

ESTUDIO SOBRE LA DIVERSIDAD CRÍPTICA Y LA TASA DE EMERGENCIA DE PROTOZOOS COMO POTENCIALES MARCADORES DEL ESTADO DE ALTERACIÓN DE SISTEMAS ACUÁTICOS

GEMA PARRA^{1*}, ANDREA GALOTTI¹, GENOVEVA ESTEBAN²

¹Ct Dpto. Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Centro de Estudios Avanzados en Ciencias de la Tierra, Universidad de Jaén (España)

² Department of Life and Environmental Sciences, Bournemouth University, Reino Unido

* Autor para correspondencia: gparra@ujaen.es

Recibido em 06 de fevereiro de 2016. Aceito em 15 de junho de 2016. Publicado em 09 de dezembro de 2016.

RESUMEN – Las actividades asociadas a la agricultura intensiva, y principalmente el uso de agroquímicos, son la causa principal de alteración y pérdida de biodiversidad en los humedales. Los protozoos, por sus requerimientos y sensibilidad a los contaminantes, son muy útiles como indicadores biológicos en sistemas acuáticos. Además, la existencia de un banco de semillas de la comunidad protozoaria en los sedimentos, la denominada diversidad críptica, asegura que estos microorganismos puedan emerger y realizar su papel después de la mencionada alteración. En este estudio se presentan los resultados preliminares de los efectos tóxicos generados por un fertilizante, el nitrato amónico, sobre las tasas de emergencia de los protozoos encistados o inactivos del banco de semillas. Esta evaluación se ha llevado a cabo mediante la simulación de sistema acuático artificial alterado y la evaluación de las tasas y patrones de emergencia de organismos presentes en el sedimento siguiendo diferentes estrategias de incubación posterior en laboratorio. La tasa de emergencia de las especies en muestras incubadas en el laboratorio, procedentes del sistema afectado no alcanzó los valores encontrados en las incubaciones del sedimento del control. Estas observaciones podría indicar una alteración de la capacidad de recuperación del sistema después de una perturbación. Sin embargo, durante las incubaciones, la detección de nuevas especies (aquellas que no habían sido determinadas en los sedimentos recién recolectados), fue similar en ambos casos.

PALABRAS CLAVE: DIVERSIDAD CRÍPTICA, PROTOZOOS, TOXICIDAD, RECUPERACIÓN, FERTILIZANTES.

ESTUDO DA DIVERSIDADE CRÍPTICA E DA TAXA DE EMERGÊNCIA DE PROTOZOÁRIOS COMO MARCADORES POTENCIAIS DO ESTADO DE ALTERAÇÃO DOS SISTEMAS AQUÁTICOS

RESUMO – As atividades associadas à agricultura intensiva, e principalmente o uso de agroquímicos, são a principal causa da alteração e perda de biodiversidade nos pantanais. Os protozoários ciliados, pelas suas necessidades e sensibilidade aos contaminantes, são muito úteis como indicadores biológicos nos sistemas aquáticos. Além disso, a existência de um banco de sementes da comunidade de ciliados nos sedimentos, a denominada diversidade críptica, garante que estes microorganismos possam realizar seu papel depois da dita alteração. Neste estudo são apresentados os resultados preliminares dos efeitos tóxicos gerados por um fertilizante, o nitrato de amônio, sobre o índice de eclosão de organismos em forma de cistos ou inativos. Esta avaliação foi feita através da simulação de um sistema aquático artificial alterado e também pela avaliação dos índices e padrões de eclosão dos organismos presentes no sedimento através de diferentes estratégias de posterior incubação em laboratório. O índice de eclosão das espécies nas amostras incubadas em laboratório, procedentes do sistema alterado, não alcançou os mesmos valores encontrados nas incubações feitas com o sedimento controle. Estas observações poderiam indicar uma alteração da capacidade de recuperação do sistema depois de uma perturbação. No entanto, durante as incubações, a detecção de novas espécies, tal como aquelas que não haviam sido determinadas nos sedimentos recém coletados, foi similar em ambos os casos.

PALAVRAS-CHAVE: DIVERSIDADE CRÍPTICA, PROTOZOÁRIOS, TOXICIDADE, RECUPERAÇÃO, FERTILIZANTES.

