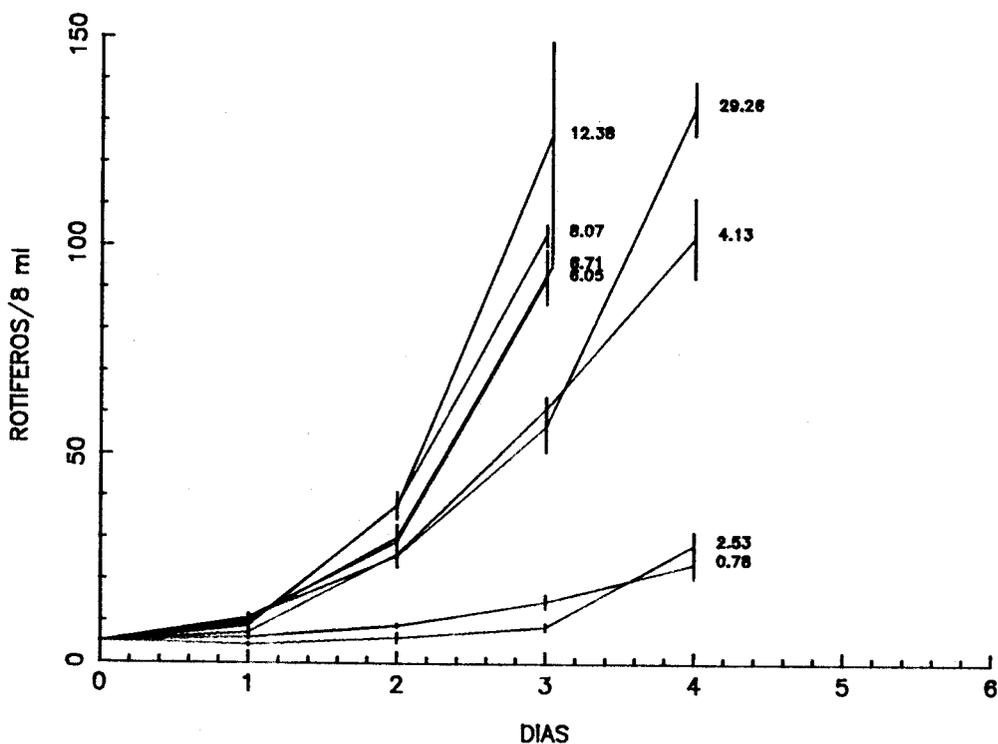


FIGURA 18. Crecimiento diario de la población de *Brachionus calyciflorus* a varias concentraciones de alimento (en  $\mu\text{g/ml}$  de peso seco).

influenciadas por la cantidad de alimento, mientras que la cantidad de proteínas de los individuos, está mas relacionada con las proteínas totales del medio. Esto puede guardar relación, con lo encontrado por Snell y Carrillo (1984), que observaron que la calidad del alimento influye en el tamaño del cuerpo en algunas especies, y el tamaño está muy relacionado con la cantidad de proteínas del individuo.

Tabla 33. Contenido en proteínas y carbohidratos para todas las clases, y volumen de los huevos de los animales de la clase 1, a diferentes concentraciones de alimento. La relación entre las proteínas, carbohidratos y lípidos, corresponde al alimento suministrado el último día del experimento.

111

CLASE	PROTEINAS		CARBOHIDRATOS		VOLUMEN DEL HUEVO		CONCENTRACION DE ALIMENTO			
	$\mu\text{g}/\text{animal}$	n	$\mu\text{g}/\text{animal}$	n	$\mu\text{m}^3$	n	Peso Seco $\mu\text{g}/\text{ml}$	Proteinas %	Carbohidratos %	Lípidos %
C0	0.263±0.175	7	0.017±0.005	24	224912±9144	7	29.26	47.3	5.1	47.6
C1	0.27	3	0.043±0.004	8						
C2	0.421±0.060	4	0.024±0.003	12						
C3	0.433±0.126	6	0.076±0.032	8						
C0	0.390±0.030	18	0.050±0.013	25	233742±5986	8	12.38	82.3	11.8	5.9
C1	0.553±0.052	10	0.051±0.015	16						
C2	1.016	2	0.024	3						
C0	0.143±0.025	13	0.066±0.042	21	295473±12041	12	8.07	32.7	67.1	0.2
C1	0.178±0.018	6	0.109±0.055	15						
C2	0.540±0.113	3	0.05	4						
C0	0.151±0.028	16	0.006±0.001	17	309077±9652	9	6.71	96.5	3.4	0.1
C1	0.199±0.013	4	0.170±0.059	12						
C2	0.213	2	0.191	3						
C0	0.102±0.025	12	0.023±0.016	21	422311±21227	8	6.05	82.3	9.9	0.8
C1	0.151±0.045	6	0.389±0.169	6						
C2	0.756	1	0.364	1						
C0	0.144±0.023	19	0.097±0.026	14	339407±12616	7	4.13	25.8	74.2	0
C1	0.305±0.017	5	0.258±0.156	8						
C0	0.245±0.050	10	0.014±0.011	30	296453±12175	13	2.53	23.1	23.2	53.7
C1	0.244±0.015	8	0.038±0.009	11						
C2	0.594±0.003	3	0.451	3						
C0	0.158±0.023	20	0.010±0.002	28	223278±29653	8	0.78	84.1	15.9	0
C1	0.211	1	0.025±0.021	7						

En la Figura 18 también se observa como, cuando la concentración de alimento es alta (29.26  $\mu\text{g/ml}$ , peso seco), había una disminución del crecimiento de la población. Esto puede ser debido a la saturación del aparato filtrador (Halbach y Halbach-Keup, 1974), lo que se puede confirmar ya que el contenido en proteínas de los animales disminuye a esa concentración de alimento (Tabla 33).

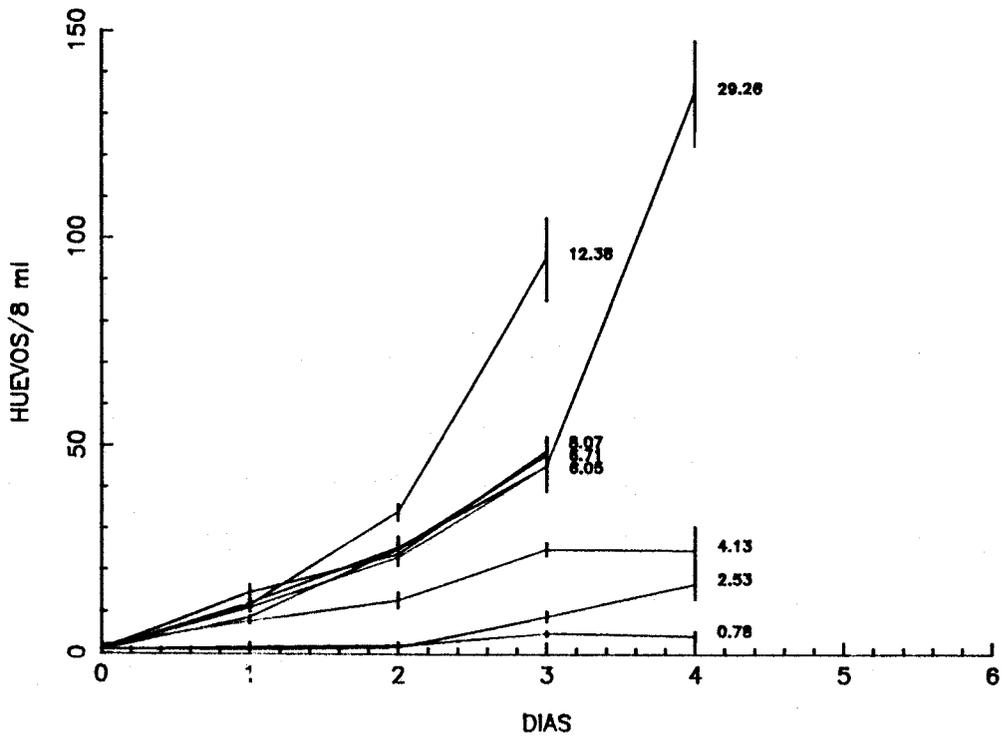


FIGURA 19. Variación diaria en el número de huevos a diferentes concentraciones de alimento.

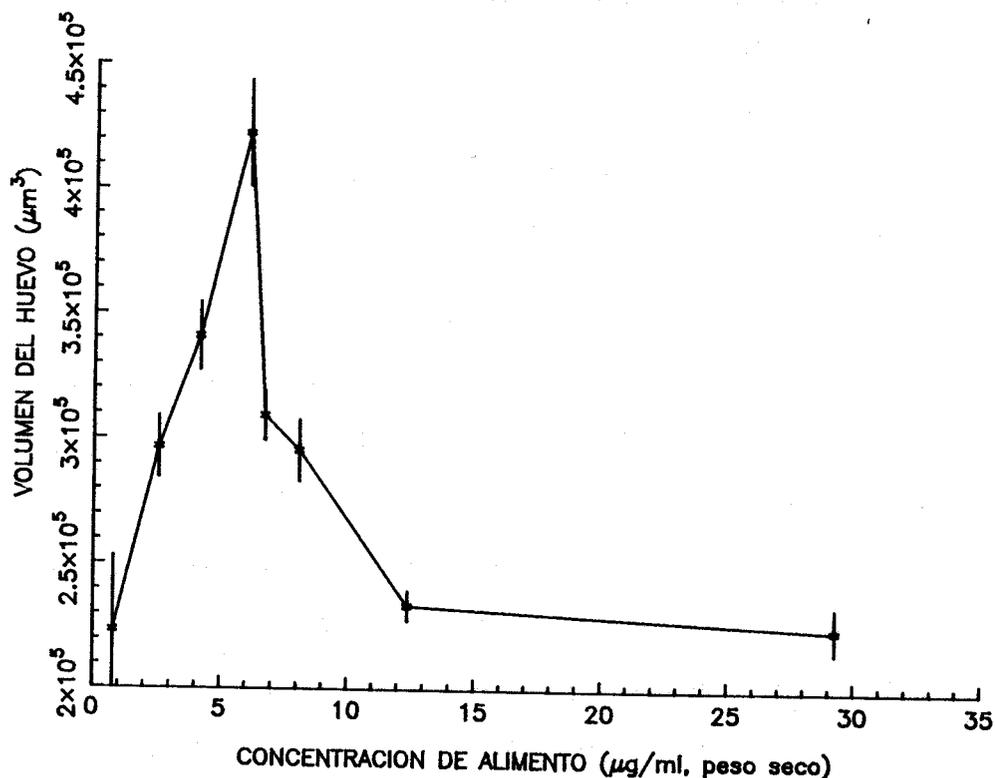


FIGURA 20. Evolución en el volumen del huevo (Clase 1) a diferentes concentraciones de alimento.

En lo que se refiere a la estrategia reproductiva que sigue *B. calyciflorus*, en la Figura 19 se ve como a medida que disminuye el alimento, desciende el número de huevos producidos por las hembras, lo que es lógico y esperable. Ahora bien, la dinámica de las sustancias de reserva, presenta un patrón distinto. Esta dinámica se puede entrever al observar la variación en el volumen del huevo a distintas concentraciones de alimento (Figura 20). Se ve como cuando el alimento es abundante, el volumen es pequeño; a medida que comienza a

disminuir el alimento, se incrementa el tamaño de los huevos, hasta llegar a un umbral en el cual el alimento disponible no es suficiente para poder mantener esta tendencia. Esta estrategia de *B. calyciflorus*, se confirma cuando se observa la evolución de los carbohidratos (Figuras 21 y 22), que es muy parecida a la observada anteriormente con el volumen de los huevos.

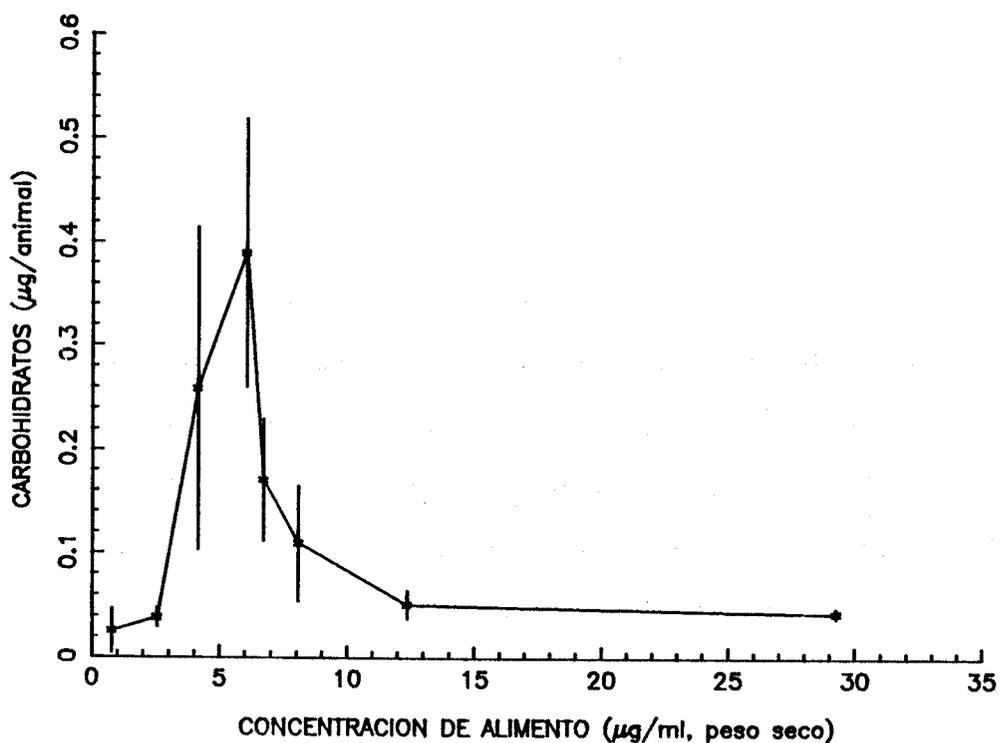


FIGURA 21. Evolución en el contenido en carbohidratos de hembras portando un huevo (Clase 1), en relación al alimento.

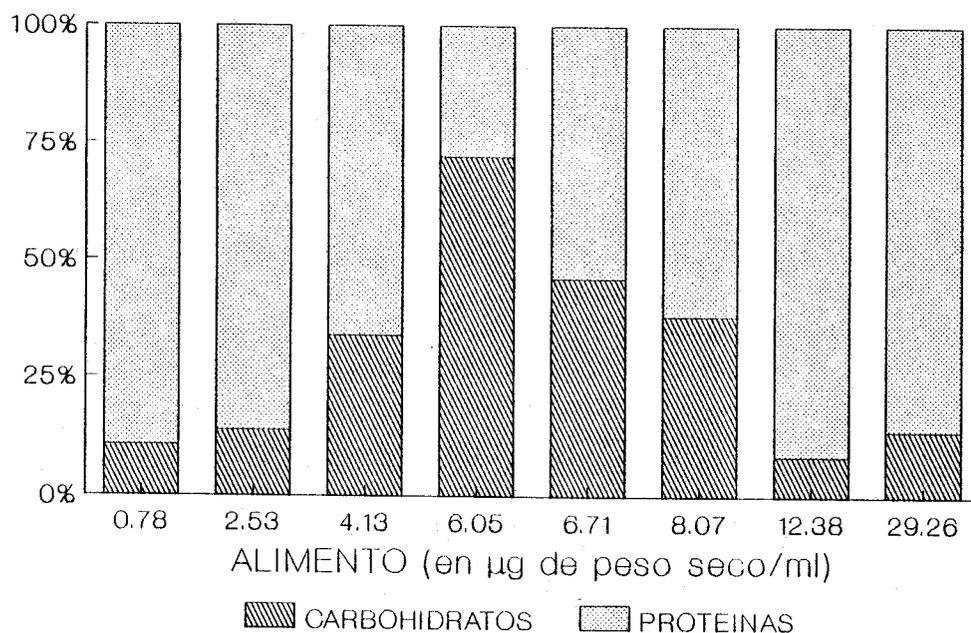


FIGURA 22. Proporción (en %) del contenido en proteínas y carbohidratos en hembras portando un huevo (Clase 1), en relación al alimento.

### III.3 Discussion

De los resultados obtenidos en este experimento, se observa un claro comportamiento por parte de *B. calyciflorus*. Cuando la concentración de alimento es la óptima (aproximadamente 12.38  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) los animales invierten la energía en aumentar el número de recién nacidos, invirtiendo poco en la viabilidad de los mismos. A medida que el alimento disminuye, lógicamente el número de huevos se reduce. Ahora bien, *B. calyciflorus* adopta una estrategia con el fin de poder seguir manteniendo una tasa

de crecimiento de la población alta. Las hembras ahora invierten menos energía en producir muchos huevos, y han revertido esta energía en aumentar el volumen de los mismos (Figuras 19 y 20). Pourriot (1973) observó en *B. calyciflorus* una relación inversa entre el volumen del huevo y la duración del desarrollo de los animales. Esto quiere decir, que con este cambio de estrategia, los neonatos salen del huevo mas desarrollados, y así se consigue que un prefértil o periodo juvenil mas corto, llegando antes a adultos y pudiendo así reproducirse pronto (Duncan and Gulati, 1983).