STUDY ON THE CRYPTIC DIVERSITY AND THE PROTOZOAN EMERGENCE RATE AS POTENTIAL MARKERS OF THE ALTERATION STATE OF AQUATIC SYSTEMS

ABSTRACT – Intensive agriculture activities, especially those that use xenobiotic products, are the main cause of alteration and loss of biodiversity in wetlands. Protozoa can be useful biological indicators in aquatic ecosystems due to their growth requirements and low tolerance to pollutants. Therefore, protozoan seed banks in sediments, also known as cryptic diversity, ensure the recovery in response to the environmental alteration. In this study, the potential toxic effect of a fertilizer, ammonium nitrate, on the emergence rates of the inactive encysted protozoa present in the seed bank was investigated. This assessment was conducted using the alteration of a simulated artificial aquatic system, and evaluating the rates and patterns of protozoan emergence following different incubation strategies in the laboratory. Species emergence in the incubations from the altered system did not reach the values found in incubations from the control system. This seems to indicate that the recovery response of the system after disturbance might slow down. However, during incubations the finding of new species, i.e. those not found in the freshly-collected samples, was similar in both cases.

KEY WORDS: CRYPTIC DIVERSITY, PROTOZOA, TOXICITY, RECOVERY, FERTILISERS.

INTRODUCTION

Los humedales son ecosistemas ampliamente distribuidos por todo el mundo que atesoran una parte considerable de la biodiversidad acuática. En concreto los humedales mediterráneos temporales son hábitats prioritarios de acuerdo con la red Natura 2000 de la Unión Europea (CEE 1992). Son sistemas con grandes necesidades de protección no sólo por el valor de la especies raras o en peligro que albergan, sino también por las altas tasas de degradación y desaparición a las que están siendo sometidos. Entre las alteraciones antropogénicas que sufren estos sistemas acuáticos cabe destacar las provocadas por las actividades asociadas a la agricultura intensiva, principalmente el uso excesivo y, a veces, descontrolado de agroquímicos (Guerrero et al. 2003). Los factores que influyen en el impacto que un tóxico puede ocasionar, dependerán de

su toxicidad, de su persistencia en el medio y de la cantidad de éste que se libere. Una vez liberados en el medio, el agua de riego y de lluvia se encargan de arrastrar lo que no ha sido incorporado por las plantas (Huber 1993). Los agroquímicos, por el modo de uso sobre los campos agrícolas que circundan un humedal, acaban contaminándolo, lo que se ha llegado a denominar como contaminación difusa. Las sustancias utilizadas, principalmente fertilizantes, herbicidas y pesticidas, llegan en última instancia desde la cuenca (ecosistema donante) al sistema acuático (ecosistema receptor). Las comunidades alteradas por procesos de contaminación normalmente reducen su riqueza específica y diversidad, quedando en los ecosistemas tan sólo las especies más resistentes a dicha alteración. Esto supone cambios no sólo en la estructura sino también en el funcionamiento de los ecosistemas (Clements and Newman 2002).

Los organismos acuáticos de menor tamaño que forman parte de la comunidad microbiana o protista, no suelen estar incluidos en las inspecciones biológicas encaminadas a estudios de conservación de los ecosistemas o a la hora de determinar las condiciones biológicas para la conservación de un determinado hábitat (Esteban and Finlay 2010). Un componente de gran importancia de dicha comunidad son los protozoos, puesto que constituyen la base de las cadenas tróficas (bucle microbiano), indispensables en el reciclado de nutrientes y en la producción final del ecosistema. No son simples componentes de la biota del sistema acuático, sino más bien que esta actividad y diversidad microbiana son componentes integrales del funcionamiento del mismo (Finlay and Esteban 1998). Las comunidades de ciliados tienen una distribución cosmopolita, ciclo de vida corto y alta sensibilidad a los contaminantes, lo que las hace útiles como indicadores biológicos de medio ambiente sedimentario así como bioindicadores del estado de la calidad de las aguas (Che et al. 2008). Una de las características más importantes de esta comunidad de protozoos es que muchas de las especies persisten en los sedimentos por largos periodos de tiempo en el llamado "banco de semillas", formando parte de la diversidad "potencial" más que de la diversidad "activa" (Finlay and Esteban 1998). En relación a la frase anterior, en los últimos años se ha acuñado un término que refleja muy bien esta situación, la llamada *Biodiversidad críptica* u oculta. Para los humedales, que son sistemas que sufren grandes cambios ambientales (periodos de desecación y llenado, cambios de salinidad, estratificaciones térmicas, etc.), la sola existencia del banco de semillas, asegura que los microorganismos siempre podrán realizar su papel en el funcionamiento de ecosistema independientemente de los mencionados cambios, es decir, la biodiversidad críptica ayuda a los ecosistemas naturales a recuperarse en respuesta a los cambios ambientales (Esteban and Finlay 2010). Sin embargo, cabe la posibilidad de que en sistemas en los que la perturbación antropogénica sea suficientemente fuerte, el banco de semillas se vea también negativamente alterado y la diversidad críptica disminuya lo suficiente como para que el funcionamiento del sistema se vea comprometido. La utilización de la biodiversidad críptica como herramienta en la gestión y conservación de sistemas acuáticos es una novedosa línea de investigación, ya que puede proporcionar una gran información sobre el estado de alteración de los sistemas. Para incorporarla en los planes de gestión de sistemas acuáticos, uniendo investigación con estrategias de conservación, es necesario obtener información de cómo las distintas agresiones y alteraciones que sufren los ecosistemas pueden estar afectando a la capacidad de mantenimiento y desarrollo en el tiempo de la biodiversidad críptica.

La hipótesis central en el trabajo que aquí se presenta es que los agroquímicos generan efectos negativos no sólo sobre la estructura y funcionamiento, sino también sobre la capacidad de recuperación de las comunidades acuáticas mediante la alteración del "banco de semillas" y la disminución de la diversidad críptica. En este sentido, se han evaluado los efectos tóxicos generados por un fertilizante, el nitrato amónico, sobre las tasas de emergencia de protozoos ciliados enquistados o inactivos presentes en los sedimentos. Esta experiencia se ha llevado a cabo mediante la utilización de mesocosmos, que han permitido la simulación de la alteración provocada por un producto tóxico sin comprometer el estado de un ecosistema acuático natural, y mediante la evaluación de las tasas y patrones de emergencia de organismos presentes en el sedimento utilizando diferentes estrategias de incubación en laboratorio posteriores a la exposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de los mesocosmos y tratamiento

En las instalaciones de Bournemouth University en el River Laboratory (East Stoke, Dorset, Reino Unido) se utilizaron dos tanques circulares (diámetro 2m), uno como mesocosmos control y el otro como mesocosmos tratamiento al que se añadió fertilizante. Estos tanques se llenaron a una altura de 5 cm con sedimento procedente de un río sin historia conocida de contaminación por productos agroquímicos. Los tanques se llenaron con agua de lluvia hasta una altura de 1m de profundidad (630 litros). Los dos tanques se mantuvieron en estabilización durante 30 días, previos al inicio del periodo de exposición al fertilizante. En este periodo de estabilización se consiguió el establecimiento de una comunidad biológica, tanto bentónica como planctónica. El periodo de exposición supuso la adición al mesocosmos de tratamiento de dos pulsos de 10 mg L⁻¹ nitrato amónico (concentración ambientalmente relevante), separados temporalmente una semana. Durante el mes de duración del periodo de exposición se registraron los siguientes parámetros físico-químicos y biológicos con periodicidad semanal: temperatura, oxígeno, conductividad y pH, que se midieron con una sonda multiparamétrica (YSI-56). La concentración de nitrógeno se midió por espectrofotometría siguiendo el protocolo de Doane and Horwath (2003). La concentración de clorofila *a* se midió por espectrofotometría (Wellburn 1994). A lo largo de dicho periodo se tomaron muestras frescas del sedimento de ambos mesocosmos cada semana, tanto para analizar la comunidad de protozoos como para realizar incubaciones del mismo en una cámara termostatazada y muestras de agua para el análisis de la comunidad zooplanctónica.

Evaluación de las muestras recién tomadas de los mesocosmos

Las muestras de sedimento recién tomadas se dispusieron en cámaras de recuento Sedgewick Rafter (1ml/1µl), para identificación de las especies presentes y para calcular la abundancia. El cálculo de abundancia permitió estimar el valor medio de la diversidad de la muestra utilizando el índice de diversidad de Shannon-Weaver (Shannon and Weaver 1949) para lo cual se realizaron al menos cuatro submuestras de cada tipo de sedimento. Para dicho cálculo la identificación taxonómica se realizó hasta nivel de género, aunque algunas de ellas fueron identificadas hasta el nivel de especie.

Para la evaluación de la riqueza y abundancia de los organismos zooplanctónicos encontrados durante el periodo de exposición se filtraron cuatro litros de agua de cada mesocosmos a través de una malla con tamaño de poro de 43µm. El recuento se realizó en placas de Petri bajo lupacada tres días. El cálculo de abundancia permitió estimar el valor medio de la diversidad de la muestra utilizando el índice de diversidad de Shannon-Weaver. Para dicho cálculo la identificación taxonómica se llevó hasta nivel de género. Con este muestreo se pretende evidenciar diferencias entre ambos sistemas artificiales asociadas a la adición del fertilizante.