Con este comportamiento se consigue que, a pesar del descenso en el número de huevos (Figura 19), el número de individuos de la población no desciende mucho entre las concentraciones de alimento de 12.38 y 6.05  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 18). A partir de una concentración cercana al 6.05  $\mu\text{g/ml}$ , el volumen de los huevos y las sustancias de reserva comienzan a disminuir. Esto da lugar a un descenso importante en el número de individuos. Mientras que entre las concentraciones de 12.38 y la de 6.05 presentaban a los tres días una diferencia de unos 35 animales, para ese mismo periodo de tiempo, esa misma diferencia se daba entre las concentraciones de 6.05 y 4.13 (Figura 18).

Sarma y Rao (1987) trabajando con *Brachionus patulus*, observaron que al aumentar el alimento, se producía un incremento en el volumen de los huevos, pero no observaron que a altas concentraciones se produjera un descenso. Este mismo comportamiento fue observado por Walz y Rothbucher (en prensa)

trabajando con *Brachionus angularis*. De todas formas hay que mencionar, que en ambos casos trabajaron con concentraciones de alimento muy bajas y por lo tanto tal vez es posible que a concentraciones mayores se obtenga unos resultados semejantes a los observados en este trabajo con *B. calyciflorus*.

El volumen del huevo en el caso de *B. patulus* oscila entre 250000-400000  $\mu\text{m}^3$ , valores muy cercanos a los de *B. calyciflorus* (Figura 20). Por el contrario el area máxima del cuerpo en *B. patulus* rondaba las 19000  $\mu\text{m}^2$ , mientras que *B. calyciflorus* alcanza valores mayores de 34000  $\mu\text{m}^2$ . Esto nos indica que *B. patulus* invierte proporcionalmente mucho mas en aumentar la viabilidad de su descendencia. Walz (1983) obsevó que la relación volumen del huevo/volumen del cuerpo en *Brachionus angularis* era de un 17%, mientras que en *Keratella cochlearis* era de un 65%. Por lo tanto, esta última especie parecía tener una estrategia k mientras que *B. angularis* seguía una estrategia r. La relación volumen del huevo/volumen del cuerpo en el caso de *B. calyciflorus* oscilaba entre un 14.3% a un 26.8%, teniendo así, un comportamiento semejante al de *B. angularis*. Esto se confirma, por los resultados obtenidos en este trabajo. El reducir el volumen de los huevos cuando aumenta el alimento, es una clara estrategia r. Como a altas concentraciones de alimento, los neonatos no tienen problemas para llegar adultos, *B. calyciflorus* revierte en producir mayor número de descendientes, la energía que antes invertía en producir grandes neonatos. Con esto se consigue una tasa de

crecimiento muy alta. Por ejemplo a la concentración de 12.38  $\mu\text{g/ml}$  se pasa de 5 hasta 125 animales/8 ml en tan solo 3 días. Lógicamente, esta estrategia le puede ser muy útil cuando el alimento es abundante. Guisande y Toja (1988), observaron como en el estuario del río Guadalquivir *B. calyciflorus* dominaba sobre *B. urceolaris* cuando había mucho alimento, y cuando el alimento disminuía aumentaba la población de *B. urceolaris* y disminuía la de *B. calyciflorus*.

Por otro lado, es interesante destacar, que el volumen mínimo del huevo para *B. calyciflorus* es aproximadamente 224000  $\mu\text{m}^3$ , ya que coincide tanto a condiciones óptimas como a mínimas de alimento. Lógicamente, las sustancias de reserva también coinciden (Figura 21), y por lo tanto debido a esto se ha encontrado una buena relación entre el contenido medio en carbohidratos (C) por animal, considerando todas las clases, y el volumen del huevo (E):

$$C = -0.232 + 1.17 \cdot 10^{-6} \cdot E, (r^2 = 0.9, p < 0.001)$$

Es necesario mencionar, que esta relación se ha obtenido utilizando unas condiciones óptimas de alimento para *B. calyciflorus*, situación que no se da en el campo. En este trabajo también se ha encontrado una buena relación entre el contenido proteínico medio de los animales (considerando todas las clases) y la proteína total existente en el medio ( $r^2=0.91$ ,  $p<0.001$ ). Esta relación ya fue encontrada con los datos

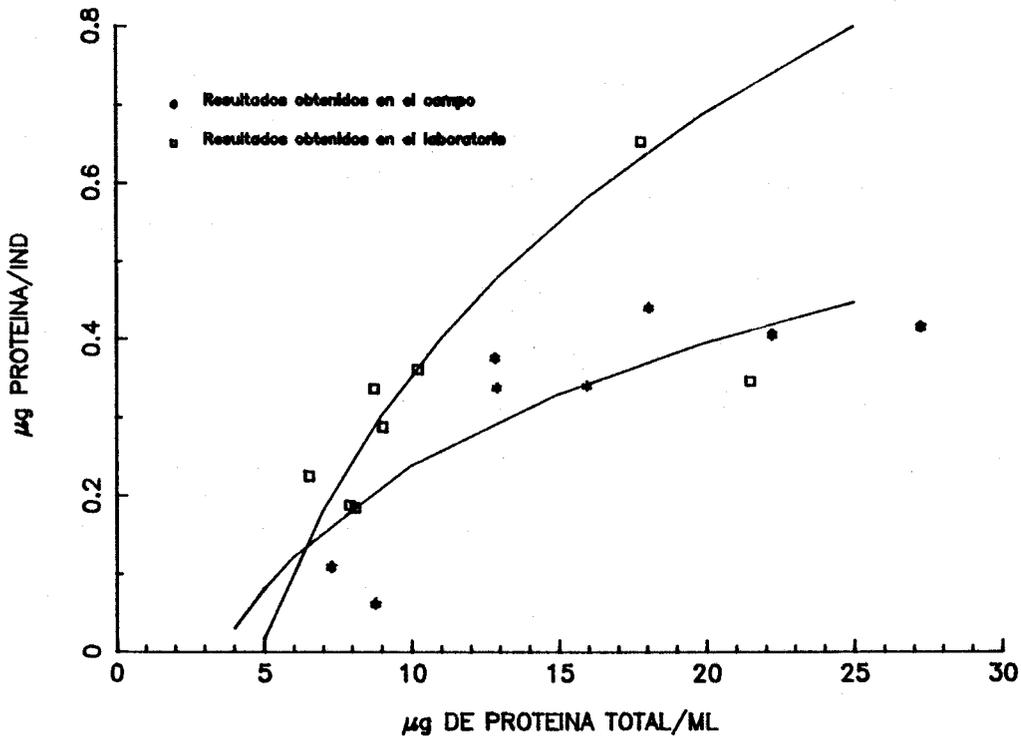


FIGURA 23. Comparación entre las relaciones existentes entre la proteína total ( $\mu\text{g/ml}$ ) del medio, y el contenido medio en proteínas en los individuos de *Brachionus calyciflorus*, en las experiencias de campo y de laboratorio.

obtenidos en el campo (ecuación 12), pero no concuerda con la obtenida aquí (Figura 23), ya que se ve como a la misma concentración de proteínas totales, el contenido proteínico era mayor en los animales cultivados en el laboratorio. Por lo tanto la relación mencionada anteriormente, puede no ser utilizable al estudiar animales en el medio natural.

En resumen, *B. calyciflorus* presenta una estrategia reproductiva que le puede ser muy útil en ambientes con suficiente alimento. Este comportamiento, podría no ser el mismo para todas las especies, aunque de existir otros rotíferos, que presenten un comportamiento semejante al de *B. calyciflorus* sería muy interesante comparar la concentración umbral a la cual los animales comienzan a disminuir las sustancias de reserva que invierten en reproducción, ya que este factor podría ser de gran ayuda para comprender mejor la dinámica poblacional de algunas especies de rotíferos.

## CAPITULO III

# COMPARACIONES ENTRE CLADOCEROS Y ROTIFEROS

Los cladóceros y los rotíferos, son dos grupos aparentemente muy diferentes, pero coinciden en tres aspectos muy importantes: 1) ocupan el mismo habitat, 2) presentan el mismo tipo de alimentación (son filtradores) y 3) consumen el mismo tipo de alimento ya que ambos grupos ingieren preferentemente partículas de un rango de tamaño que va de las 4 a las 17  $\mu\text{m}$  (Porriot, 1965, 1977; Dumont, 1977; Bogdan et al., 1980; Bogdan y Gilbert, 1984; Gilbert y Bogdan, 1981; 1984). Estos tres factores hacen que, el grado de solapamiento entre ambos grupos sea muy grande y por lo tanto existe una fuerte competencia. Sin embargo, a pesar de explotar recursos muy parecidos, ambos grupos son bastante diferentes, como resultado de haber adoptado estrategias distintas. Una de las diferencias mas importantes, es el distinto tamaño existente entre ambos grupos. Esto, logicamente, trae consigo otras diferencias importantes, como la capacidad de filtración, movilidad, morfología, etc. El hecho de que dos grupos tan desiguales, estén explotando los mismos recursos, ha dado lugar a que se

hayan realizado muchos estudios para ver cual de los dos, los utiliza mejor y por lo tanto puede desplazar al otro.

De los estudios realizados, parece desprenderse que, por lo general, los cladóceros son mejores competidores que los rotíferos y, por lo tanto estos últimos, suelen disminuir su población o incluso desaparecer en presencia de especies grandes de cladóceros. Ahora bien, ¿Cuál es el factor o factores que hacen que los cladóceros sean mas competitivos?

Como ya se mencionó anteriormente, una de las diferencias mas importantes se da en el tamaño de ambos grupos. Según la teoría de la eficiencia-tamaño dada por Brooks y Dodson (1965), las especies mas grandes son mas eficientes que las mas pequeñas, y por lo tanto en principio los cladóceros podrían tener una ventaja competitiva. Esta teoría se basa en que, las especies mas pequeñas tienen unos costes respiratorios que no pueden mantener cuando la concentración de alimento baja, y esto trae consigo que, cuando el alimento declina, las especies mas pequeñas no sean capaces de mantener una tasa de reproducción suficientemente alta como para poder mantener la población. Se han realizado muchos trabajos posteriores, obteniendose resultados a favor y en contra de esta teoría, pero lo que está claro es que, este podría no ser el único factor que determinara esa mayor competitividad de los cladóceros frente a los rotíferos.

Dodson (1974) mencionó la posibilidad de otro factor que podría estar influyendo. En los cuerpos de agua donde la presencia de los peces es escasa, la proliferación de macroinvertebrados hace que la presión de depredación sobre las especies mas pequeñas sea mayor, y por consiguiente dominan las mas grandes.

Un factor que parece ser mucho más importante, es que las especies de mayor talla, filtran mucho y dan lugar a una disminución del alimento, perjudicando así a las especies mas pequeñas, ya que éstas sobreviven peor cuando el alimento escasea (DeMott y Kerfoot, 1982; Neil, 1984). Otros autores incluso han observado que este efecto de las especies mayores sobre las pequeñas, era mayor en sistemas mas eutróficos y con mas alimento (Romanosvsky y Feniova, 1985; Vanni 1986).

Otro factor que se ha detectado recientemente, es el hecho de que los cladóceros de mayor tamaño, debido a su potente filtración a veces introducen rotíferos en su cámara branquial, y una vez que los expulsan, éstos suelen salir dañados (Gilbert y Stemberger, 1985; Burns y Gilbert, 1986). Este nuevo factor no afecta por igual a todos los rotíferos ya que unos son demasiado grandes y no entran, otros debido a su alta movilidad consiguen escapar, otros permanecen muy poco tiempo en la cámara branquial (menos de 2 segundos) y, por lo tanto, salen poco dañados y por último están los que permanecen mas tiempo y son los que resultan mas perjudicados (Gilbert, 1988).

En este capítulo, se va abordar el tema de la comparación de rotíferos y cladóceros desde otro punto de vista. Como están explotando el mismo recurso, a partir de los resultados obtenidos en los dos capítulos anteriores, se van a intentar encontrar características similares a ambos grupos y así, que puedan ser aplicables a la mayoría de las especies.

## I. PROTEINAS

Tanto en las tres especies de cladóceros planctónicos estudiadas (*Ceriodaphnia reticulata*, *Daphnia longispina* y *Daphnia magna*), como en las especies de rotíferos analizadas en este trabajo (*Brachionus calicyflorus*, *Keratella tropica* y *Filinia terminalis*), los cambios en el contenido en proteínas de los individuos no grávidos vienen causados, casi exclusivamente, por la variación en la cantidad de alimento. Cuando se considera los animales grávidos, en el caso de los cladóceros se producen variaciones en el contenido en proteínas, pero causadas por la presencia de los huevos y embriones y no porque sean usadas como una sustancia de reserva. En los rotíferos ocurre algo semejante, el contenido en proteínas de las hembras con huevos es mayor que las que no los presentan, pero esta diferencia no es tan importante como la que se da con los carbohidratos. Esto indica que el aumento en el contenido en proteínas se puede deber a que los individuos con huevos suelen ser de mayor tamaño y, a su vez, a la proteína presente en el huevo que tiene una función principalmente estructural.

El que el contenido en proteínas de los individuos de las distintas especies en ambos grupos varíe, casi exclusivamente, en función del alimento hace pensar que podría existir algún tipo de relación general para todas estas especies. En apoyo de esto también está el hecho de que todas las especies estudiadas, a excepción del rotífero *Asplanchna brightwelli*, tienen el mismo tipo de alimentación, son filtradoras.

A medida que la especie es mayor, lógicamente, su contenido en proteínas será mas alto. Ahora bien, si existe una relación entre las distintas especies, a medida que aumenta el volumen de cada una de ellas, el contenido en proteínas aumentará de forma proporcional y, por lo tanto, existirá una ecuación que relacione el volumen de las distintas especies con su contenido proteínico.

En el estudio realizado con los rotíferos en el medio natural, descrito en el capítulo anterior en una de las lagunas, que tenía 15.95  $\mu\text{g}$  proteínas totales/ml (Tabla 30), aparecieron tres especies (*Filinia terminalis*, *Keratella tropica* y *Brachionus calyciflorus*) en un número suficiente como para poder ser analizadas. Además, para las tres especies de cladóceros estudiadas en este trabajo existe una ecuación en la que el contenido proteínico de los individuos está en relación al alimento (ecuaciones 2,3 y 4). Por lo tanto fue posible calcular la cantidad de proteínas que se tendrían los individuos de cada una de estas especies de cladóceros a la concentración de alimento (15.95  $\mu\text{g}$  proteína total/ml) en la que se encontraban las tres especies de rotíferos antes mencionadas.

Para hallar esta relación, se necesitaba saber el tamaño y el volumen medio para cada una de las especies de rotíferos, así como el contenido medio en proteínas (Tabla 34). En esta tabla también se incluye *Asplanchna brightwelli* que aunque, no es una especie filtradora, al ser su número también importante en esta laguna, se comparó su contenido en proteínas con las otras

especies.

TABLA 34.- Mínimo y máximo valor del contenido de proteínas, y la media de este rango, para diferentes especies de rotíferos, a la concentración de 15.95  $\mu\text{g}$  de proteínas totales/ml.

Espece	Tamaño medio ( $\mu\text{m}$ )	Volumen medio ( $\mu\text{m}^3$ )	$\mu\text{g}$ proteína/ind	Rango de proteínas $\mu\text{g}/\text{ind}$
<i>Filinia terminalis</i>	102.43	171911	0.13	0.05-0.21
<i>Keratella tropica</i>	103.32	257070	0.18	0.1-0.27
<i>Brachionus calyciflorus</i>	150.35	468436	0.34	0.13-0.54
<i>Asplanchna brightwelli</i>	491.41	17251766	1.4	0.26-2.55

También se calculó el volumen de las tres especies de cladóceros, por medio de las fórmulas descritas en el capítulo I (página 392). Se encontró una buena relación entre el tamaño y el volumen para cada una de ellas (Tabla 35). Estas regresiones, son de gran interés ya que con tan solo medir la longitud del cuerpo, es posible conocer el volumen del individuo, y éste es un dato que puede ser de gran ayuda en ciertos estudios. A pesar de esto, es necesario comentar que estas ecuaciones pueden no ser fiables cuando se utilizan con poblaciones de otros lugares, debido a la posible existencia de variaciones locales.

TABLA 35.- Regresiones potenciales entre el tamaño y el volumen para tres especies de cladóceros.

<u>Especie</u>	<u>Intercepcion (A)</u>	<u>Pendiente (B)</u>	<u>r<sup>2</sup></u>	<u>n</u>
Ceriodaphnia reticulata	0.01686	3.3306	0.99	15
Daphnia longispina	0.06989	3.0692	0.99	14
Daphnia magna	0.46386	2.8253	0.99	10

El siguiente paso fue calcular el contenido en proteínas de cada una de las especies. En los rotíferos, debido a su pequeño tamaño, no fue posible hallar una relación entre tamaño individual y contenido en proteínas. Lo que se obtuvo fue el valor medio en proteínas de la población. Por lo tanto, para poder comparar los rotíferos con los cladóceros, era necesario, en el caso de estos últimos, dar también un valor medio para la población. Para obtener este valor medio, lo que se hizo fue calcular el tamaño medio de cada especie. Este se calculó en función del tamaño máximo y mínimo encontrado para cada una de ellas (Tabla 36). Conociendo el tamaño medio y la concentración de alimento (15.95  $\mu\text{g}$  proteína total/ml), fue posible calcular el contenido en proteínas, mediante las ecuaciones 2,3 y 4 expresadas en el primer capítulo. El rango de proteínas se calculó también con las ecuaciones anteriores, usando los tamaños máximos y mínimos de cada especie (Tabla 36).

TABLA 36.- Mínimo y máximo valor del contenido de proteínas, y la media de este rango, para diferentes especies de cladóceros, a la concentración de 15.95  $\mu\text{g}$  de proteínas totales/ml.