Evaluación de las muestras en incubación

Después de cada uno de los dos pulsos de nitrato amónico se recogieron dos muestras de sedimento procedentes del mesocosmos control y del mesocosmos tratamiento, para analizar en el laboratorio. Todas las muestras se sometieron a dos fases distintas de incubación en condiciones de luz y temperatura controladas (20°C y con un

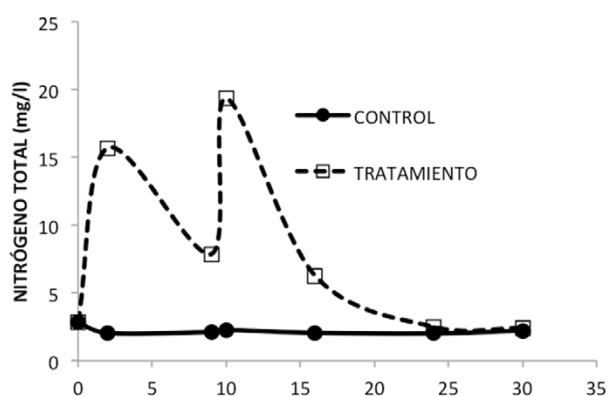
periodo de luz-oscuridad de 16-8 h). En la primera fase de incubación se dispusieron dos réplicas de cada muestra de sedimento procedente de cada mesocosmos en frascos estériles de 75 ml (Roux, Cultek) con agua mineral, por tanto sin tóxico, y añadiendo granos de trigo partidos y esterilizados como primera fuente de alimentación (Galotti et al 2014). En estas condiciones se mantuvieron los 8 frascos durante dos semanas para evaluar la riqueza de especies emergidas bajo las mismas, en aras de evaluar la biodiversidad críptica, detectar aquellas especies que no hubieran aparecido en las muestras frescas. Pasado dicho tiempo, parte del sedimento de los frascos en incubación se extrajo y se incubó de nuevo y por duplicado, añadiendo agua mineral y en este caso con polvo esterilizado de hojas de cereales como segunda fuente de alimentación. De esta manera, se cambió la estrategia de incubación para favorecer la emergencia de organismos de sus quistes que seguían formando parte del "banco de semillas" y que hasta ese momento aún no habían emergido. Las incubaciones se revisaban cada dos días para determinar las tasas y los patrones de emergencias de las especies utilizando cámaras de recuento Sedgewick Rafter (1ml/1µl), de tal manera que al final del proceso de incubación se realizó un ajuste lineal a los datos obtenidos. El valor de la pendiente de dicho ajuste lineal proporciona una aproximación a la tasa o velocidad de emergencia de las especies. Cada estrategia de incubación duró 14 días.

RESULTADOS

Los dos mesocosmos, control y tratamiento, no mostraron diferencias en los valores medios de temperatura (Control: $17,4 \pm 1,4$ °C; Tratamiento: $17,25 \pm 1,3$ °C) y pH (Control: $6,5 \pm 0,7$; Tratamiento: $6,5 \pm 0,7$), pero sí en conductividad (Control: $212,5 \pm 25,9$ µS; Tratamiento: $140,5 \pm 22,1$ µS), y en los valores de Oxígeno disuelto (Control: $69 \pm 1\%$; Tratamiento: $127 \pm 47\%$).

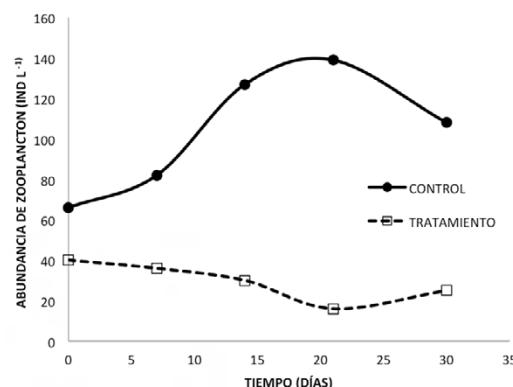
Los valores de nitrógeno total medidos en el mesocosmo tratamiento mostraban la adición de nitrato amónico en el sistema, aunque evolucionaron hasta valores similares a los encontrados en el mesocosmo control al final del periodo de exposición (Figura 1). Los valores máximos de Clorofila *a* encontrados después de cuatro semanas de exposición fueron de 30,98 y 474,75 µg l⁻¹ en el mesocosmo control y tratamiento respectivamente.

Figura 1 - Concentración de Nitrógeno Total en los mesocosmos control y tratamiento durante el periodo de exposición.