Espece	Tamaño medio ( $\mu\text{m}$ )	Volumen medio ( $\mu\text{m}^3$ )	$\mu\text{g}$ proteína/ind	Rango de proteínas $\mu\text{g}/\text{ind}$
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	750	63528744	9.12	1.69-21.66
<i>Daphnia longispina</i>	1650	524590604	29.63	5.78-65.6
<i>Daphnia magna</i>	2350	1551648771	42.7	5.98-101.2

Al comparar las 6 especies, se encontró una relación entre el volumen del cuerpo (V) y el contenido medio en proteína (P) (Figura 24), que venía dada por la ecuación:

$$(14) P = 6.205 \cdot 10^{-5} \cdot V^{0.647}$$

( $r^2 = 0.99$ ,  $p < 0.001$ )

Si en la relación anterior se incluye a *Asplanchna brigtwelli* (que también apareció con las otras tres especies de rotíferos en la laguna) ésta especie no se ajusta a la ecuación tan bien como las otras (Figura 25). Esto puede deberse a que *Asplanchna brigtwelli* no es una especie filtradora, sino carnívora y, por lo tanto, la cantidad de alimento de que disponía en ese momento en la laguna podía ser diferente a la que disponían las otras especies de rotíferos.

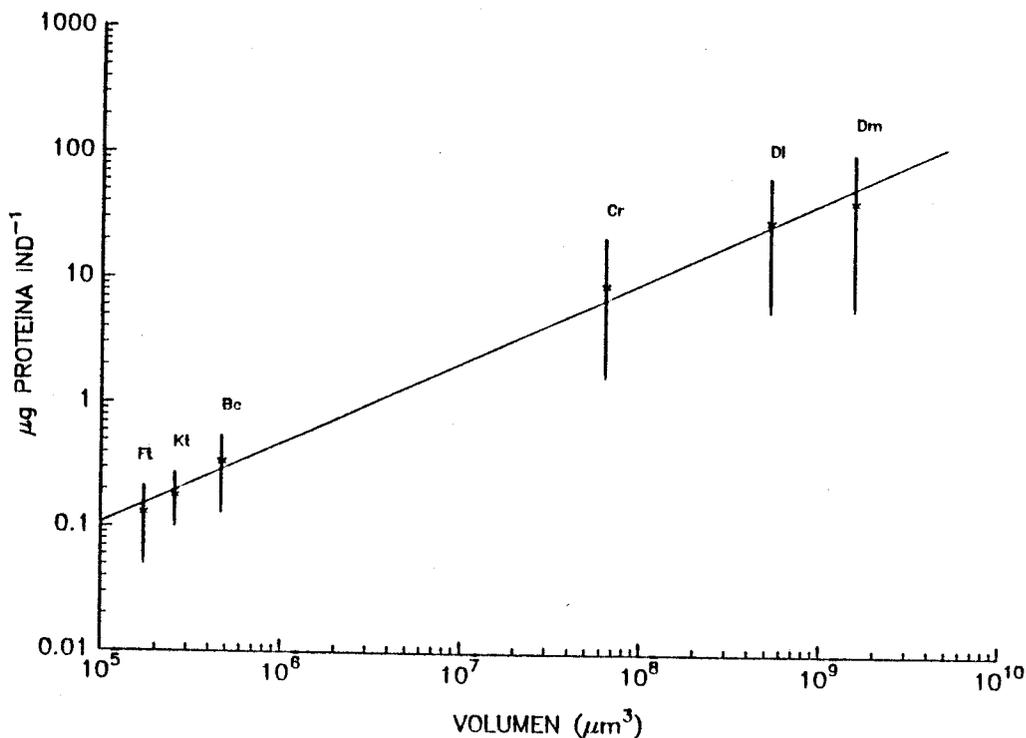


FIGURA 24. Relación entre el volumen (V) y el valor medio del rango de proteínas (P) para varias especies del zooplancton, a la misma concentración de alimento (15.95 µg proteína total/ml). Las líneas verticales representan el rango de proteínas entre el mínimo y el máximo valor del contenido en proteínas para cada especie. La ecuación indicada es  $P = 6.205 \cdot 10^{-5} \cdot V^{0.647}$ . Dm= Daphnia magna; Dl= Daphnia longispina; Cr= Ceriodaphnia reticulata; Bc= Brachionus calyciflorus; Kt= Keratella tropica y Ft= Filinia terminalis.

Logicamente, cuando el tamaño medio del cuerpo (T), excluyendo las espinas, era considerado en vez del volumen, se obtenía también una buena relación:

$$(15) P = 3.01 \cdot 10^{-5} \cdot T^{1.856}$$

( $r^2 = 0.99$ ,  $p < 0.001$ )

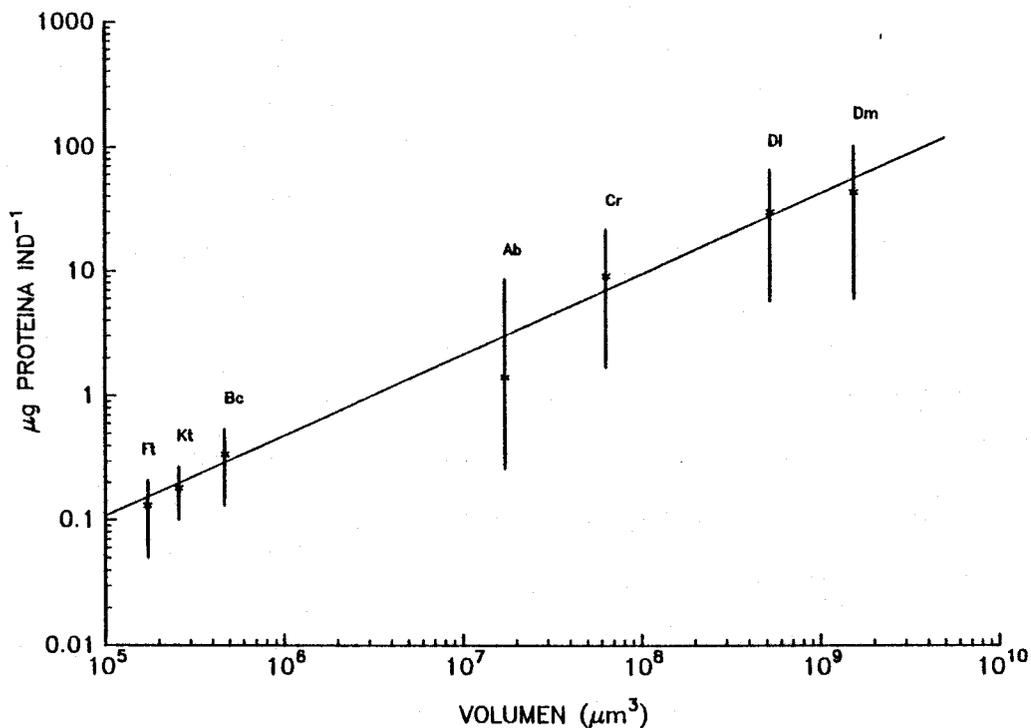


FIGURA 25. Relación entre el volumen (V) y el valor medio del rango de proteínas (P) para las mismas especies mencionadas en la Figura 24, con la inclusión de *Asplanchna brightwelli*. La ecuación indicada es la misma que la representada en la Figura 24, ya que no se incluyó para el cálculo a *Asplanchna brightwelli*

Aparte del interés que tienen los resultados, al encontrarse tal regularidad entre especies de tan diferente tamaño, la ecuación en la que se relaciona el tamaño con el contenido en proteínas de las especies puede ser usada para calcular la cantidad de proteínas de una población.

TABLA 37.- Valores obtenidos para *Daphnia magna* de la proteína total de la población (PTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los PTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). PTP observados (o), PTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	PTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	PTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Taraje	28- 2-88	54.16	2612	13	931	866
	4-12-88	22.54	1034	39	556	715
Dulce	4-12-88	16.33	864	21	286	179
	20-12-88	13.45	1510	50	1030	1204
	16- 1-89	12.68	1543	14	349	351
	6- 2-89	8.07	1357	59	834	1165
	13- 2-89	11.9	1152	12	161	174
	20- 2-89	11.97	1614	17	336	463
	27- 2-89	8.55	1044	104	1194	1262
	9- 3-89	9.32	1290	35	658	629
	17- 3-89	12.4	1353	44	971	864
Santa Olalla	28- 2-88	31.4	2324	8	470	429
	4-12-88	19.34	908	26	338	243
	20-12-88	15.98	1365	21	430	419
	16- 1-89	15.91	2000	7	223	284
	6- 2-89	11.98	1267	31	371	539
	13- 2-89	17.88	1468	42	631	960
	20- 2-89	16.26	1613	92	2060	2505
	27- 2-89	10.92	1335	172	3176	3296
	9- 3-89	13.45	1397	92	2049	1918
17- 3-89	15.42	1754	14	400	445	

TABLA 38.- Valores obtenidos para *Daphnia longispina* de la proteína total de la población (PTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los PTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). PTP observados (o), PTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	PTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	PTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Dulce	6- 2-89	8.07	1212	99	1526	1585
	13- 2-89	11.9	1231	29	567	478
	20- 2-89	11.97	1016	34	439	392
	27- 2-89	8.55	1038	130	1144	1561
	9- 3-89	9.32	1216	16	196	257
Santa Olalla	28- 2-88	31.4	1550	29	1948	733

TABLA 39.- Valores obtenidos para *Ceriodaphnia reticulata* de la proteína total de la población (PTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los PTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). PTP observados (o), PTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	PTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	PTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Ojillo	29- 2-88	49	630	68	1142	323
Toro	29 -2-88	42.9	580	671	7279	2735
Dulce	2- 3-88	30.47	769	2	28	14
	20- 2-89	11.97	604	2	12	9
	27- 2-89	8.55	580	12	37	49
	9- 3-89	9.32	571	7	31	27
	17- 3-89	12.4	496	7	30	21

En los estudios en el medio natural con los cladóceros, se calculó el PTP (proteínas totales de la población) para las tres especies en varias lagunas. Utilizando el tamaño medio de la población para cada especie, calculado para cada laguna, se ha podido obtener la cantidad de proteínas que le correspondería a un individuo de ese tamaño (usando la ecuación 15) y luego se ha multiplicado por el número de individuos por litro presentes de cada especie en cada una de las lagunas. Así se ha predicho un PTP para cada especie en cada una de las lagunas. En la Tabla 37 se expone los PTP predichos para *Daphnia magna*, en la Tabla 38 los de *Daphnia longispina* y en la Tabla 39 los de *Ceriodaphnia reticulata*. En los tres casos se observa que, por lo general, no existen diferencias importantes entre los resultados observados y los predichos (test-t,  $p < 0.001$ ). Los días en los que las diferencias son mayores, son aquellos en los que la concentración de alimento era mayor y el número de individuos era alto y, por eso, el contenido en proteínas es mayor del esperado, ya que la regresión está calculada para una concentración de proteínas totales de  $15.95 \mu\text{g/ml}$ . Un ejemplo de lo anterior se puede ver para *Daphnia longispina* el día 28-2-88 y para *Ceriodaphnia reticulata* los días 29-2-88 en Ojillo y Toro. A pesar de esto, en la Figura 26 se ve, a modo de ejemplo, que en el caso de *Daphnia magna*, las diferencias entre observados y predichos no son tan importantes. Una representación semejante se ha obtenido para *Daphnia longispina* y *Ceriodaphnia reticulata*

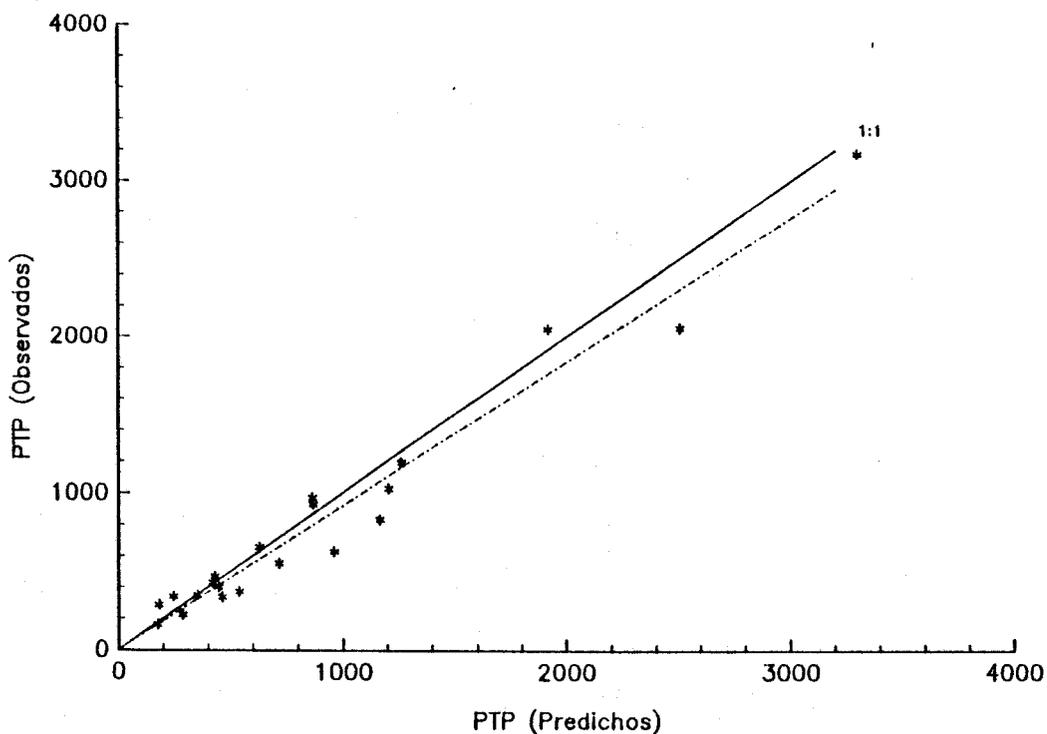


FIGURA 26. Comparación de los datos de proteínas totales de la población (PTP) en  $\mu\text{g/mL}$  para *Daphnia magna* obtenidos en diversas lagunas, con el PTP predicho obtenido de multiplicar el valor resultante de la ecuación 15, por el número de individuos por litro existente de esta especie en cada laguna.

Es importante destacar, que en los PTP observados, van incluidos también los animales grávidos, por lo tanto el PTP predicho nos da una información de toda la población. Esta relación podría ser una buena herramienta de trabajo ya que, aunque no se está estimando la biomasa total, si da una idea de la cantidad de proteínas que determinadas poblaciones aportan en un determinado eslabón trófico.

## II. CARBOHIDRATOS

El primer hecho a destacar, es la diferente importancia que tienen los carbohidratos en los rotíferos y en los cladóceros. En los rotíferos es la principal fuente de reserva que utilizan mientras que en los cladóceros aunque también es utilizada como reserva tiene un carácter más secundario frente a los lípidos. Este hecho puede ser de gran importancia, ya que el coste metabólico de la síntesis de carbohidratos puede ser muy distinto del de la síntesis de lípidos. A su vez, el rendimiento de uno u otro también puede ser diferente. Estas posibles diferencias podrían tener una gran importancia ecológica a la hora de comparar ambos grupos.

Para los carbohidratos, también se intentó ver si existía una ecuación que relacionara a todas las especies. Del estudio de los rotíferos en el medio natural, en una laguna se obtuvieron datos del contenido medio en carbohidratos de dos especies: *Filinia terminalis* y *Brachionus calyciflorus* (Tabla 31). La cantidad de proteínas totales existentes en esta laguna era de 22.23  $\mu\text{g/ml}$  y esta concentración de alimento fue la que se empleó para el cálculo del contenido en carbohidratos en las tres especies de cladóceros. Las ecuaciones usadas son las que calculan el contenido en carbohidrato por individuo en función del tamaño y la cantidad de proteínas totales. La ecuación para *Daphnia magna* está indicada en la Tabla 10, para *Daphnia longispina* en la Tabla 11, y en la Tabla 12 para *Ceriodaphnia reticulata*. Los tamaños usados para cada una de las especies,

son los mismos que se utilizaron en el apartado anterior (Tablas 34 y 36).

TABLA 40.- Mínimo y máximo valor del contenido en carbohidratos, y la media de este rango, para las diferentes especies de cladóceros y rotíferos, a la concentración de 22.23  $\mu\text{g}$  de proteínas totales/ml.

Espece	$\mu\text{g}$ carbohidrato/ind	Rango de carbohidratos $\mu\text{g}/\text{ind}$
<i>Filinia terminalis</i>	0.011	0.002-0.02
<i>Brachionus calyciflorus</i>	0.04	0.018-0.062
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	0.57	0.15 -1.58
<i>Daphnia longispina</i>	1.22	0.31 -2.75
<i>Daphnia magna</i>	4.61	1.23 -17.28

El contenido medio de carbohidratos de las distintas especies (Tabla 40), también estaba relacionado con el volumen (V) de estas (Figura 27), como ocurría en el caso de las proteínas:

$$(16) C = 1.1 \cdot 10^{-5} \cdot V^{0.6}$$

$$(r^2 = 0.98, p < 0.001)$$

Logicamente el tamaño medio del cuerpo (T) también estaba relacionado con el contenido medio en carbohidratos de cada una de ellas:

$$(17) C = 4.44 \cdot 10^{-6} \cdot T^{1.751}$$

$$(r^2 = 0.98, p < 0.001)$$

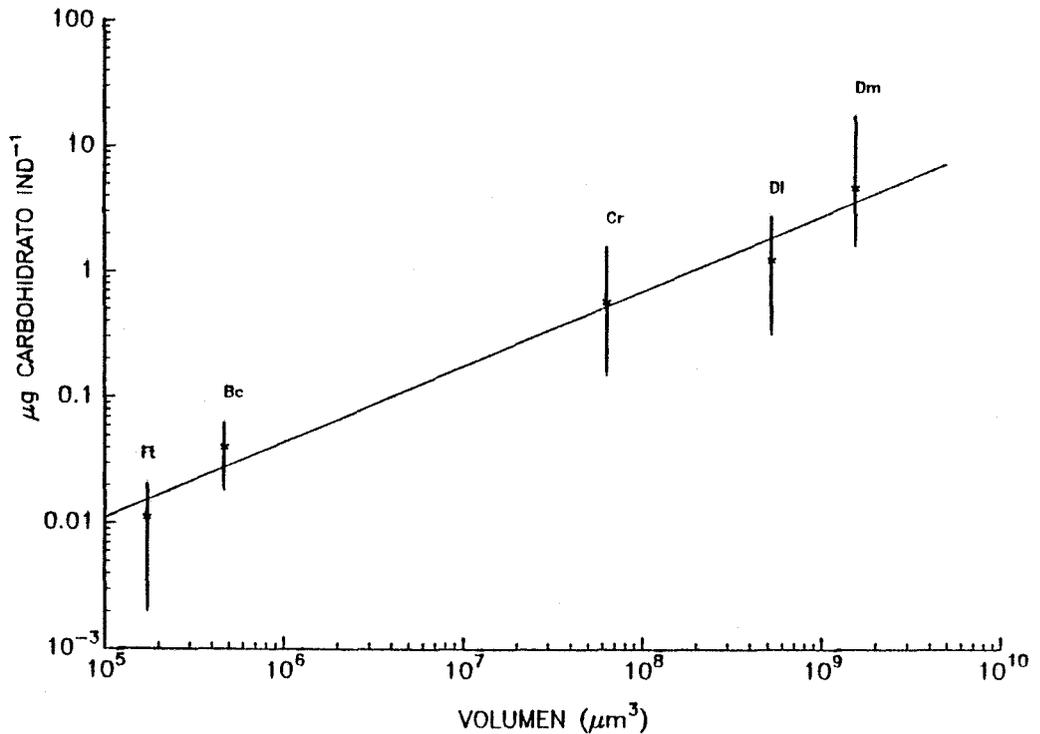


FIGURA 27. Relación entre el volumen (V) y el valor medio del rango de carbohidratos (C) para varias especies del zooplancton, a la misma concentración de alimento (15.95 µg proteína total/ml). Las líneas verticales representan el rango de carbohidratos entre el mínimo y el máximo valor del contenido en carbohidrato para cada especie. La ecuación indicada es  $C = 1.1 \cdot 10^{-5} \cdot V^{0.6}$ . Dm= *Daphnia magna*; Dl= *Daphnia longispina*; Cr= *Ceriodaphnia reticulata*; Bc= *Brachionus calyciflorus* y Ft= *Filinia terminalis*.

Esta ecuación fue usada para calcular el carbohidrato total de una población (CTP) para las tres especies de cladóceros, y se comparó con los CTP obtenidos en cada laguna (Tablas 41, 42 y 43).

TABLA 41.- Valores obtenidos para *Daphnia magna* del carbohidrato total de la población (CTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los CTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). CTP observados (o), CTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	CTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	CTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Taraje	28- 2-88	54.16	2612	13	66.9	56.0
	4-12-88	22.54	1034	39	21.6	49.5
Dulce	4-12-88	16.33	864	21	11.2	12.9
	20-12-88	13.45	1510	50	188.6	82.2
	16- 1-89	12.68	1543	14	25	23.9
	6- 2-89	8.07	1357	59	36.2	80.4
	13- 2-89	11.9	1152	12	9	12.2
	20- 2-89	11.97	1614	17	54.9	31.4
	27- 2-89	8.55	1044	104	23.4	89.5
	9- 3-89	9.32	1290	35	22.8	43.6
	17- 3-89	12.4	1353	44	29.1	59.6
	Santa Olalla	28- 2-88	31.4	2324	8	13.7
4-12-88		19.34	908	26	14.6	17.5
20-12-88		15.98	1365	21	67.2	28.9
16- 1-89		15.91	2000	7	22.5	18.8
6- 2-89		11.98	1267	31	36.9	37.4
13- 2-89		17.88	1468	42	43.8	65.7
20- 2-89		16.26	1613	92	200.7	169.7
27- 2-89		10.92	1335	172	200.9	227.8
9- 3-89		13.45	1397	92	157.7	131.9
17- 3-89		15.42	1754	14	30.8	29.9

TABLA 42.- Valores obtenidos para *Daphnia longispina* del carbohidrato total de la población (CTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los CTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). CTP observados (o), CTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	CTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	CTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Dulce	6- 2-89	8.07	1212	99	58.1	110.7
	13- 2-89	11.9	1231	29	27.0	33.3
	20- 2-89	11.97	1016	34	13.4	27.9
	27- 2-89	8.55	1038	130	22.5	110.8
	9- 3-89	9.32	1216	16	3.5	18.0
Santa Olalla	28- 2-88	31.4	1550	29	44.1	50.1

TABLA 43.- Valores obtenidos para *Ceriodaphnia reticulata* del carbohidrato total de la población (CTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los CTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). CTP observados (o), CTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	CTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	CTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Ojillo	29- 2-88	49	630	68	36.2	24.3
Toro	29 -2-88	42.9	580	671	249.8	207.4
Dulce	2- 3-88	30.47	769	2	0.9	0.5
	20- 2-89	11.97	604	2	0.8	0.8
	27- 2-89	8.55	580	12	3.6	3.6
	9- 3-89	9.32	571	7	3.2	2.2
	17- 3-89	12.4	496	7	3.3	1.7

Se utilizó la ecuación en la que la variable era el tamaño (ecuación 17), al igual que en el caso de las proteínas, ya que no existen diferencias importantes en lo que se refiere a la predicción con respecto a usar la ecuación en la que la variable independiente es el volumen (ecuación 16), y es más cómodo trabajar con los tamaños de las especies que con los volúmenes.

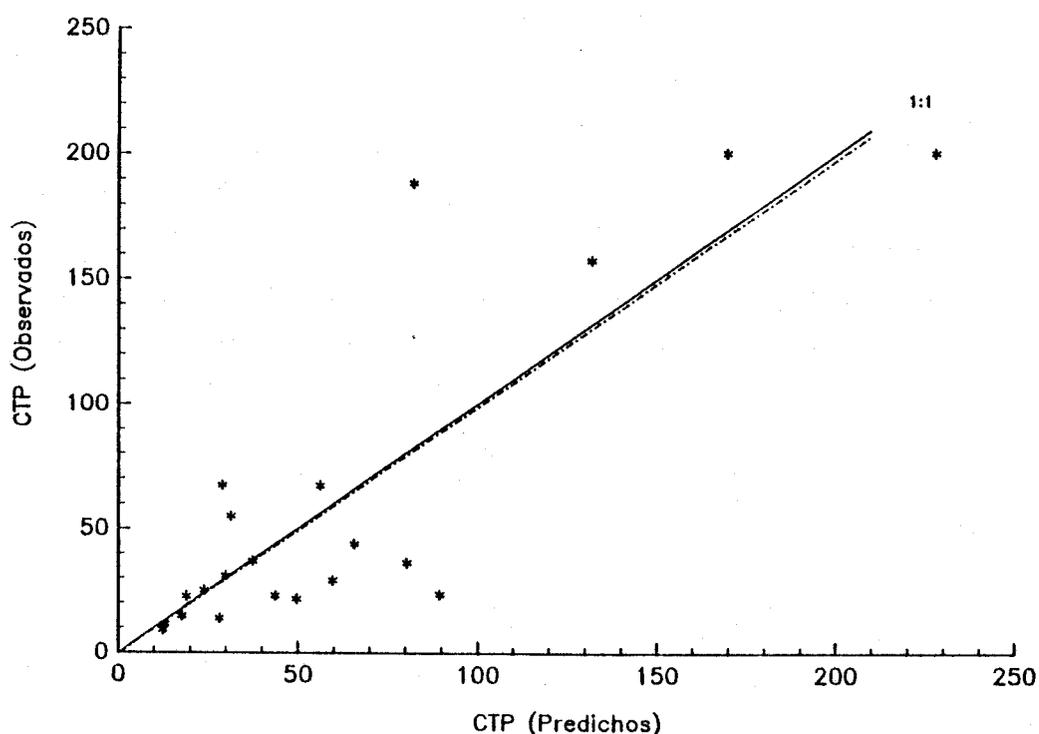


FIGURA 28. Comparación de los datos de carbohidratos totales de la población (CTP) en  $\mu\text{g/mL}$  para *Daphnia magna* obtenidos en diversas lagunas, con el CTP predicho obtenido de multiplicar el valor resultante de la ecuación 17, por el número de individuos por litro existente de esta especie en cada laguna.

En el caso de *Daphnia magna* (Tabla 41, Figura 28), no había diferencias significativas entre los CTP observados y los predichos (test-t,  $p < 0.001$ ). Ahora bien, a pesar de ésto, es necesario puntualizar que en algunos días determinados existen diferencias importantes. Por ejemplo el día 20-12-88, tanto en la Dulce como en Santa Olalla, la cantidad real es mucho mayor que la predicha. Esto se debe a que, en el caso de los carbohidratos no solo está influyendo el alimento, como ocurría con las proteínas sino que, al ser usados como sustancias de reserva, están influenciados también por la dinámica reproductiva de la especie. En las Figuras 12 y 13, se vió como el 20-12-88, el contenido en carbohidratos de los individuos adultos fue el mayor de todo el periodo muestreado. Es decir, en esa época los individuos de *Daphnia magna* en ambas lagunas, estaban acumulando sustancias de reserva, con el fin de aumentar la población. Por lo tanto, a pesar de la buena predicción de la ecuación, esta falla si la población está en fase de expansión.

Para *Daphnia longispina* las diferencias encontradas entre observados y predichos son mayores (Tabla 42,  $p < 0.005$ ), siendo un poco mejor la predicción en el caso de *Ceriodaphnia reticulata* (Tabla 43,  $p < 0.001$ ).

En resumen, cada una de las especies, al igual que ocurría en el caso de las proteínas, presentan un determinado contenido en carbohidrato que está en función de su tamaño. Ahora bien, esta cantidad de carbohidrato puede oscilar mucho debido a que

este componente es usado como sustancia de reserva. Por lo tanto, para poder predecir el contenido en carbohidratos de los animales es necesario utilizar más parámetros, como el número de huevos o embriones por hembra, o la densidad de la población, como ya se vió en el capítulo de cladóceros.

### III. LIPIDOS

Como ya se ha visto a lo largo del trabajo, los lípidos son la principal sustancia de reserva en los cladóceros, mientras que en los rotíferos, aunque posiblemente también puedan ser usados como sustancia de reserva, no tienen tanta importancia como los carbohidratos.

También se intentó ver si existía una relación entre el contenido en lípidos de las distintas especies. En este caso, solo se contaba con datos de una especie de rotífero, *Brachionus calyciflorus*, a una concentración de proteínas totales de 22.23  $\mu\text{g/ml}$ . Para calcular la cantidad de lípidos de cada una de las especies de cladóceros a la concentración de alimento anterior, también se usó la ecuación en la que las variables independientes eran el tamaño y el contenido en proteínas totales en el medio. Para *Daphnia magna*, la ecuación está indicada en la Tabla 13, en la Tabla 14 para *Daphnia longispina* y en la Tabla 15 para *Ceriodaphnia reticulata*. Los tamaños usados son los mismos que los que se utilizaron en el caso de las proteínas y los carbohidratos.

De nuevo se encontró una relación entre el contenido medio en lípidos (L) de las especies (Tabla 44) y el volumen (V) de estas (Figura 29):

$$(18) L = 1.14 \cdot 10^{-7} \cdot V^{0.8401}$$

$$(r^2 = 0.99, p < 0.001)$$

TABLA 44.- Mínimo y máximo valor del contenido de lípidos, y la media de este rango, para las diferentes especies de cladóceros y rotíferos, a la concentración de 22.23  $\mu\text{g}$  de proteínas totales/ml.

Especie	$\mu\text{g}$ lípido/ind	Rango de lípidos $\mu\text{g}/\text{ind}$
<i>Brachionus calyciflorus</i>	0.006	0.003-0.009
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	0.57	0.006-1.47
<i>Daphnia longispina</i>	1.96	1.16 -3.31
<i>Daphnia magna</i>	5.92	1.13 -30.8

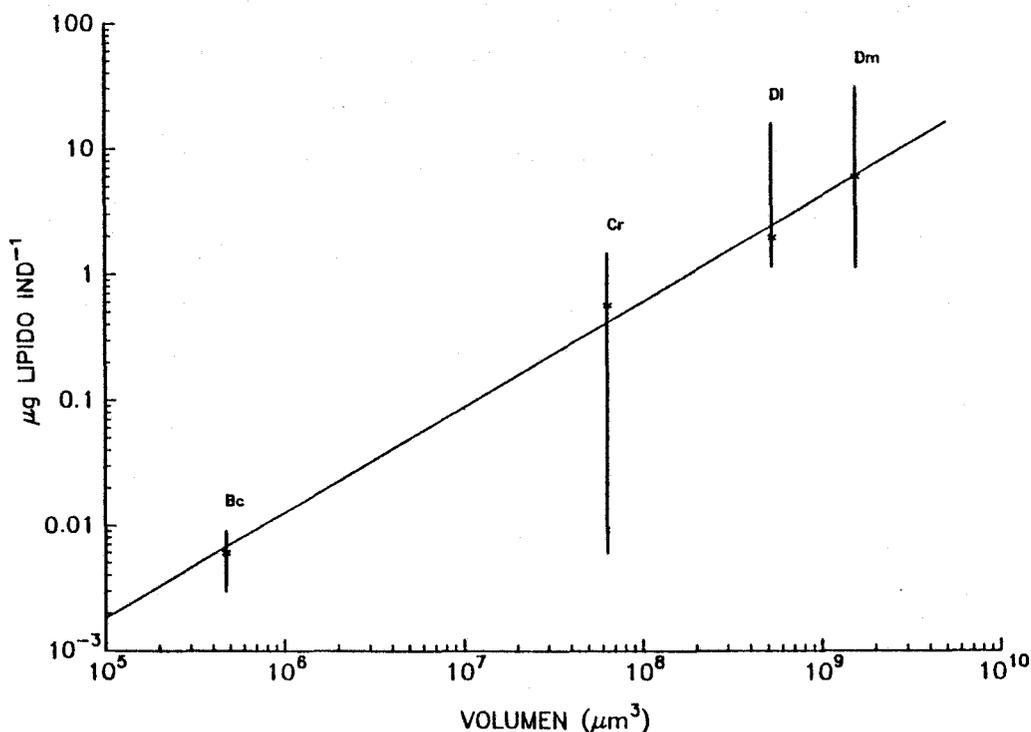


FIGURA 29. Relación entre el volumen (V) y el valor medio del rango de lípidos (L) para varias especies del zooplancton, a la misma concentración de alimento (15.95  $\mu\text{g}$  proteína total/mL). Las líneas verticales representan el rango de lípidos entre el mínimo y el máximo valor del contenido en lípidos para cada especie. La ecuación indicada es  $L = 1.14 \cdot 10^{-7} \cdot V^{0.8401}$ . Dm- *Daphnia magna*; Dl- *Daphnia longispina*; Cr- *Ceriodaphnia reticulata* y Bc- *Brachionus calyciflorus*.

La ecuación que se obtenía usando el tamaño (T) en vez del volumen era:

$$(19) L = 3 \cdot 10^{-8} \cdot T^{2.463}$$

( $r^2 = 0.99$ ,  $p < 0.001$ )

Está ecuación anterior (19), se usó para calcular el LTP de las distintas especies. Para *Daphnia magna* (Tabla 45), de nuevo no se observaron diferencias significativas entre los valores observados y los predichos ( $p < 0.001$ ), ajustandose éstos a una relación 1:1 (Figura 30). Ahora bien, como los lípidos tienen una mayor importancia como sustancia de reserva en los cladóceros, las oscilaciones, que ya se observaron con los carbohidratos, son mucho más marcadas en el caso de los lípidos (Tabla 45). El 20-12-88, en ambas lagunas el valor observado era mucho mayor que el predicho, al igual que sucedía con los carbohidratos. A su vez también puede suceder lo contrario, hay días, como por ejemplo el 17-3-89 en ambas lagunas, en que, en función de la densidad de la población, el LTP predicho sale alto, pero como los individuos tienen menos lípidos de lo normal, el valor observado es menor. El que el valor observado sea mucho mayor que el predicho, es fácilmente explicable porque los animales acumulan sustancias de reserva para aumentar la población; ahora bien, el caso contrario es más difícil de interpretar.