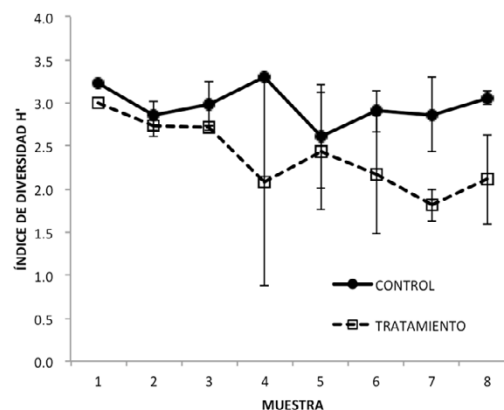
En análisis de las muestras de la comunidad zooplanctónica desarrollada en ambos mesocosmos se encontraron seis especies de rotíferos, dos especies de cladóceros y una especie de copépodo ciclopoidea. El índice de diversidad de Shannon-Weaver en la comunidad zooplanctónica mostró diferencias significativas entre tratamientos, siendo los valores medios $1,35 (\pm 0,43)$ y $1,34 (\pm 0,34)$ en el control y el tratamiento respectivamente. Sin embargo, los valores de densidad de organismos sí mostraron diferencias entre tratamientos a lo largo del periodo de exposición (Figura 2).

Figura 2 - Densidad de organismos zooplanctónicos en los mesocosmos control y tratamiento a lo largo del periodo de exposición



En lo referente a las comunidades protozoarias los siguientes géneros fueron observados en las muestras en fresco en ambos mesocosmos. Los marcados con una (T) o una (C), aparecen sólo en el mesocosmo tratamiento o control respectivamente: *Anisonema*, *Amphileptus*, *Astasia*, *Blepharisma* (C), *Bursaria*, *Chilomonas*, *Cinetochilum*, *Coleps*, *Dexiotricha*, *Dileptus*, *Euglenaphacus* (T), *Euglenasp*, *Entosiphon*, *Euplotes*, *Frontonia*, *Haematococcus* (T), *Halteria*, *Holosticha*, *Lacrimaria*, *Litonotus*, *Mallomonas*, *Metacystis*, *Metopus*, *Notosolenun*, *Oxytricha* (T), *Peranema* (T), *Prodoron*, *Spirostomus* sp 1, *Spirostomus* sp2 (C), *Strombidium* sp1, *Trachelomonas*, *Tachysoma*, *Uroleptus* (T). En la Figura 3 se pone de manifiesto la pérdida en diversidad de la comunidad de protozoos ciliados a lo largo del periodo de exposición en el sedimento del mesocosmo tratamiento frente a los valores encontrados en el control.

Figura 3 - Valores de índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') de la comunidad de protozoos encontrados en el sedimento de los mesocosmos control y tratamiento durante el periodo de exposición en las muestras en fresco. Muestras recogidas y analizadas cada tres días



La Figura 4 muestra la existencia de valores de riqueza de especies de la comunidad de protozoos ciliados similares en ambos mesocosmos, mediante la presentación de la curva de especies acumuladas en los recuentos realizados a lo largo del periodo de exposición.

Figura 4. Número de especies acumuladas encontradas en los recuentos de las muestras en fresco de los mesocosmos control y tratamiento.

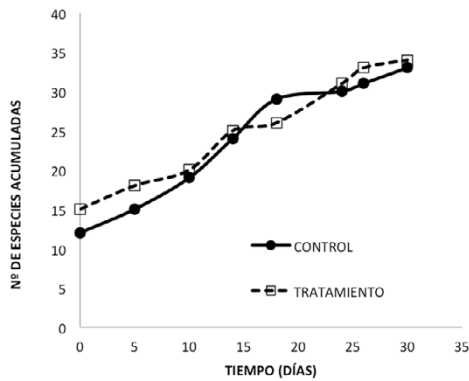
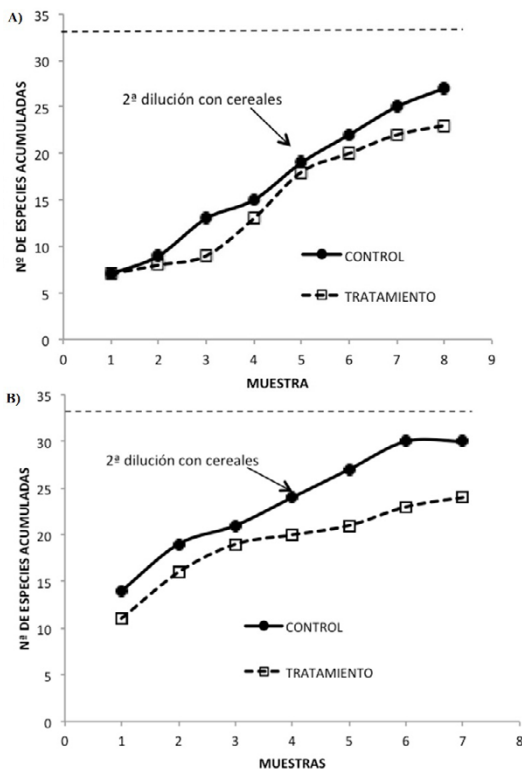


Figura 5. A) Número acumulado de especies aparecidas en las incubaciones de las muestras de sedimento recogidas al día siguiente del primer pulso de nitrato amónico. B) Número acumulado de especies aparecidas en las incubaciones de las muestras de sedimento recogidas al día siguiente del segundo pulso de nitrato amónico. La línea de puntos marca el número máximo de especies encontradas en las muestras fresca de los mesocosmos. Muestras recogidas y analizadas cada dos días.