TABLA 45.- Valores obtenidos para *Daphnia magna* del lípido total de la población (LTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los LTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). LTP observados (o), LTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	LTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	LTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Taraje	28- 2-88	54.16	2612	13	64.2	101.6
	4-12-88	22.54	1034	39	62.1	55.1
Dulce	4-12-88	16.33	864	21	37.6	10.7
	20-12-88	13.45	1510	50	621	101.4
	16- 1-89	12.68	1543	14	53.7	29.9
	6- 2-89	8.07	1357	59	127.8	91.9
	13- 2-89	11.9	1152	12	14.0	12.5
	20- 2-89	11.97	1614	17	50	40.6
	27- 2-89	8.55	1044	104	121	84.9
	9- 3-89	9.32	1290	35	36.6	48.1
	17- 3-89	12.4	1353	44	45.6	68.0
	Santa Olalla	28- 2-88	31.4	2324	8	36.1
4-12-88		19.34	908	26	12.0	15.0
20-12-88		15.98	1365	21	184.3	33.2
16- 1-89		15.91	2000	7	38.9	28.3
6- 2-89		11.98	1267	31	81.4	40.8
13- 2-89		17.88	1468	42	84.4	79.4
20- 2-89		16.26	1613	92	215.6	219.4
27- 2-89		10.92	1335	172	246.8	257.4
9- 3-89		13.45	1397	92	240.4	154.0
17- 3-89		15.42	1754	14	19.5	41.0

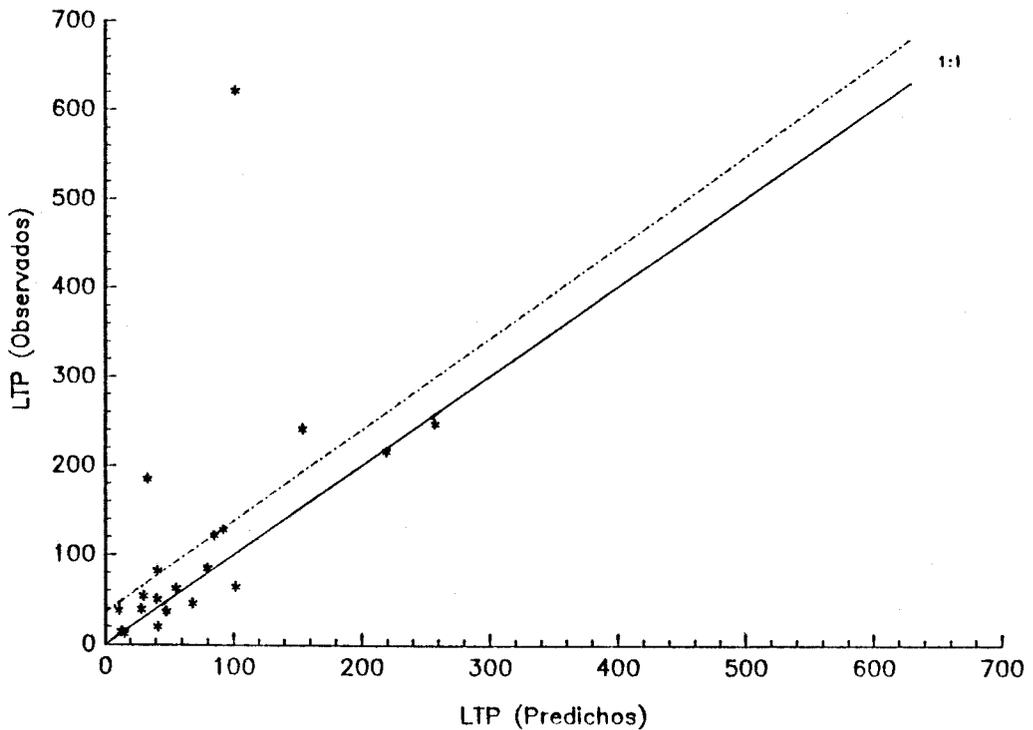


FIGURA 30. Comparación de los datos de lípidos totales de la población (LTP) en  $\mu\text{g/mL}$  para *Daphnia magna* obtenidos en diversas lagunas, con el LTP predicho obtenido de multiplicar el valor resultante de la ecuación 19, por el número de individuos por litro existente de esta especie en cada laguna.

Una posible explicación tal vez sea que, después del stress reproductivo, el contenido en lípidos de los animales baja mucho debido a la fuerte inversión en reproducción. En apoyo de esto está el hecho de que los valores predichos, en las tres especies, han sido mas altos que los observados después de un período en que la población estaba en crecimiento. Esto puede verse claramente en el caso de *Daphnia magna* en ambas lagunas (Figuras 12, y 13). Un aumento en las sustancias de reserva

(Febrero de 1989), dió lugar a un aumento de la población, y al final de este período el contenido en lípidos de los animales era mas bajo de lo normal (Tabla 45). Esto también se puede entrever para *Daphnia longispina* (Figura 14) donde, tras el aumento de los lípidos y los carbohidratos (Febrero), la población se vió incrementada y a finales de Febrero (27-2), cuando terminó este periodo, el contenido en lípidos de los animales bajó mucho (Tabla 46). Para *Ceriodaphnia reticulata* (Figura 15), posiblemente durante Febrero también el contenido en carbohidratos y lípidos fue alto, teniendo como consecuencia un aumento de la población y entrando los animales en la siguiente fase, en que hay menor cantidad de lípidos (Tabla 47, 27-2-89).

Los resultados obtenidos para el LTP con *Daphnia longispina* (Tabla 46) y *Ceriodaphnia reticulata* (Tabla 47), son semejantes a los de *Daphnia magna*. Los valores predichos y observados son significativamente parecidos ( $p < 0.001$ ), pero también se dan fuertes oscilaciones.

Por ejemplo, para *Daphnia longispina* el 6-2-89 el valor observado era mucho mayor que el predicho, sucediendo todo lo contrario el 27-2-89.

TABLA 46.- Valores obtenidos para *Daphnia longispina* del lípido total de la población (LTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los LTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). LTP observados (o), LTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	LTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	LTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Dulce	6- 2-89	8.07	1212	99	188.4	116.8
	13- 2-89	11.9	1231	29	42.4	35.5
	20- 2-89	11.97	1016	34	30.8	25.9
	27- 2-89	8.55	1038	130	27.6	104.7
	9- 3-89	9.32	1216	16	6.3	19.0
Santa Olalla	28- 2-88	31.4	1550	29	10.1	62.7

TABLA 47.- Valores obtenidos para *Ceriodaphnia reticulata* del lípido total de la población (LTP), en varias lagunas y en distintas épocas del año, así como los LTP predichos para cada una de esas lagunas en función del tamaño medio de la población ( $\mu\text{m}$ ). LTP observados (o), LTP predichos (p).

Laguna	Fecha	$\mu\text{g}$ de proteína total/ml	Tamaño medio	Número de individuos/l	LTP(o) $\mu\text{g}/\text{l}$	LTP(p) $\mu\text{g}/\text{l}$
Ojillo	29- 2-88	49	630	68	86.4	16.0
Toro	29 -2-88	42.9	580	671	207.2	128.9
Dulce	2- 3-88	30.47	769	2	0.7	0.7
	20- 2-89	11.97	604	2	2.2	0.5
	27- 2-89	8.55	580	12	1.8	2.3
	9- 3-89	9.32	571	7	1.8	1.3
	17- 3-89	12.4	496	7	1.0	0.9

#### IV. ESTUDIO CONJUNTO DE PROTEINA, CARBOHIDRATO Y LIPIDO

Para poder tener una visión global de la evolución de las proteínas, carbohidratos y lípidos en los rotíferos y cladóceros, lo que se hizo fué calcular la cantidad de cada uno de estos componentes que correspondía a diversos tamaños (Tabla 48).

TABLA 48.- Cantidad de proteínas, carbohidratos (Ch) y lípidos correspondientes a diversos tamaños, que incluye todo el rango de los rotíferos a los cladóceros, obtenidos desarrollando las ecuaciones 15, 17 y 19.

Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	$\mu\text{g}$ proteína/ind	$\mu\text{g}$ Ch/ind	$\mu\text{g}$ lípido/ind
100	0.156	0.014	0.002
200	0.564	0.045	0.014
500	3.09	0.205	0.13
1000	11.2	0.641	0.73
2000	40.6	2	4.65
3000	86.2	3.9	11
3500	114.8	5.02	16.07

Para ello se usaron las ecuaciones 15, 17 y 19, expresadas anteriormente. En la Figura 31 se representan los datos anteriores, pero expresados en porcentajes. Lo primero que destaca es que se ve claramente como en los rotíferos la sustancia de reserva mas importante es el carbohidrato. Por el contrario, cuando llegamos a los rangos de tamaño que corresponden a los cladóceros ( $> 300 \mu\text{m}$ ), la importancia de los

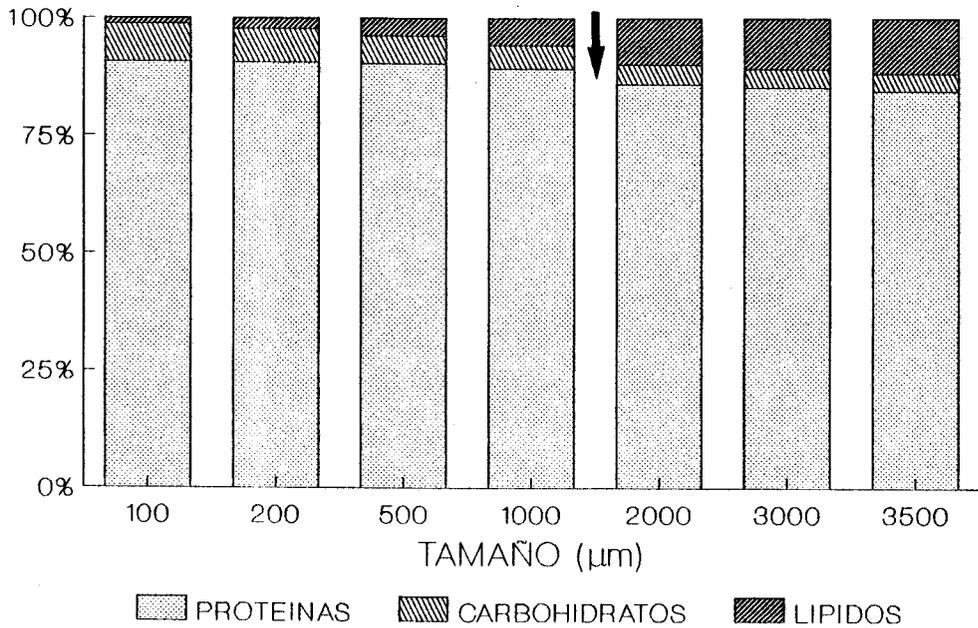


FIGURA 31. Proporción de proteínas, carbohidratos y lípidos para diversos tamaños, obtenidos a partir de los resultados expuestos en la Tabla 48.

carbohidratos disminuye, siendo ahora la principal sustancia de reserva el conjunto lipídico.

En segundo lugar, con estos datos podríamos intentar responder a una pregunta de gran interés, ¿quien invierte mas en reproducción, las especies mas grandes o las mas pequeñas?. Al observar la Figura 31, en principio lo que se deduce es que a medida que la especie es mayor, presente mas cantidad de sustancias de reserva. Esto puede ser falso, como se verá a reglón seguido. En la Figura 31 se ve que el porcentaje de

proteínas, varía muy poco entre las 100 y las 1000  $\mu\text{m}$ . Exactamente un 1.6%. Por el contrario, entre las 1000 a las 2000  $\mu\text{m}$ , se produce una pequeña bajada, señalada con una flecha, que es de un 3.17%. Luego, de nuevo, la disminución en el porcentaje de proteínas se realiza de forma gradual, disminuyendo un 1.45% entre las 2000 a las 3500  $\mu\text{m}$ . ¿A que se debe esa mayor disminución entre ese rango de tamaño? y, ¿que relación tiene esto con el hecho de saber qué especies acumulan mas sustancias de reserva?.

La respuesta a la primera pregunta podría ser la siguiente.

Esta súbita disminución en relación a la tendencia general, podría deberse a que todos los cálculos se han realizado para concentraciones de alimento en el medio que, oscilaban alrededor de los 20  $\mu\text{g/ml}$  de proteína. Esta concentración de alimento es óptima para las especies mas pequeñas, ya que se vió como *Brachionus calyciflorus* y *Keratella tropica* aumentaban muy poco su contenido en proteínas cuando el alimento era cercano a la concentración anterior (Figura 16 y 17). Por el contrario, las especies de mayor talla, necesitan mucho mas alimento para llegar a su máximo contenido en proteínas. Esto se ve muy claro, para *Daphnia magna* en las Figuras 5 y 7, en las que se observa como los individuos de mayor talla, conforme aumenta el alimento, continuan incrementando su contenido en proteínas. Lógicamente, esto significa, que las cantidades de alimento detectadas en los ecosistemas muestreados en este trabajo, no son los óptimos para las especies mayores, hecho que ya se ha

comentado a lo largo del trabajo.

Por lo tanto, las variaciones detectadas en el contenido proteínico de las especies, podrían ser debidas simplemente a este hecho, lo que estaría enturbiando los resultados, ya que no estamos comparando a las especies en las mismas condiciones. Para ver si esto era así, en vez de calcular el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos de las tres especies de cladóceros a las concentraciones de alimento anteriores (15.95 y 22.23  $\mu\text{g}$  de proteínas totales/ml), se calcularon de nuevo los valores pero utilizando una concentración de alimento que fuera óptima también para las especies mas grandes: 40  $\mu\text{g}$  de proteínas totales/ml. Como para los rotíferos las concentraciones de alimento, en que se obtuvieron los datos, eran cercanas a su óptimo alimenticio, servían los datos originales.

Los nuevos datos obtenidos están expresados en la Tabla 49. Con estos se obtuvieron nuevas regresiones entre el contenido en proteínas (P), carbohidratos (C) y lípidos (L) de las especies, con respecto al tamaño medio de estas (T):

$$(20) P = 1.623 \cdot 10^{-5} \cdot T^2 \quad (r^2 = 0.98, p < 0.001)$$

$$(21) C = 3.445 \cdot 10^{-6} \cdot T^{1.813} \quad (r^2 = 0.98, p < 0.001)$$

$$(22) L = 5.3 \cdot 10^{-8} \cdot T^{2.353} \quad (r^2 = 0.98, p < 0.001)$$

TABLA 49.- Cantidad de proteínas, carbohidratos (Ch) y lípidos correspondientes a las distintas especies. Los valores correspondientes a los cladóceros fueron calculados para una concentración de 40  $\mu\text{g}$  de proteínas totales/ml. Los valores de los rotíferos son los que se tenían de las concentraciones de proteínas totales de 15.95 y 22.23  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

<u>Especie</u>	<u><math>\mu\text{g}</math> proteína/ind</u>	<u><math>\mu\text{g}</math> Ch/ind</u>	<u><math>\mu\text{g}</math> lípido/ind</u>
<i>Filinia terminalis</i>	0.13	0.011	
<i>Keratella tropica</i>	0.18		
<i>Brachionus calyciflorus</i>	0.34	0.04	0.006
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	20.34	0.81	0.54
<i>Daphnia longispina</i>	44.6	1.55	1.37
<i>Daphnia magna</i>	53.6	4.94	4.7

TABLA 50.- Cantidad de proteínas, carbohidratos (Ch) y lípidos correspondientes a diversos tamaños, obtenidos desarrollando las ecuaciones 20, 21 y 22.

<u>Tamaño (<math>\mu\text{m}</math>)</u>	<u><math>\mu\text{g}</math> proteína/ind</u>	<u><math>\mu\text{g}</math> Ch/ind</u>	<u><math>\mu\text{g}</math> lípido/ind</u>
100	0.162	0.014	0.002
200	0.648	0.051	0.014
500	4.05	0.269	0.118
1000	16.19	0.946	0.618
2000	64.76	3.32	3.16
3000	145.7	6.94	8.20
3500	198.3	9.17	11.79

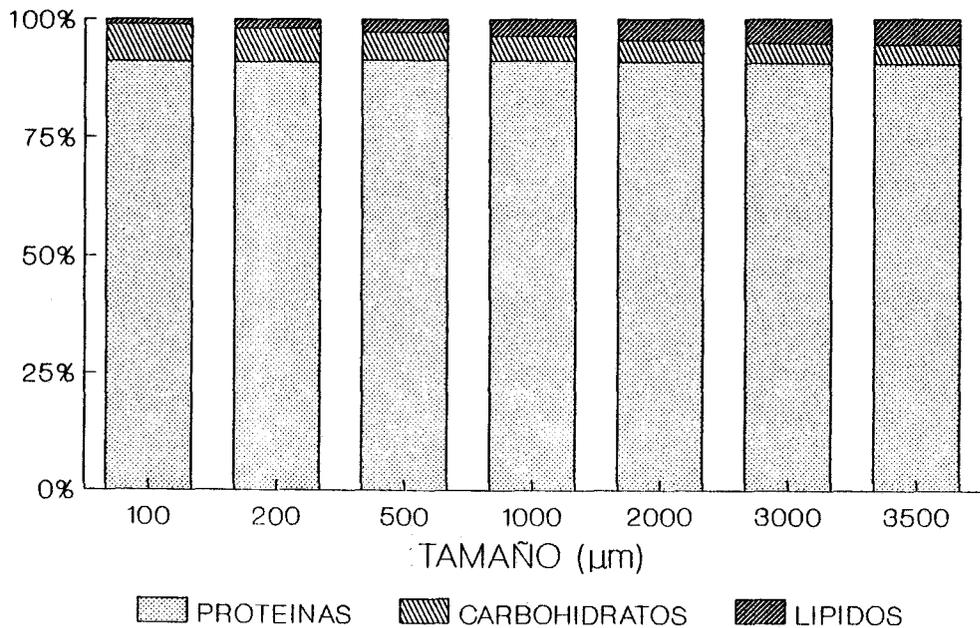


FIGURA 32. Proporción de proteínas, carbohidratos y lípidos para diversos tamaños, obtenidos a partir de los resultados expuestos en la Tabla 50.

Con estas nuevas regresiones, se calculó de nuevo el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos que le correspondían a diversos tamaños (Tabla 50). En la Figura 32, se representa los porcentajes de estos datos. Ahora se ve que la proporción de proteínas es prácticamente la misma para todo el espectro de tamaños, y que por consiguiente la inversión en sustancias de reserva, cuando la concentración de alimento es la óptima, es la misma independientemente del tamaño. Esto es lo mismo que han obtenido otros autores como por ejemplo Golden et al. (1987), que observaron que el contenido en lípidos para varias especies de cladóceros era proporcional al tamaño, y que

por lo tanto las especies mas pequeñas, acumulaban en proporción la misma cantidad de sustancias de reserva. Ahora bien, cuando el alimento escasea, la situación puede cambiar. Se ha observado que las especies mas grandes son capaces de mantener poblaciones, a concentraciones de alimento que las especies mas pequeñas no lo consiguen.

Es importante mencionar, que para poder hacer la comparación entre las especies, se ha tenido que poner a todas en condiciones óptimas de alimento. Esto no debe de llevar al error de concluir que las sustancias de reserva en, por ejemplo un individuo de 3500  $\mu\text{m}$  (Figura 31) son siempre un 10% del total. Como se ha visto a lo largo del trabajo, las sustancias de reseva pueden oscilar mucho.

En el experimento realizado con *Brachionus calicyflorus*, el contenido en carbohidratos llegó a ser cercano al 75% a un determinada concentración de alimento (Figura 22).

Otro ejemplo claro puede ser el de *Daphnia magna* en la laguna Dulce donde, el 20-12-88, las sustancias de reserva representaban mas del 60% de la biomasa (Figura 12), calculando ésta como la suma de proteínas, carbohidratos y lípidos.

Es decir, esta comparación se ha hecho en condiciones óptimas, pero no se puede saber lo que ocurre cuando el alimento escasea. En los experimentos en el laboratorio con *Brachionus calyciflorus*, se vió como la inversión en sustancias de reserva a altas y bajas concentraciones era muy similar (Figura 21). Es

decir, esa era la inversión mínima de la especie que, a bajas concentraciones de alimento se debía a que no podía invertir más y, a altas concentraciones parecía que era una estrategia para poder ahorrar energía produciendo más neonatos. El problema, es que no se tienen datos sobre el comportamiento de los cladóceros a bajas concentraciones de alimento, para poder comparar ambos grupos. Precisamente cuando escasea el alimento, es cuando las comparaciones son más interesantes ya que, aquellas especies que sean mas eficientes explotando medios con bajos recursos serán capaces de desplazar a las otras. De los estudios realizados hasta ahora, parece concluirse que los cladóceros siempre desplazan a los rotíferos cuando el alimento escasea (Gilbert, 1985) y esto, en parte, viene causado por el hecho de que los cladóceros toman las partículas mas eficientemente que los rotíferos (Gilbert, 1988). Por lo tanto, cuando el alimento es limitante, los rotíferos no pueden competir con los cladóceros. Otro factor que podría estar influyendo, es el mencionado por Goulden et al. (1987) y que ya se comentó anteriormente, y es el hecho de que los embriones de las especies más pequeñas, consumen mas sustancias de reserva en proporción a su tamaño, que las especies mayores, teniendo por lo tanto desventaja, cuando hay poco alimento. Sería también interesante poder comprobar sí, esta mayor eficiencia de los cladóceros, a bajas concentraciones de alimento, se traduce en que son capaces de invertir más en sustancias de reserva que los rotíferos y, debido a esto, son capaces de mantener la población cuando hay poco alimento.

Una vez hecho este comentario, se puede pasar a estudiar un tercer aspecto dentro de este apartado. En vista de las buenas relaciones encontradas entre las especies estudiadas se podría intentar buscar algunas ecuaciones, que nos permitieran calcular la biomasa de aquellas. En rotíferos, el volumen de los individuos, calculado según la forma geométrica de las especies, se ha usado con mucha frecuencia como indicador de la biomasa (Grönberg, 1973; Ruttner-Kolisko, 1977). Existen algunos trabajos en los que se han obtenido buenas ecuaciones entre el volumen y el peso de los individuos para varias especies (Morales-Baquero et al., 1988; Pauli, en prensa). Para las especies mayores, lo mas fácil y más real es medir el peso seco de los animales (Dumot et al., 1975; Rosen, 1981; Culver et al., 1985), aunque existe el problema de que los métodos de preservación usados normalmente, producen una disminución de la biomasa (Giguère, 1989). También existen trabajos en los que se ha utilizado el volumen como indicador de la biomasa (Lawrence et al., 1987). En todos los casos, al igual que ocurría con los rotíferos, también se han obtenido buenas ecuaciones para poder calcular la biomasa de los individuos. Lógicamente, este tipo de ecuaciones tienen un gran interés ya que son de gran ayuda para poder hacer estimas de producción secundaria.

El principal problema que tiene este tipo de trabajos, es que hay fuertes variaciones en la biomasa por individuo de una misma especie, dependiendo de donde se realice el estudio. Un ejemplo puede ser el de *Keratella cochlearis* (Morgan et al.,

1980), cuyo peso por individuo (en  $\mu\text{g}$ ) variaba entre 0.05 (Ekolu), 0.122 (Balata), 0.2 (Zelenetzkoje/Akulino) y 0.64 (Lagunas de Bélgica). En crustáceos las variaciones son todavía más acusadas. Por ejemplo, Yan y Mackie (1987) observaron que un individuo no grávido de *Holopedium gibberum* de 1 mm de tamaño, podía variar hasta un 86% su peso, dependiendo de en que lago se encontrará. Además de estas variaciones espaciales, también se dan variaciones temporales que, también, son mucho más acusadas en los crustáceos. Estas variaciones ya han sido resaltadas a lo largo de este trabajo, y en función de ello se hicieron tanto los muestreos en varias lagunas como en una misma laguna a lo largo del tiempo.

Estas fuertes oscilaciones, dan lugar a que las ecuaciones obtenidas por algunos autores tengan una marcada componente local, no pudiendo ser aplicadas en otros cuerpos de agua e incluso, en distintas épocas del año.

El alimento es el principal factor que da lugar a esa fuerte variación espacial de la biomasa ya que, se pueden dar cambios en el tamaño, la calidad, composición y sobre todo concentración del mismo. Las variaciones temporales vienen dadas principalmente por cambios en el estado reproductivo de la población. Esto se ve claramente en los resultados obtenidos con el PTP, CTP Y LTP en este capítulo. Los PTP predichos solían ser más bajos que los observados, cuando el alimento era bastante más alto de 20  $\mu\text{g}$  de proteína total/ml y a su vez los CTP y LTP predichos eran muy bajos en comparación con los

observados, cuando los individuos entraban en fase de acumular sustancias de reserva para aumentar la población.

Para poder solucionar los problemas anteriores, se intentó calcular la biomasa de las especies, pero teniendo en cuenta la cantidad de alimento así como el estado reproductivo de la población.

De los resultados obtenidos en el campo con los rotíferos, se observó que las variaciones en el contenido en carbohidratos y lípidos eran muy pequeñas. Los cambios más importantes se daban en el contenido en proteínas y venían determinados por la cantidad de alimento disponible. Debido a esto, en principio, para poder estimar la biomasa en este grupo, simplemente bastaría con tener en cuenta la concentración de alimento. Por lo tanto, lo que se hizo fue, calcular el contenido en proteínas, carbohidratos y lípidos a distintas concentraciones de proteína total, para las distintas especies. Esto se hizo con las tres especies de cladóceros (*Daphnia magna*, *Daphnia longispina* y *Ceriodaphnia reticulata*) y con el rotífero *Brachionus calyciflorus*, que es del único de que se disponen suficientes datos de los tres componentes celulares. Para las tres especies de cladóceros, las proteínas, carbohidratos y lípidos, se calcularon en función de las ecuaciones obtenidas para los animales no grávidos, en las que las variables independientes eran el tamaño y la proteína total. Para *Brachionus calyciflorus* las proteínas se calcularon usando la ecuación representada en la Figura 16. Como el contenido en

carbohidratos y lípidos en *Brachionus calyciflorus* variaba poco, se obtuvo el valor medio del rango entre el valor máximo y el mínimo encontrado para la C1 (en el caso de los carbohidratos), y contando todas las clases en el caso de los lípidos, debido a la escasez de datos. El valor medio de los carbohidratos fue de 0.055 y de 0.006  $\mu\text{g}/\text{ind}$  para los lípidos. Estos valores fueron sumados al contenido de proteína obtenido para cada concentración de alimento. Los resultados obtenidos para cada una de las especies, se exponen en la Tabla 51. Con estos datos se obtuvo una regresión potencial entre el tamaño de cada especie y la biomasa a cada una de las concentraciones de alimento expresadas en la Tabla 51. Los valores de las constantes A y B de estas regresiones, se exponen en la Tabla 52. Por último, se obtuvieron dos nuevas ecuaciones entre el alimento y cada una de estas constantes:

$$(23) \quad A = 3.1 \cdot 10^{-8} \cdot C^{2.345} \quad r^2 = 0.88$$

$$(24) \quad B = 2.803 \cdot C^{-0.1388} \quad r^2 = 0.94$$

C =  $\mu\text{g}$  proteína total/ml.

Por lo tanto, sabiendo la concentración de proteínas totales existentes en el agua, es posible calcular las constantes A y B por medio de las ecuaciones anteriores (23 y 24), y una vez obtenido estas constantes es posible calcular la biomasa que le corresponde a una especie de un tamaño

Tabla 51.- Valores de biomasa obtenidos para varias especies a distintas concentraciones de alimento, así como los tamaños medios de cada una de estas especies.

163

$\mu\text{g}$ PROTEINA TOTAL/ML	<u>Brachionus calyciflorus</u>		<u>Ceriodaphnia reticulata</u>		<u>Daphnia longispina</u>		<u>Daphnia magna</u>	
	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}/\text{ind}$ )	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}/\text{ind}$ )	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}/\text{ind}$ )	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}/\text{ind}$ )
50		0.712		15.17		52.08		65.83
40		0.65		13.85		47.53		63.23
30	150.35	0.568	750	12.32	1650	42.31	2350	60.05
20		0.454		10.47		35.98		55.81
10		0.258		7.95		27.40		49.20
5		0.063		6.08		21.00		43.36

TABLA 52.- Valores de la intercepción (A) y de la pendiente (B) de las regresiones potenciales obtenidas entre el tamaño medio y la biomasa de las especies, a diferentes concentraciones de alimento. Los tamaños medio y los valores de biomasa usados para calcular las regresiones, son los que se indican en la Tabla 51.

$\mu\text{g}$ proteína total/ml	A	B	$r^2$
50	$1.629 \cdot 10^{-4}$	1.694	0.98
40	$1.390 \cdot 10^{-4}$	1.706	0.99
30	$1.078 \cdot 10^{-4}$	1.728	0.99
20	$6.855 \cdot 10^{-5}$	1.772	0.99
10	$1.904 \cdot 10^{-5}$	2.086	0.97
5	$5.070 \cdot 10^{-7}$	2.381	0.95

determinado.

La mejor manera para poder comprobar la validez de estas ecuaciones, es aplicandola a los datos de otros autores. Uno de los pocos trabajos en los que estas comparaciones pueden ser hechas, es en el realizado por Morales-Baquero et al. (1988), ya que presentan datos sobre la biomasa (estimada a partir del volumen medio de la población) y los tamaños medios de poblaciones de la especie *Euchlanis dilatata*, en varias lagunas de alta montaña, y también se exponen los valores de concentración de clorofila a. Por lo tanto se puede tener una idea del alimento existente en esos cuerpos de agua. Para poder pasar los valores de clorofila a (en  $\mu\text{g/l}$ ) a valores de proteína total (en  $\mu\text{g/ml}$ ), se realizó una regresión entre ambos

parámetros a partir de los resultados obtenidos en este trabajo en todas las lagunas muestreadas (Tabla 2). La ecuación obtenida fue la siguiente:

$$(25) C = 7.7 \cdot \text{Chl}^{0.267} \quad r^2 = 0.55$$

Chl = clorofila a (en  $\mu\text{g/l}$ ).

Del rango de clorofila a expresado para cada laguna en el trabajo de Morales-Baquero (1988), se obtuvo el valor medio, el cual era pasado a valores de  $\mu\text{g}$  de proteína total/ml por medio de la ecuación anterior (25). Posteriormente, se calculó la media para estas lagunas, que era de  $8.8 \pm 0.56 \mu\text{g}$  de proteína total/ml. Este valor fue el que se usó para calcular las constantes A y B por medio de las ecuaciones 23 y 24. Una vez obtenidas estas constantes, se calculó la biomasa de la población en función del tamaño medio de la población encontrado en cada laguna (Morales-Baquero, 1988) y el número de individuos presentes en ellas (Morales-Baquero et al., 1988).

En la tabla 53 se ve como los valores predichos según las ecuaciones anteriores, son parecidos a los obtenidos por los autores, aunque estos últimos son siempre inferiores a los predichos. En este trabajo (Morales-Baquero et al., 1988), los autores comparan sus resultados con los predichos según la ecuación dada por Dumont et al. (1975) para *Euchlanis dilatata*, la que a diferencia de la expresada por Morales-Baquero et al. (1988), está obtenida midiendo el peso seco de los animales de

TABLA 53.- Comparación de los valores de biomasa de la población de la especie *Euchlanis dilatata* dados por Morales-Baquero et al. (1988) en varias lagunas de alta montaña <sup>(1)</sup>, con los resultados predichos según las ecuaciones obtenidas en este trabajo <sup>(2)</sup>, y los predichos según la ecuación dada por Dumont et al. (1975) para esta especie <sup>(3)</sup>. Los valores están expresados en mg.

Lagunas	( <sup>1</sup> )	( <sup>2</sup> )	( <sup>3</sup> )
Majano	0.82	1.04	1.03
Gemelas	0.15	0.28	0.28
Caldera	0.08	0.1	0.1
Peñón Negro	0.24	0.31	0.31
Aguas Verdes	0.17	0.23	0.23
Rio Seco sup.	0.14	0.17	0.17
Caldereta	0.87	1.37	1.37
Rio Seco	0.04	0.05	0.05
Siete Lag. 2	0.08	0.11	0.11
" " 4	0.05	0.07	0.07
" " 6	0.18	0.24	0.24
" " 7	0.09	0.1	0.1
Virgen Sup.	0.31	0.44	0.44
Virgen Inf.	0.06	0.09	0.09

una población que se desarrollaba en el lago Donk. En la Tabla 53, se ve como los valores predichos según la ecuación dada por Dumont et al. (1975), son idénticos a los predichos según las ecuaciones dadas en este trabajo. El problema es que en el trabajo de Dumont et al. (1975), no se especifica ningún dato que pueda dar una idea sobre la cantidad de alimento disponible para los animales, y por lo tanto solo se puede suponer que la

concentración de alimento sería cercana a los  $8.8 \mu\text{g}$  de proteína total/ml.

La biomasa de individuos no grávidos en cladóceros, también puede ser predicha por medio de estas ecuaciones. Yan y Mackie (1987) midieron la biomasa de individuos no grávidos de *Holopedium gibberum* en 30 lagos de Canadá. Con estos obtuvieron una ecuación en la que la biomasa era estimada a partir de la longitud. El único parámetro que dan los autores, y que puede usarse como indicador del alimento, es el valor del fósforo total (PT) disuelto en el agua, el cual tiene un valor medio para todos los lagos de  $8.7 \mu\text{g/l}$ . Este valor es muy similar al PT existente en el embalse de la Minilla en el que, a la profundidad de 2 m la media fue de  $8.32 \pm 3.16 \mu\text{g/l}$  en el periodo comprendido entre Enero de 1987 a Agosto de 1988 (Casco, comunicación personal). Debido a esta semejanza, se puede considerar de una manera muy general, que la clorofila a media existente en la Minilla, debe ser semejante a la existente en estos lagos. Este valor de clorofila a en la Minilla fue de  $2.47 \mu\text{g/l}$  y, a partir de él se obtuvo la concentración media de proteínas totales ( $9.8 \mu\text{g/ml}$ ), supuestamente existente en esos lagos. En la Tabla 54 se comparan los valores obtenidos desarrollando la ecuación de Yan y Mackie y los predichos según las ecuaciones obtenidas en este trabajo. Se ve como los resultados son semejantes.

No se han podido encontrar otros trabajos que además de dar la biomasa de las especies, den alguna información que nos pueda dar una idea sobre el alimento existente.

TABLA 54.- Comparación de los valores de biomasa (en  $\mu\text{g}/\text{ind}$ ) correspondientes a varios tamaños, para individuos no grávidos de la especie *Holopedium gibberum* según una ecuación obtenida por Yan y Mackie (1987) (1), con los resultados predichos según las ecuaciones obtenidas en este trabajo (2).