La emergencia de especies de ciliados en las incubaciones de las muestras replicadas de sedimento procedente del mesocosmos control muestra valores mayores, al final de la curva de número acumulado de especies, de los encontrados en las incubaciones del sedimento del mesocosmos tratamiento, especialmente después de la adición del polvo de hojas de cereales como fuente de alimentación

(Figura 5A y B). Las diferencias entre la tasa de emergencia de las incubaciones procedentes del mesocosmos control y tratamiento se acentúa después del segundo pulso de nitrato amónico (Figura 5B). En el primer caso, el número de especies de ciliados de las incubaciones de sedimento procedente del mesocosmos control se acercan al máximo de especies encontradas en las muestras frescas recién tomadas de los mesocosmos (sin incubación, ver Figura 4), mientras que en el caso de las incubaciones de sedimento procedente del tratamiento no llegan a alcanzar dicho máximo incluso después de la segunda estrategia de incubación con la adición del polvo esterilizado de cereales. Los ajustes lineales realizados sobre las curvas de número acumulado de especies emergidas nos permiten, gracias a la pendiente, tener una aproximación al valor de la tasa de emergencia. En este sentido la pendiente de la curva de la incubación del control después del primer pulso fue de 2,99 ($R^2 = 0,99$; $n = 7$), similar al valor de pendiente de la curva de incubación del control después del segundo pulso de 2,71 ($R^2 = 0,96$; $n = 7$) y la incubación del tratamiento después del primer pulso con pendiente 2,62 ($R^2 = 0,99$; $n = 7$). Mientras que la curva obtenida en las incubaciones del mesocosmos tratamiento después del segundo pulso de nitrato amónico muestra el menor valor de pendiente, con 1,96 ($R^2 = 0,91$; $n = 7$), lo que indicaría una menor tasa de emergencia.

DISCUSIÓN

En el presente estudio el uso de mesocosmos ha permitido simular sistemas acuáticos de comunidades planctónicas y bentónicas que nos ha permitido generar una perturbación ambiental y analizar su respuesta sin impactar ningún ecosistema natural. Hay que indicar también que no fue posible el empleo de réplicas de los mesocosmos por lo que nuestra investigación no pretende realizar generalizaciones ni predicciones en los mismos aspectos que no fueron objeto de este estudio. Sin embargo, tanto los parámetros químicos como biológicos medidos, nos han permitido ver la evolución de la comunidad acuática diferente en cada uno de ellos tras la adición del fertilizante. Por un lado, los valores altos de sobresaturación de oxígeno, así como de clorofila a subrayan la alta actividad fitoplanctónica desarrollada en el mesocosmos tratamiento. Esta alta actividad está asociada al exceso de nitrógeno en una respuesta típica del enriquecimiento provocado por la adición del nutriente, similar a la eutrofización encontrada en ecosistemas acuáticos naturales rodeados de agricultura intensiva (Dobson and Frid 1998). En los momentos de mayor concentración fitoplanctónica apareció la especie de protista *Haematococcus pluvialis*, que responde con evidentes explosiones poblacionales ante valores altos de nutrientes en el sistema (Canter-Lund and Lund 1995). Esta situación, sin embargo, cambió al final del experimento debido principalmente a la alta actividad biológica desarrollada y quizá a la dilución ocurrida tras los altos valores de precipitación registrados en la zona de estudio durante dicho periodo, lo que explica la disminución de la concentración de nitrato al final del mismo. La precipitación registrada durante el periodo de estudio llevó a aumentar el volumen de los mesocosmos en un 75%. (En 2012 la lluvia registrada en el condado de Dorset alcanzó los valores de 1207.5 mm, mientras que en valor medio registrado entre los años 1981-2010 fue de 864.0 mm, MetOffice 2013). En relación a la comunidad zooplanctónica es llamativa la similitud en valores de diversidad a lo largo del periodo de exposición en ambos mesocosmos, ya que cabría esperar una disminución en la riqueza específica y la dominancia de alguna especie zooplanctónica en el mesocosmo tratamiento asociada al proceso de eutrofización provocado por el exceso de nutrientes (Jeppesen et al. 2000). Pero aún más llamativa es la baja densidad de organismos zooplanctónicos. Esta situación podría estar indicando una alta