Tamaño ( $\mu\text{m}$ )	(1)	(2)
800	3.71	5.25
1000	7.02	8.76
1500	22.41	20.06
1800	37.75	29.11

Cuando lo que se quiere es estimar la biomasa de individuos grávidos, entonces es necesario también considerar el estado reproductivo de la población, además del alimento existente. como de las especies de rotíferos no se disponen de datos sobre el número de individuos en relación al de los huevos, solo se pudo trabajar con los datos existentes de los tres especies de cladóceros. Lo que se hizo fue, trabajar directamente con los datos de PTP (Tablas 37, 38 y 39), CTP (Tablas 41, 42 y 43) y LTP (Tablas 45, 46 y 47), obtenidos para las tres especies de cladóceros en las lagunas muestreadas. Las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

$$(26) \ln \text{PTP} = -8.067 + 1.319 \cdot \ln T + 0.544 \cdot \ln C + 1.017 \cdot \ln I$$

(n= 34, r<sup>2</sup>= 0.97, SM= 0.056, F= 394, p< 0.001)

$$(27) \ln (CTP+1) = -10 + 1.391 \cdot \ln T + 0.355 \cdot \ln C - 0.131 \cdot \ln HE + 0.841 \cdot \ln I$$

(n= 34, r<sup>2</sup>= 0.82, SM= 0.3, F= 37, p< 0.001)

$$(28) \ln (LTP+1) = -13.854 + 2 \cdot \ln T + 0.038 \cdot \ln C - 0.084 \cdot \ln HE + 1.016 \cdot \ln I$$

(n= 34, r<sup>2</sup>= 0.76, MS= 0.68, F=27, p< 0.001)

T = tamaño medio en  $\mu m$

HE= número de hembras/número de huevos y embriones

C =  $\mu g$  de proteína total/ml

I = número de individuos por litro

A partir de estas ecuaciones es posible estimar la biomasa de una población o también la de un solo individuo, sabiendo el alimento y el número de embriones o huevos/hembra existentes en la población. Estas ecuaciones no han podido ser contrarrestadas con datos de otros autores, debido a que de nuevo, no se ha podido encontrar trabajos en los que, además de la biomasa, se diera alguna información sobre el alimento existente en el agua y sobre la cantidad de huevos y embriones presentes en la población.

En resumen, a lo largo de este trabajo se ha observado una serie de regularidades importantes entre especies de talla y morfología muy diferentes, pero con una característica común, el tipo de alimentación. Este patrón observado entre las especies, ha sido usado para obtener una serie de ecuaciones muy

generales, que permiten hacer una estima sobre la biomasa de cualquier especie filtradora del zooplancton, teniendo en cuenta parámetros tan simples como la clorofila a, el número de individuos de la población, tamaño medio de la misma y la cantidad de huevos y embriones. Lógicamente, este modelo es muy general, existiendo otra serie de factores que no han sido tenidos en cuenta, pero que también pueden tener importancia en un momento determinado. Uno de estos puede ser la temperatura, ya que por ejemplo, se ha observado que a medida que ésta aumenta, la cantidad de proteínas de los individuos (Galkovskaya, et al., 1987) y el tamaño de los mismos (Morales-Baquero, 1988) disminuyen.

## CONCLUSIONES

- 1.- El contenido en proteínas de los individuos de las especies de cladóceros y rotíferos, está muy relacionado con la cantidad de alimento disponible. Como la cantidad de carbohidratos y las proteínas totales en el medio, son buenos indicadores del alimento existente, es posible a partir de éstos (principalmente del último), calcular el contenido en proteínas de los individuos para cada una de las especies. Como los lípidos totales existentes en el medio, son más abundantes en proporción cuando el alimento escasea, están relacionados negativamente con el contenido en proteínas de los individuos.
- 2.- A medida que aumenta el alimento, el contenido en proteínas se incrementa también, aunque este incremento, se hace menos pronunciado cuando el alimento está llegando al óptimo de cada especie.
- 3.- El alimento necesario para alcanzar un estado nutritivo óptimo, es menor a medida que las especies son más pequeñas, ahora bien, esto no implica que la concentración mínima necesaria de alimento, sea también menor en las especies más pequeñas.
- 4.- Concentraciones altas de alimento benefician mas a las especies mayores ya que, la concentración óptima de alimento es mayor en las especies de mayor talla. Además, cada especie presenta un umbral máximo a partir del cual la

densidad de partículas presentes le es perjudicial, ya que se obstruye el aparato filtrador. Este umbral es menor a medida que la especie es más pequeña.

- 5.- En los cladóceros los carbohidratos tienen un doble función: estructural, estando por ello relacionados con la disponibilidad de alimento; y de reserva, en cuyo caso también están influenciados por la dinámica poblacional. Debido a esto, el contenido en carbohidratos de los individuos puede ser calculado, conociendo las proteínas totales del medio y/o usando parámetros poblacionales, como el número de huevos y embriones por hembra y la cantidad de proteínas totales de la población.
- 6.- En los rotíferos, los carbohidratos son la principal sustancia de reserva. A pesar de esto, también están afectados por el alimento, aunque esta relación no es simple sino que adopta una forma de campana de Gauss.
- 7.- Los lípidos son la principal fuente de reserva en cladóceros y por lo tanto, los cambios que se producen en este componente están más determinados por el estado reproductivo de la población, siendo posible calcular el contenido en lípidos de los individuos a partir de parámetros poblacionales.
- 8.- Los lípidos en los rotíferos, tienen una función estructural, siendo cuantitativamente poco importantes.
- 9.- Dentro del grupo de los cladóceros, aunque solo se ha estudiado una especie bentónica, *Simocephalus exspinosus*. Se ha encontrado un comportamiento opuesto entre las

especies de habitats planctónicos y bentónicos de forma que, cuando el alimento existente en el plancton es abundante, resultan beneficiado los cladóceros planctónicos y los bentónicos parecen verse perjudicados. A pesar de esto, como en el bentos el alimento existente es mayor que en el plancton, el estado nutritivo en el que se encuentra *Simocephalus exspinosus*, es casi siempre mejor comparandolo, por ejemplo, con *Daphnia magna*, que es una especie que presenta un rango de tamaño similar.

- 10.- En los cladóceros, cuando se comparan individuos cultivados en el laboratorio con los del medio natural, se observa que a la misma concentración de proteínas totales, éstos últimos se encuentran en un mejor estado de nutrición ya que, son capaces de explotar recursos, como el perifiton o detritos del sedimento, que no tienen en los cultivos.
- 11.- En los rotíferos, al contrario de lo que sucede con los cladóceros, a la misma concentración de alimento, los individuos cultivados en el laboratorio presentan un mejor estado nutritivo que los que se encuentran en el medio natural. Esto se debe a que los rotíferos solo son capaces de explotar el plancton y, en el laboratorio, al trabajar con un cultivo monoespecífico, la cantidad de alimento aprovechable es mucho mayor que en el medio natural.
- 12.- Los cladóceros en el medio natural, en general no están en condiciones óptimas de alimento, y este efecto es mas acusado a medida que aumenta el tamaño de la especie. Incluso en una misma especie, los individuos de menor talla

alcanzan más fácilmente el estado nutritivo óptimo que los mayores. Los rotíferos, por el contrario, como necesitan menos alimento, suelen estar en condiciones cercanas al óptimo nutricional.

- 13.- Las diferencias principales encontradas en *Daphnia magna*, entre las hembras grávidas y las efipiales, es que estas últimas presentan mayor contenido en lípidos y a su vez, la formación del efipio no se ve influida por la densidad de la población.
- 14.- En los cladóceros, el factor que parece determinante para que comiencen acumular sustancias de reserva para aumentar su población, es que la densidad de la población sea baja.
- 15.- Algunas especies como *Daphnia magna*, comienzan su ciclo después del periodo de verano en el que los individuos son muy escasos y la población se mantiene en un estado de resistencia en forma de efipios. Al inicio del ciclo la acumulación de sustancias de reserva en los individuos es muy importante ya que, se parte de muy pocos individuos y, por lo tanto, es necesario hacer una fuerte inversión en reproducción para aumentar la población. A lo largo del año también se van dando ciclos en los que los individuos acumulan sustancias de reserva pero, en esos casos la cantidad de carbohidratos y lípidos es mucho menor ya que se parte de una densidad de población mayor.
- 16.- En los cladóceros, las variaciones mas importantes en la biomasa se dan en el tiempo, ya que son debidas a los cambios en el estado reproductivo de la población, siendo

los carbohidratos y en mayor medida los lípidos, los principales responsables de estas fuertes variaciones. Los cambios en la biomasa en el espacio, no son tan importantes, y están causados por la cantidad de alimento disponible en los cuerpos de agua. En este último caso, el contenido en proteínas es el componente que más varía.

17.- La proporción de sustancias de reserva en los individuos adultos, es similar en todas las especies de cladóceros, independientemente del tamaño. Sin embargo, esta relación no se mantiene en los neonatos ya que, en las especies más pequeñas, la proporción de lípidos en los neonatos es inferior en comparación con las especies mayores. Esto puede ser una de las causas de porque, cuando el alimento escasea las especies de mayor tamaño dominan sobre las pequeñas.

18.- Al comparar los cladóceros y los rotíferos, a condiciones óptimas de alimento, ambos grupos invierten lo mismo en sustancias de reserva, siendo aproximadamente un 10% de la biomasa total, considerando ésta como la suma las proteínas, carbohidratos y lípidos. Las oscilaciones en las sustancias de reserva son muy grandes en ambos grupos, pudiendo variar desde un 10 hasta un 75%.

19.- En los cladóceros se ha observado como, a medida que el alimento disminuye, aumentan las sustancias de reserva, aunque no se ha podido determinar si a concentraciones muy bajas se mantiene esta tendencia. En el caso de los rotíferos, el estudio realizado en el laboratorio con

*Brachionus calyciflorus* ha revelado que, cuando el alimento disminuye, el contenido en carbohidratos por individuo aumenta pero, al llegar a un determinado umbral, el alimento ya no es suficiente para mantener esa tendencia y comienzan a disminuir las sustancias de reserva.

20.- La estrategia reproductiva observada en *Brachionus calyciflorus*, cambia en función del alimento disponible, pero siempre está encaminada a maximizar la producción de neonatos. Existe una cantidad mínima de carbohidratos necesaria para que el huevo se desarrolle, y ésta se da a bajas concentraciones de alimento (por razones obvias) y, cuando el alimento es muy abundante ya que así, al invertir menos en cada huevo, se puede producir mayor número de descendientes. Cuando la concentración es intermedia, la estrategia cambia. En este caso se da la cantidad máxima de carbohidratos por individuo, consiguiendo así que los neonatos salgan más desarrollados del huevo y por lo tanto necesiten menos tiempo para llegar a adultos y poder reproducirse.

21.- Se han encontrado semejanzas importantes entre ambos grupos, resaltando la regularidad observada en el contenido medio en proteínas, carbohidratos y lípidos. Cada especie presenta una determinada cantidad de estos componentes, que está en función directa del tamaño de la misma.

22.- Esta regularidad existente, ha permitido obtener ecuaciones de tipo mas general, para calcular la biomasa de las especies. Estas han sido aplicadas en algunos trabajos de

otros autores, siendo los resultados predichos por estas ecuaciones, semejantes a los observados por los autores.

## EPILOGO

Este trabajo, sienta las bases para abordar el estudio de la alimentación de las especies planctónicas filtradoras desde un nuevo enfoque. Al individualizar el análisis, permite abordar trabajos en ecosistemas naturales que, antes presentaban dificultades como por ejemplo, estudios de competencia, estimas de producción secundaria, dinámica de poblaciones, etc. Por lo tanto, creemos que la generalización de esta técnica, puede ser de gran utilidad en en futuros estudios de alimentación en zooplancton.

Gracias por su paciencia.

## BIBLIOGRAFIA

- Alonso, M. 1985. Las lagunas de la España Peninsular: taxonomía, ecología y distribución de los cladóceros. Tesis Doctoral de la Universidad de Barcelona. 790 pp.
- American Public Health Association. 1971. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 13th ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 874 pp.
- Amory, A.M. & C.L. Schubert. 1987. A methods to determine tannin concentration by the measurement and quantification of protein-tannin interactions. Oecologia, 73: 420-424.
- Arruda, J.A., G.R. Marzolf, & R.T. Faulk. 1983. The role of suspended sediments in the nutrition of zooplankton in turbid reservoirs. Ecology. 6: 1225-1235.
- Bámstedt, U. 1985. Seasonal excretion rates of macrozooplankton from the Swedish west coast. Limnol. Oceanogr., 30; 607-617.
- Bergquist, A.M., S.R. Carpenter & C. Latino. Shifts in phytoplankton size structure and community composition during grazing by contrasting zooplankton assemblages. Limnol. and Oceanogr., 30: 1037-1045.
- Bleiwass, H.A., P.M. Stokes. 1985. Collection of large and small food particles by *Bosmina*. Limnol.

- Oceanogr., 30: 1090-1092.
- Bogdan, K.G. & J.J. Gilbert. 1982. Seasonal patterns of feeding by natural populations of *Keratella*, *Polyarthra*, and *Bosmina*: Clearance rates selectivities and contributions to community grazing. Limnol. Oceanogr., 27: 918-934.
- & ----- . 1984. Body size and food size in freshwater zooplankton. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 81: 6427-6431.
- & ----- . 1987. Quantitative comparison of food niches in some freshwater zooplankton. Oecologia. (Berlin), 72: 331-340
- , ----- & P.L. Starkweather. 1980. In situ clearance rates of planktonic rotifers. Hidrobiologia, 73: 73-77.
- Brooks, J.L. & S.I. Dodson. 1965. Predation, body size, and composition of plankton. Science, 150: 28-35.
- Burns, C.W. & F.H. Rigler. 1967. Comparison of filtering rates of *Daphnia rosea* in lake water and in suspensions of yeast. Limnol. Oceanogr., 12:492-502.
- & J.J Gilbert. 1986a. Effects of Daphniid size and density on interference between *Daphnia* and *Keratella cochlearis*. Limnol. Oceanogr., 31: 843-858.
- & ----- . 1986b. Direct observations of the mechanisms of interference between *Daphnia* and *Keratella cochlearis*. Limnol. Oceanogr., 31: 859-866.
- . 1988. Starvation resistance among copepod

- nauplii and adults. Verh. Internat. Verein. Limnol.,  
23: 2087-2091.
- Cowgill, U.M., H.W. Emmel, D.L. Hopkins, I.T. Takahashi  
& W.M. Parker. 1986. Variation in chemical  
composition, reproductive success and body weight of  
*Daphnia magna* in relation to diet. Int. Revue ges.  
Hydrobiol., 71: 79-99.
- Cruz-Pizarro, L. 1978. Rotíferos planctónicos de un lago  
de alta montaña (La Caldera, Sierra Nevada, Granada).  
Necesidad de una taxonomía ecológica. Trab. Monogr.  
Dep. Zool. Univ. Granada., 4: 1-40.
- . 1981. Biomasa y producción de *Mixodiaptomus  
laciniatus* (Copepoda, Calanoida) en el lago de La  
Caldera (Sierra Nevada, Granada). Actas Primer Congreso  
AEL: 115-124.
- Cuhel, R.L. & D.R.S. Lear. 1987. Protein synthesis by  
lake plankton measured using in situ carbon dioxide and  
sulfate assimilation. Can. J. Fish. Aquatic. Sci.,  
44: 2102-2117.
- Culver, D.A. M.M. Boucherle, D.J. Bean & J.W. Fletcher.  
1985. Biomass of freshwater crustacean zooplankton from  
length-weight regressions.
- Dabrowski, K. & M. Rusiecki. 1983. Content of total and  
free amino acids in zooplanktonic food of fish larval.  
Aquiculture, 30: 31-42.
- DeMott, W.R. 1982. Feeding selectivities and relative  
ingestion rates of *Daphnia* and *Bosmina*. Limnol.

- Oceanogr., 27: 518-527.
- & W.C. Kerfoot. 1982. Competition among cladocerans. Nature of the interaction between *Bosmina* and *Daphnia*. Ecology, 63: 1949-1966.
- Darley, W.M. 1982. Algal biology: a physiological approach. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 83 pp.
- Dodson, S.I. 1974. Zooplankton competition and predation: An experimental test of the size-efficiency hypothesis. Ecology, 55: 605-613.
- Dorsey, T.E., P.W. McDonald & O.A. Roels. 1977. A heated Biuret-Folin protein assay which gives equal absorbance with different proteins. Anal. Biochem., 78: 156-164.
- Downing J.A. & R.H. Peters. 1980. The effect of body size and food concentration on the in situ filtering rate of *Sida crystallina*. Limnol. Oceanogr., 25: 883-895.
- Dubois, M. K.A. Gilles J.K. Hamilton & F. Smith. 1965. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356.
- 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: 75-97.
- . 1977. Biotic factors in the population

- dynamics of rotifers. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol., 8: 98-122.
- Duncan, A. & Gulati, R.D. 1983. A diurnal study of planktonic rotifer populations in Parakrama Samudra Reservoir, Sri Lanka. In: Schiemer, F (ed). Limnology of Parakrama Samudra, Sri Lanka: case study of an ancient man-made lake in the tropics. 95-106. Dr. W. Junk, Plub., The Hague.
- . 1985. Body carbon in daphnids as an indicator of the food concentration available in the field. Arch. Hydrobiol. Beih., 21: 81-90.
- , W. Lampert & O. Rocha. 1985. Carbon weight on length regressions of *Daphnia* spp.. Verh. Internat. Verein. Limnol., 22: 3109-3115.
- Edmonson, W.T. 1959. Freshwater Biology. J. Wiley & Son., Inc. New York, segunda edición. 1248 pp.
- Fulton III, R.S. & H.W. Paerl. 1987. Effects of colonial morphology on zooplankton utilization of algal resources during blue-green algal (*Mycrocystis aeruginosa*) blooms. Limnol. Oceanogr., 32: 634-644.
- Furest, A & J. Toja. 1981. Ecosistemas acuáticos del Parque Nacional de Doñana: Distribución del zooplancton. I Simposio sobre el agua en Andalucía: 151-167.
- Galkovskaya, G.A., J. Ejsmont-Karabin & V. N. Evdokimov. 1987. Relative protein metabolism in rotifer *Brachionus calyciflorus* PALLAS, in relation to temperature. Int.