sensibilidad al nitrato de los organismos presentes, reflejando un efecto negativo directo sobre los mismos, antes que un posible efecto positivo indirecto del nutriente por el incremento de su fuente de alimentación, el fitoplancton (Fleeger et al. 2003). La comunidad de protozoos del mesocosmos tratamiento respondió al enriquecimiento con nitrógeno disminuyendo la diversidad. Hecho que ya ha sido demostrado por otros autores, por ejemplo Lee et al (2004) encuentran un aumento de diversidad en la comunidad de ciliados cuando el estado ecológico del sedimento mejora. Sin embargo, aunque hay una menor diversidad, el número total de especies aparecidas, la riqueza, no es menor (Fig. 4). Esto es opuesto a lo encontrado por algunos autores, que declaran como una perturbación puede reducir la riqueza de la comunidad microbiana (Yu et al. 2005). En general, los índices de diversidad son capaces de detectar mejor los cambios en los ecosistemas que la riqueza específica. El hecho de que sea la diversidad la que disminuya mientras que la riqueza se mantiene, indica que está teniendo lugar la dominancia de alguna especie en el presente estudio. Los responsables de dicha dominancia fueron el ciliado *Coleps* sp. y el flagelado *Chilomonas* sp.; la presencia de este flagelado catapultó el crecimiento de *Coleps*. Hay que remarcar de nuevo que, debido a la inexistencia de réplicas, estas respuestas tan sólo nos permiten entender que las muestras que posteriormente se utilizaron para las experiencias de incubación, y objetivo principal del trabajo, procedían de sedimentos de sistemas distintos. Tal y como ocurriría si las muestras fuesen recogidas de dos ecosistemas acuáticos naturales con grados de alteración por contaminación diferentes, expuestos a similares condiciones ambientales de temperatura de aire, precipitación, viento, etc.

Las diferencias en el patrón de emergencia de las especies de ciliados en las incubaciones en el laboratorio muestran que el sedimento del mesocosmos tratamiento sufrió una alteración en su capacidad de respuesta. El descenso en la tasa de emergencia de los ciliados en dicho sedimento bajo las mismas condiciones de incubación así lo muestran. Aún mejorando las condiciones en la incubación con otra nueva fuente de alimentación (polvo de cereales), el número de especies que aparecen en las muestras de sedimento procedentes del mesocosmos fertilizado no alcanzaron los valores encontrados en las incubaciones del sedimento del sistema control. Se produjo una disminución en el número de especies emergentes de aproximadamente un 30% de la capacidad inicial en el tratamiento frente al 9% registrado en el mesocosmos control. Además, se detectó una mayor presencia de especies anaeróbicas en las incubaciones procedentes del sedimento del mesocosmos tratamiento, como *Caenomorpha* y *Lagynus*. En estas incubaciones también aumentó considerablemente la concentración de bacterias en las réplicas de las incubaciones procedentes del mesocosmos tratamiento (observación personal). La bibliografía ha mostrado que existe una correlación positiva entre el enriquecimiento del medio con nutrientes y el incremento de la abundancia de bacterias (Kaunzinger and Morin 1998). Lo que es una incógnita es si, después de ambos pulsos y si no se produjera ningún nuevo proceso de alteración, la capacidad de recuperación de dicho sedimento se incrementaría restableciendo una capacidad de respuesta similar a la obtenida en el mesocosmos control. Esto es parte de una futura investigación donde se diseñarán experiencias replicadas y de mayor duración.

La emergencia de especies no observadas previamente en los análisis y recuentos de las muestras en fresco, es muy similar en las incubaciones del sedimento procedente de ambos mesocosmos: tres en las incubaciones del sedimento procedente del mesocosmos control tras el primer pulso (*Prorodon*, *Chilodonella*, *Tecamoeba*) y cuatro en las incubaciones del sedimento del tratamiento (*Prorodon*, *Spathidium*, *Brachonella*, *Parameciumbursaria*). Después del segundo

pulso de nitrato apareció una especie nueva en las incubaciones del mesocosmos control (*Dileptus monilatus*), mientras que en las incubaciones procedentes del tratamiento aparecieron dos especies nuevas (*Euglena piriforme* y *Acineria*). Por lo que el hipotético descenso en la biodiversidad críptica de la comunidad de protozoos en el mesocosmos tratado con el fertilizante no ha sido confirmado mediante el presente estudio. La inclusión en un estudio más profundo de otros componentes del banco de semillas, como rotíferos, cladóceros o copépodos, proporcionará una visión más completa del efecto sobre este compartimento estructural y funcionalmente tan relevante de los sistemas acuáticos.