- Revue ges. Hydrobiol., 72: 59-69.
- Geller, W. 1975. Die Nahrungsaufnahme von *Daphnia pulex* in Abhängigkeit von der Futterkonzentration, der temperatur, der Körpergrösse und dem Hungerzustand der tiere. Arch. Hydrobiol., Suppl. 48: 47-107.
- , 1985. Production, food utilization and losses of two coexisting ecologically different *Daphnia* species. Arch. Hidrobiol. Beih., 21: 67-79.
- & H. Müller. 1985. Seasonal variability in the relationship between body length and individual dry weight as related to food abundance and clutch size in two coexisting *Daphnia* species. J. Plankton Res., 7: 1-18.
- Gerritsen, J. & J. Kou. 1985. Food limitation and body size. Arch. Hidrobiol. Beih., 21: 173-184.
- Ghilarov, A.M. 1985. Dynamics and structure of cladoceran populations under conditions of food limitation. Arch. Hidrobiol. Beih., 21: 323-332.
- Giguère, L.A., J.F. St-Pierre, B. Bernier, A. Vézina & J.G. Rondeau. 1989. Can we estimate the true weight of zooplankton samples after chemical preservation?. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46: 522-527.
- Gilbert, J.J. 1985. Competition between rotifers and *Daphnia*. Ecology, 66: 1943-1959.
- . 1988. Susceptibilities of ten rotifer species to interference from *Daphnia pulex*. Ecology, 69: 1826-1838.

- & K.G. Bogdan. 1981. Selectivity of Polyarthra and Keratella for flagellate and aflagellate cells. Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie Verhandlungen, 16: 1359-1366.
- & ----- . 1984. Rotifer grazing: in situ studies on selectivity and rates. In D.G. Meyers and J.R. Strickler, editors. Trophic interactions within aquaic ecosystems. AAAS Selected Symposium 85: 97-133.
- , R.S. Stemberger. 1985. Control of Keratella populations by interference competition from Daphnia. Limnol. Oceanogr., 30: 180-188.
- Gliwicz, Z.M. 1985. Predation or food limitation: an ultimate reason for extinction of planktonic cladoceran species. Arch. Hydrobiol. Beich., 21: 419-430.
- , en prensa. Food thresholds and body size in cladocerans- Should the size efficiency hypothesis be laid to rest? Verh. Internat. Verein. Limnol.
- Golterman, H.L., R.S. Clymo & M.A.M. Ohustad. 1978. Methods for physical and chemical analysis of fresh waters. IBP Handbook 8, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Goulden, C.E., L.L. Henry & A.J. Tessier. 1982. Body size, energy reserves, and competitive ability, in three species of Cladocera. Ecology 63:1780-1789.
- & L. Henry. 1984. In D.G. Meyers and J.R. Strickler, editors. Lipid energy reserves and their

- role in cladocera. AAAS Selected symposia series, 85: 167-185.
- , C.E., L. Henry & D. Berrigan. 1987. Egg size, postembryonic yolk, and survival ability. Oecologia, 72: 28-31.
- Green, J. & O. B. Lan. 1974. *Asplanchna* and the spines of *Brachionus calyciflorus* in two Javanese sewage ponds. Freshwat. Biol., vol. 4, 223-226.
- Grönberg, B. 1973. Djurplanktonundersökningar i Ekoln (Mälaren) 1967-1969. Maddelanden från Naturvårdsverkets limnologiska undersökning, 54: 35 pp.
- Guisande, C. & J. Toja. 1988. The dynamics of various species of the genus *Brachionus* (Rotatoria) in the Guadalquivir River. Arch. Hydrobiol., 112: 579-595.
- & L. Serrrano. en prensa. Analysis of protein, carbohydrate and lipid in rotifers. Hydrobiologia.
- Hagerman, E.A. & L.G. Butler. 1980. Determination of protein in tannin-protein precipitates. J. Agric. Food Chem., 28: 944-947.
- Halbach, V. & G. Halbach-Keup. 1974. Quantitative beziehungungen zwischen phytoplankton und der Popultions dynamik des rotators *Brachionus calyciflorus* Pallas. Befunde aus laboratoriumsexperimenten und Freilanduntersuchungen. Arch. Hydrobiol., 73: 273-309.
- Hann, J.B., & D.N. Hebert. 1982. Re-interpretation of

genetic variation in sinocephalus (Cladocera, Daphniidae). Genetics., 102: 101-107.

Haney, J.F. 1973. An in situ examination of the grazing activities of natural zooplankton communities. Arch. Hydrobiol. 72: 87-132.

----- . 1985. Regulation of cladoceran filtering rates in nature by body size, food concentration, and diel feeding patterns. Limnol. Oceanogr., 30: 397-411.

Hebert N.D.P., & T. Crease. 1983. Clonal diversity in populations of *Daphnia Pulex* reproducing by obligate parthenogenesis. Heredity. 51: 353-369.

Hoenicke, R. & C.R. Goldman. 1987. Resource dynamics and seasonal changes in competitive interaction among three cladoceran species. J. Plankton Res., 9: 397-417.

Horton, P.A., M. Rowan, K.E. Webster & R.H. Reters. 1979. Browsing and grazing by cladoceran filter feeders. Can. J. Zool., 57: 206-212.

Hrbáček, J.O., Albertorá, B., Desortorá, V. Gottwaldorá and Popovsky, J. 1986. Relation of the zooplankton biomass and share of large cladocerans to the concentration of total phosphorus, chlorophyll-a and transparency in Hubenor and Vrchlice reservoirs. Limnologica., 17: 301-308.

Huntley, M. 1985. A method for estimating food-limitation and potential production of zooplankton communities.

- Arch. Hidrobiol. Beih., 21: 41-55.
- Hutchinson, G.E. 1967. A treatise on Limnology. II. Introduction to lake biology and the limnoplankton. John Wiley & Sons, New York. 1115 pp.
- Kerfoot, W.C., W.R. DeMott & D.L. DeAngelis. 1985. Interactions among cladocerns: Food limitation and exploitative competition. Arch. Hidrobiol. Beih. 21: 431-451.
- Knoechel, R., L. B. Holtby. 1986. Cladoceran filtering rate: body length relationships for bacterial and large algal particles. Limnol. Oceanog., 34: 195-200.
- Kokova, V.E., I.N. Trubacher & V.A. Barashkov. 1982. Biokhimickeskii sostar neko torykh vodnykh bespozvonochuykn. Gidrobiol. Zh., 18:58-62.
- Koste, W. 1978. Rotatoria: Die Radertiere Mitteleuropas. I. Textband, 673 pp., II. Tafelband. T: 1234 pp. Berlin- Stuttgart.
- Lampert, W. 1977. Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* de Geer as related to enviromental conditions, II. The dependence of carbon assimilation on animal size temperature, food concentration and diet species. Arch. Hydrobiol., 48: 310-335.
- , W. & B.E. Taylor. 1985. Zooplankton grazing in a eutrophic lake: implications of diel vertical migration. Ecology, 66(1):68-82.
- & P. Muck. 1985. Multiple aspects of food limitation in zooplankton communities: the

- Daphnia-Eudiaptomus* example. Arch. Hidrobiol. Beih., 21: 311-322.
- Langeland, A. 1982. Interaction between zooplankton and fish in a fertilized lake. Holarctic Ecology., 5: 273-310.
- Lawrence, S.G., D.F. Malley, W.J. Fiendlay, M.A. MacIver & I.L. Delbaere. 1987. Method for estimating dry weight of freshwater planktonic crustaceans from measures of length and shape. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44: 264-274.
- Lemcke, H.W. & W. Lampert. 1975. Veränderungen im Gewicht und der chemischen Zusammensetzung von *Daphnia pulex* im Hunger. Arch. Hydrobiol., 48: 108-137.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbraugh, A.L. Farr & R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 256-275.
- Margalef, R. 1953. los crustáceos de las aguas continentales ibéricas. Biología de las aguas continentales. X. Ministerio de Agricultura, Madrid. 243 pp.
- , 1974. Ecología. Ed. Omega, Barcelona. 951 pp.
- , 1983. Limnología. Ed. Omega, Barcelona. 1010 pp.
- Marks D.L., R. Buchsbaum & T. Swain. 1985. Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. Anal. Biochen., 147: 136-143.

- Markwell, M.A.K., S.M. Haas, L.L. Bieber & N.E. Tolbert. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem., 87: 206-210.
- Matveev, V. 1985. Delayed density dependence and competitive ability in two cladocerans. Arch. Hidrobiol. Beih. 21: 453-459.
- Mayzaud, P. & Mayzaud, O. 1985. The influence of food limitation on the nutritional adaptation of marine zooplankton. Arch. Hidrobiol. Beih., 21: 223-233.
- McCauley, E. & F. Briand. 1979. Zooplankton grazing and phytoplankton species richness: Field tests of the predation hypothesis. Limnol. Oceanogr., 24: 243-252.
- McMahon, J.W. & F.H. Rigler. 1963. Mechanisms regulating the feeding rate of *Daphnia magna* Straus. Can. J. Zool., 41: 321-332.
- Meise, C.J., W.R. Munns & N.G. Hairston. 1985. An analysis of the feeding behavior of *Daphnia pulex*. Limnol. Oceanogr., 30: 862-870.
- Miracle, M.R. 1974. Niche structure in freshwater zooplankton: a principal components approach. Ecology, 55: 1306-1316.
- . 1977. Migration patchiness, and distribution in time and space of planktonic rotifers. Arch. Hydrobiol., 8: 19-37.
- Morales-Baquero, R. 1988. Body size variability of *Euchlanis dilatata* EHRENBERG in high mountain lakes of

- Sierra Nevada (Spain). Arch. Hydrobiol., 112; 597-609.
- , L. Cruz-Pizarro & P. Carrillo. 1988. Biomass and production of *Euchlanis dilatata* in high mountain lakes and ponds of Sierra Nevada (Spain). J. Plankton Res., 10: 1065-1075.
- Morgan, N.C., T. Backiel, G. Bretschko, A. Duncan, A. Hillbicht-Ilikowska, Z. Kajak, J.F. Kitchell, P. Larson, C. Lévêque, A. Nauwerck, F. Schiemer & J. E. Thorpe. 1980. Secondary production. En *The functioning of freshwater ecosystems*. E.D. LeCren and R.H. Lowe-Mc Connell [ed.], IBP Handbook 22, 1 edición, pp. 251-284. Cambridge University Press.
- Murtauch, A. P. 1985. The influence of food concentration and feeding rate on the gut residence time of *Daphnia*. J. Plankton Res., 7: 415-420.
- Neill, W.E. 1975. Regulation of rotifer densities by crustacean zooplankton in an oligotrophic montane lake in British Columbia. Oecologia, 61: 175-181.
- O'Brien, W.J., N.A. Slade & G.L. Vinyard. 1976. Apparent size as the determinant of prey selection by bluegill (*Lepomis macrochirus*). Ecology, 57: 1304-1310.
- Pauli, H.R. en prensa. Estimating and productivity of rotifer communities. Hidrobiologia.
- Pick, F.R. 1987. Carbohydrate and protein content of Lake seston in relation to plankton nutrient deficiency. Can. J. Fish Aquat. Sci., 44: 2095-2101.

- Porter, K.G. J.D. Orcutt & J. Gerritsen. 1983. Functional response and fitness in a generalist filter feeder, *Daphnia magna* (CLADOCERA: CRUSTACEA). Ecology, 64(4): 735-742.
- Pourriot, R. 1965. Recherches sur l'ecologie des rotiferes. Vieet Miliev, 21: 1-224.
- . 1973. Rapports entre température, la taille des adultes, la longueur des oeufs et la taur de de'veveloppement embryonnaire chez *Brachionus calyciflorus* PALLAS (Rotifère). Ann. Hydrobiol., 4: 103-115
- . 1977. Food and feeding habits of Rotifera. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol., 8: 98-122.
- & L. LeBorgue. 1970. Teneurs en proteines, lipides et glucides de zoplancton d'eau douce. Ann. d'Hydrobiol., 1: 171-178.
- Ringelberg, J. & K. Royackers. 1985. Food uptake in hungry cladocerans. Arch. Hydrobiol. Beih., 21: 199-207.
- Rippka, R., J.D. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman & R.Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. J. of General Microbiology, 11: 1-61
- Romanosvsky, Y.E. & I.Y. Feniova. 1985. Competition among Cladocera: Effect of different levels of food supply. Oikos, 44: 243-252.
- Rosen, R.A. 1981. Length-weight relationships of some freshwater zooplankton. J. Freshwater Ecol., 1:

- Ruttner-Kolisko, A. 1974. Plankton rotifers. Binnengewässer, 26/1 Suppl, Verl. Schweizerbert.
- . 1977. Suggestions for biomass calculation of plankton rotifers. Arch. Hydrol. Beih., 8: 71-76.
- Sarma, S.S.S. & T.R. Rao. 1987. Effect of food level on body size and egg size in growing population of the rotifer *Brachionus patulus* MULLER. Arch. Hydrobiol., 111: 245-254.
- Snell, T. & K. Carrillo. 1984. Body size variation among strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture, 37: 359-367
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1979. Biometría. H. Blume Ediciones. 832 pp.
- Statgraphics. 1985. STSC Users' Guide. Software Publishing Group, Rockville. 635 pp.
- Starkweather, P.L. & J.J. Gilbert. 1977. Feeding in the rotifer *Brachionus calyciflorus* II. Effect of food density on feeding rates using *Euglena gracilis* and *Rhodotrovula glutinis*. Oecologia (Berlin), 28: 133-139.
- . 1980. Aspects of the feeding behaviour and trophic ecology of suspension feeding rotifers. Hydrobiologia, 73: 63-72.
- Stemberger, R.S. & J.J. Gilbert. 1985a. Body size, food concentration, and population growth in planktonic rotifers. Ecology, 66: 1151-1159.
- & ----- . 1985b. Assessment of

- threshold food levels and population growth in planktonic rotifers. Arch. Hydrobiol. Beih., 21: 269-275.
- & ----- . 1987. Rotifer threshold food concentrations and the size-efficiency hypothesis. Ecology, 68: 181-187.
- Sueoka, N., K.S. Chiang & J.R. Kates. 1967. Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardi*. J. Mol. Biol., 25: 47-67.
- Toja, J., T. López & N.A. Gabellone. en prensa. Successional changes in two dune ponds (Doñana National Park). Verh. Internat. Verein. Limnol.
- Taylor, E. B. 1985. Effects of food limitation on growth and reproduction of *Daphnia*. Arch. Hidrobiol. Beih., 21: 285-296.
- Tessier, A.J. & C.E. Goulden. 1982. Estimating food limitation in cladoceran populations. Limnol. Oceanogr., 27: 707-717.
- & ----- . 1987. Cladoceran juvenile growth. Limnol. Oceanogr., 32: 680-686.
- , L.L. Henry, C.E. Goulden & M. W. Durand. 1983. Starvation in *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation. Limnol. Oceanogr., 28: 667-676.
- Orcutt, J.D. 1985. Food level effects on the competitive interactions of two co-occurring cladoceran zooplankton: *Diaphanosoma brachyurum* and *Daphnia ambigua*. Arch.

- Hydrobiol. Beih., 21: 465-473.
- Vanni, M.J. 1986. Competition in zooplankton communities: Suppression of small species by *Daphnia pulex*. Limnol. Oceanogr., 31: 1039-1056.
- 1987. Effects of food availability and fish predation on a zooplankton community. Ecological Monographs., 57: 61-88.
- Vollenweider, R.A. 1969. Primary production in aquatic environments. IBP Handbook 12, Blackwell Scientific Publications, Oxford. 169 pp.
- Walz, N. 1983. Continuous culture of the pelagic rotifers *Keratella cochlearis* and *Brachionus angularis*. Arch. Hydrobiol., 98: 70-92.
- & F. Rothbucher. en prensa. Effect of food concentration on body size, egg size, and population dynamics of *Brachionus angularis* (ROTATORIA). Verh. Internat. Verein. Limnol.
- Welschmeyer, N.A. & Lorenzen, C.J. 1985. Chlorophyll budgets: Zooplankton grazing and phytoplankton growth in a temperate fjord and the Central Pacific Gyres. Limnol. Oceanogr., 30: 1-21.
- Wetzel, R.G. 1981. Limnología. Ed. Omega. 679 pp.
- Wright, D.I. & W.J. O'Brien. 1982. Differential location of *Chaoborus* larvae and *Daphnia* by fish: the importance of motion and visible size. The American Midland Naturalist, 108: 68-73.
- Wurdak, E.S, J.J. Gilbert & R. Jagels. 1978. Fine

structure of resting eggs of the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna sieboldi*. Trans. Amer. Micros. Soc., 97: 49-72.

Yan, N.D. & G.L. Mackie. 1987. Improved estimation of the dry weight of *Holopedium gibberum* (Crustacea, Cladocera) using clutch size, a body fat index, and lake water total phosphorus concentration. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44: 382-389

Zöller, N. & Kirsch, K. 1962. Z. gex. exp. Med., 135:545.

## UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de *[Handwritten: D. María Jesús de Pineda, por el título de "Efectos de la explotación de aguas de riego en el cultivo de la alfalfa"]* acordó otorgarle la calificación de *[Handwritten: "Muy Bien"]*

Sevilla, *[Handwritten: 23]* de *[Handwritten: noviembre]* 19*[Handwritten: 88]*

El Vocal,

*[Handwritten signature]*

El Presidente

*[Handwritten signature]*

El Vocal,

*[Handwritten signature: MR Mirado]*

El Secretario,

*[Handwritten signature]*

El Vocal,

El Doctorado,

*[Handwritten signature]*