AGRADECIMIENTOS

Parte de la financiación necesaria para la realización de este trabajo procede de la ayuda para una estancia de excelencia en el extranjero concedida a la Dra. Gema Parra por parte de la Junta de Andalucía (Ref: DGITE_SV.PAI/IAC_3/2011/11/13/mmel). Queremos agradecer al Dr. Daniel Franklin y al Dr. Iain Green por su ayuda en el análisis de clorofila y nitrógeno. Igualmente, agradecemos financiación de la organización Alice Ellen Cooper Dean Charitable Foundation (Reino Unido).

CONCLUSIONES

La capacidad de recuperación del sistema acuático simulado puede verse ralentizada debido al efecto negativo que sobre la tasa de emergencia de los protozoos del banco de semillas supuso la exposición al fertilizante a concentraciones ambientalmente relevantes. Sin embargo, la aparición de nuevas especies durante las incubaciones, en términos generales, no se ha visto afectada por el tratamiento con fertilizante. Por tanto, la posibilidad de utilizar la biodiversidad críptica como marcador de estado del sistema, no se ha confirmado.

REFERENCIAS

- Canter-Lund H and Lund JWG. 1995. **Freshwater Algae. Their microscopic world explored.** Biopress Ltd. Bristol. 360 pp.
- CEE. 1992. Directiva 92/43 relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. Bruselas. 57 pp.
- <http://www.jcyl.es/web/jcyl/binarios/429/539/1-Directiva%20habitat%2092-43.pdf?blobheader=application%2Fpdf%3Bcharset%3DUTF-8&blobnocache=true>
- Chen Q, XU R, Tam N, Cheung S. and Shin PKS. 2008. Use of ciliates (Protozoa: Ciliophora) as bioindicator to assess sediment quality of two constructed mangrove sewage treatment belts in Southern China. **Marine Pollution Bulletin**, 57: 689-694. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X08001677>
- Clements W and Newman MC. 2002. **Community Ecotoxicology.** John Wiley & Sons. Chichester, UK. 356 pp.
- Doane TA and Horwath WR. 2003. Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. **Analytical Letters**, 36:2713-2722.

Dobson M and Frid C. 1998. Lakes and Ponds. En: **Ecology of Aquatic Systems**. Addison Wesley Longman Essex, pp134-157.

Esteban G and Finlay BJ. 2010. Conservation work is incomplete without cryptic biodiversity. **Nature**, 463:293. <http://www.nature.com/nature/journal/v463/n7279/full/463293c.html>

Finlay BJ and Esteban GF. 1998. Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function. **Biodiversity and Conservation**, 7:1163-1186. <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1008879616066>

Fleeger JW, Carman KR and Nisbet RM. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, 317: 207-233. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969703001414>

Galotti A, Finlay BJ, Jiménez-Gómez F, Guerrero F AND Esteban G. 2014. Most ciliated protozoa in extreme environments are cryptic in the 'seed-bank'. **Aquatic Microbial Ecology**, 72:187-193. <http://www.int-res.com/articles/feature/a072p187.pdf>

Guerrero F, Ortega F, Parra G, Cano E, Cano A, García R and Carreira JA. 2003. Efectos ecológicos de la intensificación del cultivo del olivar en la comarca del Alto Guadalquivir: repercusión sobre la diversidad. En: **La cultura del aceite en Andalucía. La tradición frente a la modernidad**. (J. L. Anta, J. Palacios). Fundación Machado. Jaén, Spain. Pp 53- 63.

Huber W. 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 12: 1865-1881. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620121014/abstract>

Jeppesen E, Peder JJ, Søndergaard M, Lauridsen T and Landkildehus F. 2000. Trophic structure, species richness and biodiversity in Danish lakes: changes along a phosphorus gradient. **Freshwater Biology**, 45:201-218. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2427.2000.00675.x/full>

Kaunzinger CMK and Morin PJ. 1998. Productivity controls food-chain properties in microbial communities. **Nature**, 395:495-497. <http://www.nature.com/nature/journal/v395/n6701/abs/395495a0.html>

Lee S, Basu CW, Tyler I and Wei W. 2004. Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. **Advances in Environmental Research**, 8:371-378. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093019102001181>

METOFFICE. 2013. The Met Office is the UK's National Weather Service. <http://www.metoffice.gov.uk/>

Shannon CE and Weaver W. 1949. **The Mathematical Theory of Communication**. University of Illinois Press, Urbana, USA

Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144:307-313. <http://eprints.lancs.ac.uk/22544/>

Yu H, Feng WS, Shen YF, Ye ZH and Wong MH. 2005. Use of Microbial Community to Evaluate Performance of a Wetland System in Treating Pb/Zn Mine Drainage. **Environmental Management**, 36:842-848. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00267-003-0276-y>